

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 565**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**A61K 38/45** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2015 PCT/EP2015/059099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162302**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2015 E 15719677 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3134530**

54 Título: **Tratamiento de la hiperbilirrubinemia**

30 Prioridad:

**25.04.2014 EP 14305622**  
**04.12.2014 EP 14196400**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.02.2020**

73 Titular/es:

**GENETHON (50.0%)**  
**1 bis rue de l'Internationale**  
**91000 Evry, FR y**  
**INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC**  
**ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MINGOZZI, FEDERICO;**  
**RONZITTI, GIUSEPPE;**  
**COLLAUD, FANNY;**  
**MURO, ANDRÉS y**  
**BORTOLUSSI, GIULIA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 744 565 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

Tratamiento de la hiperbilirrubinemia

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico útil en el tratamiento de la hiperbilirrubinemia, en particular, en el tratamiento del síndrome de Crigler-Najjar. Más particularmente, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención es una secuencia codificante UGT1A1 humana con codón optimizado.

**Antecedentes de la invención**

10 El síndrome de Crigler-Najjar (CN) es un trastorno autosómico recesivo con hiperbilirrubinemia no conjugada grave debido a la deficiencia de la isoenzima bilirrubina UDP-glucuronosiltransferasa 1A1 (UGT1A1) codificada por el gen UGT1A1 (OMIM#218800). La prevalencia de CN es de aproximadamente 1/1.000.000 de individuos al nacer lo que hace que el CN sea una enfermedad extremadamente rara. La terapia actual para el CN se basa en la fototerapia para prevenir elevaciones de los niveles séricos de bilirrubina. Para la forma leve de la enfermedad, también conocida como CN tipo II, se puede usar fenobarbital para reducir la bilirrubinemia. No obstante, los pacientes están potencialmente expuestos al riesgo de picos potencialmente mortales en la bilirrubina en sangre y el trasplante de hígado sigue siendo el único tratamiento curativo. En su forma más severa, la enfermedad es letal debido al daño neurológico inducido por la bilirrubina a menos que se aplique la fototerapia desde el nacimiento. A pesar de la disponibilidad de una terapia, el CN sigue siendo una necesidad médica insatisfecha por varias razones, incluyendo la pérdida de eficacia de la fototerapia durante el crecimiento, el deficiente cumplimiento debido a la limitación de la fototerapia en sí (que se necesita llevar a cabo durante 10-12 horas cada día) y la aparición de cambios hepáticos patológicos a lo largo del tiempo que pueden requerir trasplante de hígado.

15 Existen diferentes modelos animales de la enfermedad, que incluyen, la rata Gunn natural y un modelo de ratón *knock-in* más reciente de las enfermedades desarrollado por el Dr. Muro en el ICGEB en Trieste, Italia, que porta la misma mutación presente en la rata Gunn (Bortolussi *et al.*, 2012). Las ratas Gunn presentan altos niveles de bilirrubina en suero y tienen hipoplasia cerebelosa; los ratones CN tienen un fenotipo mucho más severo, mueren poco después del nacimiento si no se tratan inmediatamente con fototerapia o terapia génica (Bortolussi *et al.*, 2012).

25 Estudios previos destinados a desarrollar una terapia basada en genes para el CN mostraron que la eficacia terapéutica se podría lograr usando vectores AAV administrados en el hígado (Bortolussi *et al.*, 2012; Seppen *et al.*, 2006). Sin embargo, aún existe la necesidad de una estrategia terapéuticamente más eficaz.

30 El síndrome de Gilbert (o GS; OMIM nº 218800) es un trastorno genético del hígado y la causa hereditaria más común de aumento de la bilirrubina. Se encuentra en hasta el 3-12% de la población. El GS también es causado por mutaciones en el gen UGT1A1. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas destinadas a reducir la hiperbilirrubinemia se implementarían también ventajosamente en el tratamiento de GS.

**Compendio de la invención**

35 La presente invención se refiere a una secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado derivada del ADNc de UGT1A1 humano. Más particularmente, la secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado tiene un mayor contenido de GC y tiene un número reducido de marcos de lectura abiertos alternativos en comparación con la secuencia codificante humana salvaje de SEQ ID N°: 1. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de la invención da como resultado un aumento de al menos 2, 3, 4, 5 o 10% de contenido de GC en la secuencia UGT1A1 en comparación con la secuencia de la secuencia UGT1A1 humana salvaje. En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico de la invención da como resultado un aumento de 2, 3, 4, o más preferiblemente 5% o 10% (preferiblemente 5%) de contenido GC en la secuencia UGT1A1 en comparación con la secuencia de la secuencia UGT1A1 humana salvaje. En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico de la invención que codifica una proteína UGT1A1 humana con codón optimizado es "sustancialmente idéntica", es decir, 97%, 98% o incluso 99% idéntica a la secuencia SEQ ID N°: 2. En una realización particular, la invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína UGT1A1 humana con codón optimizado en donde la secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2.

45 De manera ventajosa, el ácido nucleico con codón optimizado de la invención proporciona una reducción mejorada de los niveles de bilirrubina y/o una inmunogenicidad disminuida.

50 La invención también se refiere a un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención. El constructo de ácido nucleico corresponde a un casete de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención operativamente ligada a un promotor. El promotor puede ser un promotor ubicuo o específico de tejido, en particular, un promotor específico de hígado. Más particularmente, el promotor es un promotor específico de hígado como el promotor de alfa-1 antitripsina (hAAT) (SEQ ID N°: 4), el promotor de transtiretina, el promotor de albúmina, el promotor de la globulina de unión a tiroxina (TBG), etc. Se conocen en la técnica otros promotores específicos de hígado útiles, por ejemplo los enumerados en la Base de Datos de Promotores de Genes Específicos de Hígado compilados por Cold Spring Harbor Laboratory (<http://rulai.cshl.edu/LSPD/>). Los promotores

ubicuos representativos incluyen el promotor de la beta actina de pollo (CAG)/potenciador de citomegalovirus, el promotor/potenciador de citomegalovirus (CMV), el promotor PGK, el promotor temprano de SV40, etc. En una realización particular, el promotor está asociado a una secuencia potenciadora como la región de control de ApoE, como la región control de ApoE humana (o el locus del gen de la apolipoproteína E/EC-I humana, región control HCR-1 hepática - N° acceso de Genbank U32510 que se muestra en la SEQ ID N°: 11). En una realización particular, una secuencia potenciadora como la secuencia ApoE está asociada a un promotor específico de hígado como los enumerados anteriormente y, en particular, como el promotor hAAT.

En una realización particular, el constructo de ácido nucleico comprende un intrón, en particular, un intrón colocado entre el promotor y la secuencia codificante. Se puede introducir un intrón para aumentar la estabilidad del ARNm y la producción de la proteína. En una realización particular, el constructo de ácido nucleico comprende un intrón de la beta globina b2 (o HBB2) humana, un intrón del factor IX de coagulación (FIX), un intrón SV40 o un intrón de la beta globina de pollo. En una realización particular, el constructo de ácido nucleico de la invención contiene un intrón modificado (en particular un intrón de HBB2 o FIX modificado) diseñado para disminuir el número de marcos de lectura abierta alternativos (ARF), o incluso eliminarlos por completo, encontrados en dicho intrón. Preferiblemente, se eliminan los ARF cuya longitud abarca más de 50 pb y tienen un codón de terminación en el marco con un codón de inicio. Los ARF se pueden eliminar modificando la secuencia del intrón. Por ejemplo, la modificación se puede llevar a cabo mediante sustitución, inserción o eliminación de nucleótidos, preferiblemente mediante sustitución de nucleótidos. Como una ilustración, se pueden reemplazar uno o más nucleótidos, en particular un nucleótido en un codón de inicio ATG o GTG presente en la secuencia del intrón de interés lo que da como resultado un codón de no inicio. Por ejemplo, un ATG o un GTG se puede reemplazar por un CTG, que no es un codón de inicio, dentro de la secuencia del intrón de interés.

El clásico intrón HBB2 usado en constructos de ácido nucleico se muestra en la SEQ ID N°: 5. Por ejemplo, este intrón HBB2 se puede modificar eliminando los codones de inicio (codones ATG y GTG) dentro de dicho intrón. En una realización particular, el intrón HBB2 modificado comprendido en el constructo tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID N°: 6. El clásico intrón FIX usado en constructos de ácido nucleico se deriva del primer intrón de FIX humano y se muestra en la SEQ ID N°: 7. El intrón FIX se puede modificar eliminando los codones de inicio (codones ATG y GTG) dentro de dicho intrón. En una realización particular, el intrón FIX modificado comprendido en el constructo de la invención tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID N°: 8. El clásico intrón de la beta globina de pollo usado en constructos de ácido nucleico se muestra en la SEQ ID N°: 9. El intrón de la beta-globina de pollo se puede modificar eliminando los codones de inicio (codones ATG y GTG) dentro de dicho intrón. En una realización particular, el intrón modificado de beta-globina de pollo comprendido en el constructo de la invención tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID N°: 10.

Los inventores han mostrado que dicho intrón modificado, en particular, un intrón HBB2 o FIX modificado, tiene propiedades ventajosas y puede mejorar significativamente la expresión del transgen. Además, disminuyendo el número de ARF dentro del intrón incluido dentro del constructo de la invención, se cree que también se disminuye la inmunogenicidad del constructo.

Por lo tanto, la presente descripción también se refiere a un intrón destinado a ser usado en un casete de expresión y que está modificado para aumentar la eficacia de la expresión de un transgen localizado en el casete. En particular, la descripción se refiere a un intrón derivado de un intrón conocido pero donde se ha disminuido el número de ARF o donde los ARF se han eliminado totalmente. En una realización particular, la descripción se refiere a un intrón HBB2 modificado con un número disminuido de ARF o sin ARF. En una realización particular adicional, el intrón HBB2 modificado es el mostrado en la SEQ ID N°: 6. En otra realización, la invención se refiere a un intrón FIX modificado con un número disminuido de ARF, o sin ARF. En otra realización particular adicional, el intrón FIX modificado es el mostrado en la SEQ ID N°: 8. En una realización, la invención se refiere a un intrón de beta-globina de pollo modificado con un número disminuido de ARF, o sin ARF. En una realización particular adicional, el intrón de beta globina de pollo modificado es el mostrado en la SEQ ID N°: 10. La presente descripción también se refiere a un constructo de ácido nucleico, un vector como un vector viral, en particular un vector AAV y una célula que comprende el intrón modificado de la invención. El constructo de ácido nucleico puede incluir secuencias control de expresión adicionales como un promotor y/o potenciador como los descritos en esta memoria y otros. El intrón modificado como se describe en esta memoria aumenta la eficacia de expresión de un transgen localizado en el constructo de ácido nucleico como un gen de interés como un gen terapéutico. En el contexto de este aspecto de la descripción, un "gen terapéutico" se refiere generalmente a un gen que codifica una proteína terapéutica que es útil en el tratamiento de una afección patológica. El gen terapéutico, cuando se expresa, confiere un efecto beneficioso en la célula o tejido en el que está presente o en un paciente en el que se expresa el gen. Ejemplos de efectos beneficiosos incluyen mejora de un signo o síntoma de una afección o enfermedad, prevención o inhibición de una afección o enfermedad o atribución de una característica deseada. Genes terapéuticos incluyen genes que corrigen parcial o totalmente una deficiencia genética en el paciente. En particular, el gen terapéutico puede ser, sin limitación, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína útil en terapia génica para aliviar las deficiencias causadas por la falta, deficiencia o niveles sub-óptimos de dicha proteína en una célula o tejido de un sujeto. Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un constructo de ácido nucleico, un vector como un vector viral, en particular un vector AAV y una célula que comprende el intrón modificado como se describe en esta memoria y además comprende un gen terapéutico de interés para usar en terapia génica. La presente descripción se puede generalmente aplicar para la terapia de cualquier enfermedad que se pueda tratar mediante la expresión de un gen terapéutico en una célula o tejido de un sujeto. Estos incluyen, por ejemplo,

5 enfermedades proliferativas (cánceres, tumores, displasias, etc.), enfermedades infecciosas; enfermedades virales (inducidas, p. ej., por los virus de Hepatitis B o C, HIV, herpes, retrovirus, etc.); enfermedades genéticas (fibrosis quística, distroglicanopatías, miopatías como Miopatía Muscular de Duchenne; miopiopatía miotubular; hemofilias; anemia de célula falciforme, enfermedad de célula falciforme, anemia de Fanconi; diabetes; esclerosis lateral

10 amiotrófica, enfermedades de mononeuronas como atrofia muscular espinal, atrofia muscular espinobulbar o enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; artritis; inmunodeficiencias combinadas severas (como RS-SCID, ADA-SCID o X-SCID), síndrome de Wiskott-Aldrich, trombocitopenia ligada a X, neutropenia congénita ligada a X, enfermedad granulomatosa crónica, etc.), enfermedades cardiovasculares (reestenosis, isquemia, dislipidemia, hipercolesterolemia familiar homocigota, etc.), o enfermedades neurológicas (enfermedades psiquiátricas,

15 enfermedades neurodegenerativas como de Parkinson o de Alzheimer, enfermedad de Huntington, adicciones (p. ej., al tabaco, alcohol o drogas), epilepsia, enfermedad de Canavan, adrenoleucodistrofia, etc.), enfermedades oculares como retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, neuropatía óptica hereditaria de Leber, enfermedad de Stargardt; enfermedades de almacenamiento lisosomal como síndrome de San Filippo; hiperbilirrubinemia como CN tipo I o II o síndrome de Gilbert, enfermedad de Pompe, etc. Como se mencionó anteriormente y se desarrolló

20 adicionalmente en la siguiente descripción, para afectar a la expresión de un transgen como un gen terapéutico en una célula huésped receptora, está preferiblemente ligado a un promotor, ya sea el suyo propio o un promotor heterólogo. Se conocen en la técnica un gran número de promotores adecuados, la elección de la que depende el nivel de expresión deseado del producto codificado por el gen terapéutico; si se quiere expresión constitutiva, expresión específica de célula o específica de tejido, etc. El constructo de ácido nucleico que comprende el intrón modificado, el vector que comprende dicho constructo de ácido nucleico o la célula que comprende dicho constructo o dicho vector se puede usar además en terapia génica o celular cuando el gen de interés es un gen terapéutico como se definió anteriormente.

25 En una realización particular, el constructo de ácido nucleico de la invención es un casete de expresión que comprende, en la orientación 5' a 3', un promotor opcionalmente precedido por un potenciador, la secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado de la invención y una señal de poli adenilación. En una realización particular, el constructo de ácido nucleico de la invención es un casete de expresión que comprende, en la orientación 5' a 3', un promotor opcionalmente precedido por un potenciador (como la región control de ApoE), un intrón (en particular un intrón como se definió anteriormente), la secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado de la invención y una señal de poli adenilación. En una realización particular adicional, el constructo de ácido nucleico de la invención es un casete de expresión que comprende, en la orientación 5' a 3', un potenciador como la región control de ApoE, un promotor, un intrón (en particular un intrón como se definió anteriormente), la secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado de la invención y una señal de poli adenilación.

35 La invención también se refiere a un vector, siendo un vector viral y que comprende un constructo de ácido nucleico como se describió anteriormente. En particular, el vector de la invención es un vector adecuado para usar en terapia génica. Más particularmente, el vector es un vector viral adecuado para terapia génica que se dirige a tejido o células hepáticas. En este caso, el constructo de ácido nucleico de la invención también contiene secuencias adecuadas para producir un vector viral eficaz, como se conoce bien en la técnica. En una realización particular adicional, el vector viral es un vector AAV como un vector AAV adecuado para transducir tejidos o células hepáticas, más particularmente un vector AAV-1, -2, -5, -6, -7, -8, -9, -rh10, -rh74, -dj, etc., o un vector retroviral como un vector lentiviral. En una realización adicional, el vector AAV comprende un genoma que es de cadena sencilla o de cadena doble complementaria. Preferiblemente para la práctica de la presente invención, el genoma de AAV es de cadena sencilla. Como se conoce en la técnica, dependiendo del vector viral específico considerado para usar, se introducirán secuencias adecuadas en el constructo de ácido nucleico de la invención para obtener un vector viral funcional. Secuencias adecuadas incluyen AAV ITR para un vector AAV o LTR para vectores lentivirales. Como tal, la invención

45 también se refiere a un casete de expresión como se describió anteriormente, flanqueado por un ITR o un LTR en cada lado.

50 En una realización particular preferida, la invención se refiere a un vector AAV que comprende, en un genoma de cadena sencilla o de doble-cadena auto-complementario (p. ej., un genoma de cadena sencilla), el constructo de ácido nucleico de la invención. En una realización particular, el constructo de ácido nucleico comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID N°: 2. En una realización, el vector AAV es un vector AAV8. Dicho ácido nucleico está operativamente ligado a un promotor, especialmente un promotor ubicuo o específico de hígado. De acuerdo con una realización específica variante, el promotor es un promotor ubicuo como el potenciador del citomegalovirus/ promotor de beta actina de pollo (CAG), el potenciador/promotor del citomegalovirus (CMV), el promotor PGK y el promotor temprano de SV40. En una variante específica, el promotor ubicuo es un promotor CAG. De acuerdo con otra variante,

55 el promotor es un promotor específico de hígado como el promotor de alfa-1 antitripsina (hAAT), el promotor de transtiretina, el promotor de la albúmina y el promotor de la globulina de unión a tiroxina (TBG). En una variante específica, el promotor específico de hígado es el promotor específico de hígado hAAT de la SEQ ID N°: 4. En una realización particular adicional, el constructo de ácido nucleico comprendido dentro del genoma del vector AAV de la invención comprende además un intrón como se describió anteriormente, como un intrón localizado entre el promotor y la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína UGT1A1. Intrones representativos que pueden estar incluidos dentro del constructo de ácido nucleico introducidos dentro del genoma del vector AAV incluyen, sin limitación, el intrón de la beta globina b2 humana (o HBB2), el intrón FIX y el intrón de la beta-globina de pollo. Dicho intrón dentro del genoma del vector AAV puede ser un intrón clásico (o sin modificar) o un intrón modificado diseñado para disminuir el

60

número de, o incluso eliminar totalmente, marcos de lectura abierta alternativos (ARF) dentro de dicho intrón. Intrones modificados y sin modificar que se pueden usar en la práctica de esta realización donde el ácido nucleico de la invención se introduce dentro de un vector AAV, en particular el vector AAV8, de la invención incluyen dentro de su genoma un intrón modificado (u optimizado) como el intrón HBB2 modificado de la SEQ ID N°: 7, el intrón FIX modificado de la SEQ ID N°: 8 y el intrón de la beta-globina de pollo modificado de la SEQ ID N°: 10.

La invención también se refiere a una célula, por ejemplo una célula hepática, que se transforma con un constructo de ácido nucleico de la invención. Se pueden suministrar las células de la invención al sujeto que lo necesita a través de inyección en el hígado o en el torrente sanguíneo de dicho sujeto. En una realización particular, la invención implica introducir el constructo de ácido nucleico de la invención en células hepáticas, en particular en células hepáticas del sujeto a tratar, siendo dichas células hepáticas para la administración al sujeto.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente activo seleccionado de un constructo de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención o una célula de la invención, en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable.

La descripción también se refiere a un método para el tratamiento de una hiperbilirrubinemia causada por una mutación en el gen UGT1A1 que comprende una etapa de distribuir el constructo nucleico, el vector, la composición farmacéutica o la célula de la invención a un sujeto que lo necesita. En una realización particular, la hiperbilirrubinemia es un síndrome CN de tipo I o II o síndrome de Gilbert.

La invención también se refiere al constructo nucleico, el vector, la composición farmacéutica o la célula de la invención para usar como un medicamento.

La invención también se refiere al constructo nucleico, el vector, la composición farmacéutica o la célula de la invención para usar en un método para el tratamiento de una hiperbilirrubinemia causada por una mutación en el gen UGT1A1, en particular en un método para el tratamiento del síndrome CN de tipo I o II o del síndrome de Gilbert.

La invención se refiere además al uso del constructo nucleico, el vector, la composición farmacéutica o la célula de la invención, en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de una hiperbilirrubinemia causada por una mutación en el gen UGT1A1, en particular para el tratamiento del síndrome CN tipo I o II, o del síndrome de Gilbert.

### Descripción detallada de la invención

El término "UGT1A1" se refiere al ADNc del polipéptido A de la UDP-glicosiltransferasa 1 familia 1 salvaje de *homo sapiens*, (UGT1A1), mostrado en la SEQ ID N°: 1 (número de acceso NM\_000463.2, que es la secuencia de referencia para los CDS del ARNm para la UGT1A1 humana; referencia OMIM 191740).

El término "codón optimizado" significa que se cambia un codón que expresa una preferencia para humano (es decir, es común en genes humanos, pero no común en otros genes de mamíferos o genes de no mamíferos) por un codón sinónimo (un codón que codifica para el mismo aminoácido) que no expresa una preferencia para humano. Por lo tanto, el cambio en el codón no da como resultado ningún cambio de aminoácido en la proteína codificada.

Las secuencias mostradas en la SEQ ID N°: 2 es una realización preferida de la secuencia de ácido nucleico con codón optimizado de la invención.

El cambio en la secuencia de ADN que deriva de la optimización del codón en la SEQ ID N°: 2 y en la SEQ ID N°: 3 da como resultado aproximadamente el 5% y aproximadamente el 10% de aumento del contenido de GC en la secuencia UGT1A1, respectivamente.

También se abarca por la invención una secuencia de ácido nucleico de la invención que codifica una proteína UGT1A1 humana con codón optimizado que es "sustancialmente idéntica", es decir, 97%, 98% o incluso 99% idéntica a la secuencia SEQ ID N°: 2.

"Idéntico" se refiere a la identidad de secuencia entre las dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas de las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma base, p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas X 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en las dos secuencias coinciden, entonces las dos secuencias son el 60% idénticas. Generalmente, se hace una comparación cuando las dos secuencias se alinean para dar una identidad máxima. Se podrían usar varias herramientas bioinformáticas conocidas por el experto en la técnica para alinear secuencias de ácido nucleico como BLAST o FASTA.

El término "inmunogenicidad disminuida" como se aplica a la secuencia que codifica UGT1A1 con codón optimizado o al intrón modificado de la presente descripción significa que este gen con codón optimizado o intrón modificado comprende un número disminuido de marcos de lectura abierta alternativos potenciales (o ARF) ya sea en el intrón, o en la secuencia codificante, o ambas, limitando de este modo el número de potenciales subproductos de proteína de

traducción, en particular a partir del ARNm codificado, en comparación con el ADNc salvaje u otras variantes de ADNc de UGT1A1. En particular, los ARF disminuidos son aquellos cuya longitud se extiende sobre 50 pb y tienen un codón de terminación en marco con un codón de iniciación.

5 En el contexto de la presente invención, el término “terapia génica” se refiere al tratamiento de un sujeto que implica la distribución de un gen/ácido nucleico dentro de unas células del individuo con el propósito de tratar una enfermedad. La distribución del gen se logra generalmente usando un transportador de distribución, también conocido como vector. Se pueden emplear vectores virales y no virales para distribuir un gen a unas células del paciente. Se prefieren particularmente vectores AAV, en particular un vector AAV8.

10 Se apreciará que el ácido nucleico de la invención pueda incluir una o más señales de poli adenilación, típicamente localizadas en el extremo 3’ de la molécula.

15 El vector para distribuir el ácido nucleico de la invención es un vector viral, como un vector retroviral, por ejemplo un vector lentiviral o un parvovirus no patógeno, más preferiblemente un vector AAV. El Virus Adeno-Asociado (AAV) de parvovirus humano en un dependovirus que es defectuoso de forma natural para la replicación, que es capaz de integrarse dentro del genoma de la célula infectada para crear una infección latente. La última propiedad parece ser única entre los virus de mamíferos porque la integración ocurre en un sitio específico en el genoma humano, llamado AAVS1, localizado en el cromosoma 19 (19q13.3-cuarto).

20 Por lo tanto, ha surgido con interés considerable el AAV como un vector potencial para la terapia génica humana. Entre las propiedades favorables de los virus están su carencia de asociación con cualquier enfermedad humana, su capacidad para infectar tanto células en división como en no división y el amplio rango de líneas celulares derivadas de diferentes tejidos que se pueden infectar.

Entre los serotipos de AAV aislados de primates humanos y no humanos (NHP) y bien caracterizados, el serotipo 2 humano es el primer AAV que se desarrolló como un vector de transferencia de genes. Otros serotipos de AAV usados actualmente incluyen AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh74 y AAVdj, etc. Además, también pueden ser útiles variantes diseñadas no naturales y AAV quiméricos.

25 Los virus AAV se pueden diseñar usando técnicas de biología molecular convencionales que hacen posible optimizar estas partículas para la distribución celular específica de secuencias de ácido nucleico, para minimizar la inmunogenicidad, para modular la estabilidad y la vida media de la partícula, para la degradación eficaz, para la precisa distribución al núcleo.

30 Fragmentos AAV deseables para el ensamblaje dentro de vectores incluyen las proteínas cap, que incluyen las vp1, vp2, vp3 y regiones hipervariables, las proteínas rep, que incluyen rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40 y las secuencias que codifican estas proteínas. Estos fragmentos se pueden utilizar fácilmente en una variedad de sistemas de vectores y de células huésped.

35 Los vectores recombinantes basados en AAV carecen de la proteína Rep integrada con baja eficacia dentro del genoma del huésped y están principalmente presentes como episomas circulares estables que pueden persistir durante años en las células diana.

40 Alternativamente a usar serotipos de AAV naturales, se pueden usar serotipos de AAV artificiales en el contexto de la presente invención, que incluyen, sin limitación, AAV con proteína de la cápside no natural. Dicha cápside artificial se puede generar mediante cualquier técnica adecuada que usa una secuencia AAV seleccionada (p. ej., un fragmento de una proteína de cápside vp1) en combinación con secuencias heterólogas que se pueden obtener de un serotipo AAV seleccionado diferente, porciones no contiguas del mismo serotipo AAV, de una fuente viral no AAV o de una fuente no viral. Un serotipo AAV artificial puede ser, sin limitación, una cápside AAV quimérica, una cápside AAV recombinante o una cápside AAV “humanizada”.

45 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un vector AAV que comprende el constructo de ácido nucleico de la invención, que comprende una secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado. En el contexto de la presente invención, el vector AAV comprende una cápside de AAV capaz de transducir las células diana de interés, en particular los hepatocitos. De acuerdo con una realización particular, el vector AAV es del serotipo AAV-1, -2, -5, -6, -7, -8, -9, -rh10, -rh74, -dj, etc. En una realización particular adicional, el vector AAV es un vector pseudotipado, es decir, su genoma y cápside se derivan de AAV de diferentes serotipos. Por ejemplo, el vector AAV pseudotipado puede ser un vector cuyo genoma se deriva del serotipo AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, rh10, rh74 o dj y cuya cápside se deriva de otro serotipo. Por ejemplo, el genoma del vector pseudotipado se puede derivar del serotipo AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, rh10, rh74 o dj, y su cápside se deriva del serotipo AAV8 o AAV9, en particular del serotipo AAV8.

55 En otra realización, la cápside es una cápside modificada. En el contexto de la presente invención, una “cápside modificada” puede ser una cápside o cápside quimérica que comprende una o más proteínas VP de la cápside derivadas de una o más proteínas VP de la cápside de AAV de tipo salvaje.

- En una realización particular, el vector AAV es un vector quimérico, es decir, su cápside comprende proteínas VP de la cápside derivadas de al menos dos serotipos diferentes AAV o comprende al menos una proteína VP quimérica que combina regiones o dominios de proteína VP derivadas de al menos dos serotipos AAV. Ejemplos de tales vectores quiméricos AAV útiles para transducir células de hígado se describen en Shen *et al.*, Molecular Therapy, 2007 y en Tenney *et al.*, Virology, 2014. Por ejemplo, un vector quimérico AAV puede derivar de la combinación de una secuencia de cápside AAV8 con una secuencia del serotipo AAV1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, rh10, rh74 o dj. En otra realización, la cápside del vector AAV comprende una o más proteínas VP de la cápside variantes como las descritas en el documento WO2015013313, en particular las variantes de cápsides RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/ RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6 que presentan alto tropismo hepático.
- En otra realización, la cápside modificada se puede también derivar de modificaciones de la cápside insertadas por PCR propensa a error y/o inserción de péptidos (p. ej., como se describe en Bartel *et al.*, 2011). Además, las variantes de la cápside pueden incluir cambios de aminoácidos únicos como mutantes de tirosina (p. ej., como se describe en Zhong *et al.*, 2008).
- Además, el genoma del vector AAV puede ser un genoma de cadena sencilla o de doble cadena auto-complementario (McCarty *et al.*, Gene Therapy, 2003). Los vectores AAV de doble cadena auto-complementarios se generan suprimiendo el sitio terminal de resolución (trs) de una de las repeticiones terminales de AAV. Estos vectores modificados, cuyo genoma replicante tiene la mitad de la longitud del genoma de AAV de tipo salvaje, tienen la tendencia a empaquetar dímeros de ADN. En una realización preferida, el vector AAV implementado en la práctica de la presente invención tiene un genoma de cadena sencilla y además comprende preferiblemente una cápside AAV8, AAV2 o AAV5, más preferiblemente una cápside AAV8.
- Aparte de los sistemas de distribución específicos incorporados a continuación en los ejemplos, se conocen varios sistemas de distribución y se pueden usar para administrar el ácido nucleico de la invención, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos de administración del ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La secuencia de ácido nucleico de la invención, ya sea vectorizada o no, se puede administrar por cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el hígado del sujeto por cualquier ruta adecuada. Además, se puede usar ADN desnudo como minicírculos y transposones para la distribución de vectores lentivirales. Adicionalmente, se pueden usar tecnologías de edición de genes como nucleasas de dedo de zinc, meganucleasas, TALEN y CRISPR para distribuir la secuencia codificante de la invención.
- En una realización específica, sería deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención de manera local en el área que se necesita de tratamiento, es decir, el hígado. Esto se puede lograr, por ejemplo, por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas como membranas sialísticas o fibras.
- En otra realización, el ácido nucleico de la invención se puede distribuir en una vesícula, en particular un liposoma.
- En otra realización más, el ácido nucleico de la invención se puede distribuir en una sistema de liberación controlada.
- La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un constructo de ácido nucleico de la invención o el vector de la invención o la célula de la invención. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico (el constructo de ácido nucleico, vector o célula de la invención) y un transportador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o registrado en la Farmacopea de EE.UU. o Europea u otra farmacopea generalmente reconocida para usar en animales y seres humanos. El término “transportador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles como agua y aceites que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un transportador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa acuosa y glicerol también se pueden emplear como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.
- La composición, si se desea, también puede contener menores cantidades de agentes humectantes y de emulsión o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir transportadores estándar como productos de grado farmacéutico de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

Ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de transportador para proporcionar la forma para la administración adecuada al sujeto. En una realización particular, el ácido nucleico, vector o célula de la invención se formula en una composición que comprende solución salina tamponada con fosfato y suplementada con albúmina sérica humana al 0,25%. En otra realización particular, el ácido nucleico, vector o célula de la invención se formula en una composición que comprende lactato de Ringer y tensioactivo no iónico como plurónico F68 a una concentración final de 0,01-0,0001% como a una concentración de 0,001% en peso de la composición total. La composición puede comprender además albúmina sérica, en particular albúmina sérica humana como albúmina sérica humana al 0,25%. Se conocen en la técnica otras formulaciones adecuadas para ya sea almacenamiento o administración, en particular del documento WO 2005/118792 o *Allay et al.*, 2011.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

Se puede determinar la cantidad del agente terapéutico (es decir, un constructo de ácido nucleico, vector o célula) de la invención que será eficaz en el tratamiento del síndrome CN mediante técnicas clínicas estándar. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vivo* y/o *in vitro* para ayudar a predecir los intervalos de dosificación óptima. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración y de la gravedad de la enfermedad y se debería decidir de acuerdo con el juicio médico y de cada una de las circunstancias del paciente. La dosificación del constructo de ácido nucleico, el vector o de la célula administrada al sujeto que lo necesita variará en base a varios factores, que incluyen, sin limitación, la ruta de administración, la enfermedad específica tratada, la edad del sujeto o el nivel de expresión necesario para requerir el efecto terapéutico. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar en base a su conocimiento en este campo, el intervalo de dosificación requerido en base a estos factores y otros. En el caso de un tratamiento que comprende administrar un vector viral, como un vector AAV, al sujeto, las dosis típicas del vector son de al menos  $1 \times 10^8$  genomas de vector por kilogramo de peso corporal (vg/kg), como al menos  $1 \times 10^9$  vg/kg, al menos  $1 \times 10^{10}$  vg/kg, al menos  $1 \times 10^{11}$  vg/kg, al menos  $1 \times 10^{12}$  vg/kg, al menos  $1 \times 10^{13}$  vg/kg o al menos  $1 \times 10^{14}$  vg/kg.

### 30 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 incluye gráficos que muestran los niveles de ARN mensajero observados en células Huh-7 transfectadas con plásmido que expresa secuencias UGT1A1 de tipo salvaje o dos UGT1A1 con codón optimizado (panel A) y la cuantificación mediante transferencia de Western de la proteína UGT1A1 en las mismas muestras (panel B).

La Figura 2 incluye gráficos que muestran el efecto de la optimización de diferentes intrones en la expresión de luciferasa (panel A) y el efecto de la optimización de HBB2 sobre el ARN y el nivel de expresión de proteína de UGT1A1 (panel B).

La Figura 3 es una fotografía de un gel de transferencia de western que muestra la expresión de la proteína UGT1A1 de dos vectores que contienen una secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado y que contiene ya sea el intrón HBB2 de tipo salvaje (UGT1A1 2.0) o uno optimizado (UGT1A1 2.1).

La Figura 4 es una representación esquemática del análisis *in silico* de marco de lectura alternativo (ARF) dentro de los vectores UGT1A1 de tipo salvaje (A) y UGT1A1 v2.1 con codón optimizado (B).

La Figura 5 es un gráfico que muestra los niveles de bilirrubina total (TB) medidos cada semana después de la inyección de un vector UGT1A1 con codón optimizado o de PBS en diferentes cepas de rata.

La Figura 6 es un gráfico que muestra los niveles de bilirrubina total (TB) medidos cada semana después de la inyección de una dosis baja de un vector UGT1A1 con codón optimizado (en comparación con los datos informados en la figura 5) o de PBS en diferentes cepas de rata.

La Figura 7 incluye (A) un gráfico que muestra los niveles de bilirrubina total (TB) medidos cada semana después de la inyección de los tres vectores UGT1A1 (en comparación con los datos informados en la figura 8); (B) una fotografía de una transferencia de western de extractos de hígado obtenidos de ratas tratadas con los tres vectores y sus cuantificaciones relativas; y (C) un gráfico que presenta la evaluación a largo plazo de la eficacia de UGT1A1 de AAV8-v2.1 cuatro meses después de la inyección tanto en animales macho como hembra.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la capacidad de diferentes constructos para corregir la hiperbilirrubinemia grave (Bilirrubina Total expresada como mg/dl) en el modelo de ratón del síndrome de Crigler-Najjar. Se informan los animales sin tratar (UNTR).

Intervalos: se pueden presentar varios aspectos de la invención en un formato de intervalo a lo largo de la descripción. Se debe entender que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no se debe interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, en la descripción de un intervalo se debe considerar que se han descrito específicamente todos los posibles sub-intervalos así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo como de 1 a 6 se debe considerar que tiene específicamente descritos sub-intervalos como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica sin importar la amplitud del intervalo.

5 La descripción de todas y cada una de las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en esta memoria se incorporan por la presente en esta memoria por referencia en su totalidad.

Sin descripción adicional, se cree que un experto en la técnica puede, usando la descripción anterior y los ejemplos ilustrativos a continuación, hacer y utilizar los compuestos de la presente invención y practicar los métodos reivindicados.

### Ejemplos

15 La invención se describe además en detalle por referencia a los ejemplos experimentales a continuación y las figuras adjuntas. Estos ejemplos se proporcionan solamente con fines de ilustración y no están destinados a ser limitantes.

### Materiales y Métodos

Optimización de codón y vector constructo AAV:

20 El UGT1A1 se sometió a optimización de codón de acuerdo con diferentes algoritmos. Adicionalmente, se implementó la eliminación de sitios de inicio de la transcripción crípticos a lo largo del constructo. Los constructos resultantes se introdujeron en plásmidos de expresión o se empaquetaron en vectores AAV de serotipo 8 y se probaron *in vitro* e *in vivo* (ratas y ratones) para potencia.

Las siguientes abreviaturas se usan a lo largo de esta parte experimental para estos constructos:

- WT.0: transgen UGT1A1 de tipo salvaje y el intrón HBB2 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 5);
- 25 - WT: transgen UGT1A1 de tipo salvaje y la versión optimizada del intrón HBB2 con algunos ARF eliminados (SEQ ID N°: 6);
- v2 (o v2.0): comprende el transgen UGT1A1 con codón optimizado versión 2.0 (SEQ ID N°: 2) y el intrón HBB2 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 5);
- 30 - v2.1: comprende el transgen UGT1A1 con codón optimizado versión 2.0 (SEQ ID N°: 2) y una versión optimizada del intrón HBB2 con algunos ARF eliminados (SEQ ID N°: 6);
- v3: comprende el transgen UGT1A1 con codón optimizado versión 3 (SEQ ID N°: 3) con una versión optimizada del intrón HBB2 con algunos ARF eliminados (SEQ ID N°: 6).
- AAV8-hAAT-wtUGT1A1: vector AAV8 que contiene el constructo WT bajo el control de un promotor hAAT del transgen UGT1A1 de tipo salvaje;
- 35 - AAV8-hAAT-coUGT1A1v2: vector AAV8 que contiene el constructo v2 bajo el control de un promotor hAAT;
- AAV8-hAAT-coUGT1A1v2.1: vector AAV8 que contiene el constructo v2.1 bajo el control de un promotor hAAT;
- AAV8-hAAT-coUGT1A1v3: vector AAV8 que contiene el constructo v3 bajo el control de un promotor hAAT de tipo salvaje.

Ensayo *in vitro*:

40 Se transdujo la línea celular de hepatocitos humana Huh7 a multiplicidades crecientes de infección (MOI) de 0, 5.000 (5), 10.000 (10) o 25.000 (25) o se transfectaron con los vectores plasmídicos indicados y lipofectamina. Después de cuarenta y ocho horas de transducción se recogieron las células, se lisaron y se prepararon extractos microsomaes y se cargaron en un western Blot, donde se usó un anticuerpo policlonal frente a UGT1 humana para detectar la proteína. Se usó como control de carga la proteína calnexina de expresión constitutiva.

45 Se ha usado para la extracción de ARNm con trizol una porción de células usadas para la preparación microsomal. Se ha tratado el ARNm extraído con ADNasa, se retrotranscribió y se analizó mediante RT-PCR con cebadores de oligonucleótidos específicos para la secuencia UGT1A1. Se han usado para la normalización cebadores de oligonucleótidos específicos para la fosfatasa alcalina humana.

*Análisis in silico:*

5 El análisis de marco de lectura alternativo (ARF) se ha realizado en la cadena que codifica las dos secuencias UGT1A1 con la herramienta de análisis ORF presente en el paquete informático VectorNTI (Life Technologies). Se utilizaron sitios de inicio y de terminación clásicos para las células eucarióticas (ATG como sitio de inicio y TAA TGA TAG como sitios de terminación, respectivamente). Se consideraron los ARF cuando sus longitudes se extienden sobre 50 pb y tienen un codón de terminación en marco con el de inicio.

Animales:

10 Se inyectaron con vectores ratas Gunn, que presentan una deficiencia en el gen UGT1A1, a una edad de 6-8 semanas. Los vectores se distribuyeron a través de la vena de la cola en un volumen de 0,5 ml. Se recogieron muestras de suero semanalmente para monitorizar los niveles de bilirrubina total (TB). Se usaron como controles animales afectos no tratados y de tipo salvaje y compañeros de camada sanos.

15 Se han generado previamente ratones mutantes *Ugt1* en origen C57B1/6 (Bortolussi *et al.*, 2012). Se usaron como control compañeros de camada WT. Se hospedaron y manejaron ratones de acuerdo con la normativa institucional y procedimientos aprobados por el Comité Ético local y las autoridades reguladoras relevantes con pleno respeto con la Directiva de la UE 2010/63/UE para experimentación animal. La mutación genética en el gen *Ugt1a* se transfirió a la cepa de ratón FVB/NJ. Los animales usados en este estudio fueron al menos un 99,8% de ratones C57B1/6 o de origen genético FVB/NJ, obtenidos después de más de 9 cruzamientos con ratones C57B1/6 y FVB/NJ, respectivamente. Los ratones se mantuvieron en un entorno de temperatura controlada con ciclo de 12/12 horas de luz-oscuridad. Recibieron dieta estándar de comida y agua a demanda. Se inyectaron vectores por vía intraperitoneal  
20 en el día 2 (P2) después del nacimiento y se ensayaron los niveles de bilirrubina 4 semanas después de la inyección del vector.

Dosis de AAV:

Las dosis de vector administradas se indicaron en las leyendas de las figuras.

Preparación de suero para las ratas:

25 Se recogieron muestras de suero semanalmente mediante punción en el seno retro-orbital, en jeringas secas. Se centrifugó la sangre a 8.000 rpm a 4°C, se alicuotó y se congeló a -20°C.

Preparación de plasma para los ratones:

30 Se recogieron muestras de sangre a las 4 semanas después de la inyección en compañeros de camada mutantes y WT mediante punción cardiaca en jeringas de recogida con EDTA. Se centrifugó la sangre a 2.500 rpm, se recogió el plasma, se alicuotó y se congeló a -80°C. Todos los procedimientos se realizaron en luz dim para evitar la degradación de la bilirrubina

Determinación de bilirrubina para ratas:

35 La determinación de la bilirrubina total en suero se realizó usando el Kit de Ensayo de Bilirrubina (Abnova, ref. KA1614), como se describe por los fabricantes. Se usó un volumen de 50 µl de suero para realizar el análisis. Se obtuvieron los valores de absorbancia a 530 nm usando un lector multiplaca (PerkinElmer EnSpire).

Determinación de bilirrubina para ratones:

40 La determinación de la bilirrubina total en plasma se realizó usando el Kit de Reactivo para Bilirrubina Directa y Total (BQ Kits, San Diego, CA), como se describe por los fabricantes con modificaciones menores: la reacción se re-escaló hacia abajo y se realizó en un volumen final de 300 µl (en lugar de 6.000 µl) con solamente 10 µl de plasma. Se incluyeron tres estándares de referencia de bilirrubina comerciales (Suero Control I, Suero Control II y Calibrador de Bilirrubina, Diazyme Laboratories, Poway, CA, EE.UU.) en cada grupo de análisis como control de calidad. Se obtuvieron valores de absorbancia a 560 nm usando un lector multiplaca (Perkin Elmer Envision Plate Reader, Waltham, MA, EE.UU.).

Transferencia de Western en extractos de hígado:

45 Se ha homogeneizado el hígado congelado obtenido de los animales inyectados con cualquiera de los tres vectores. Los homogeneizados se han usado para la preparación de microsomas. Los extractos microsomales se cargaron luego en una transferencia de western donde se usó un anticuerpo policlonal frente a UGT1 humana para detectar la proteína. Se cuantificaron las bandas de proteína.

## Resultados

Se produjeron las versiones con codón optimizado de la secuencia codificante de UGT1A1 humano y se introdujeron en un plásmido de expresión. Las dos secuencias codificantes de UGT1A1 optimizadas (secuencias v2 y v3) y la secuencia de tipo salvaje se han transfectado en células Huh-7. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 1. Este experimento muestra que las dos secuencias con codón optimizado se traducen más eficazmente que la secuencia de tipo salvaje en células humanas *in vitro*.

En la figura 2 panel A se muestran los niveles de luciferasa producidos en células Huh-7 mediante transfección con los plásmidos que expresan luciferasa bajo en control transcripcional del promotor hAAT. Se han clonado diferentes secuencias intrónicas en el extremo 5' de la secuencia codificante de la luciferasa. Dos de ellos, llamados intrones HBB2 y FIX, se optimizaron mediante eliminación de los ARF en la secuencia generada reemplazando un nucleótido en los codones ATG identificados en la secuencia de tipo salvaje de dichos intrones. La expresión del constructo optimizado en una línea celular hepática indica que la eliminación de los ARF de las secuencias intrónicas aumentó la expresión de la luciferasa *in vitro* en ambos casos, siendo particularmente potente con el intrón HBB2 optimizado. En el panel B se compararon los dos plásmidos, ambos expresando UGT1A1 bajo en control transcripcional del promotor hAAT. V2.0 contiene el intrón HBB2 de tipo salvaje mientras que el v2.1 contiene la versión optimizada. Los datos muestran que el plásmido v2.1 expresa un 50% más de UGT1A1 que el v2.0 sin ningún aumento en los niveles de ARNm.

Los vectores AAV8 de UGT1A1 con codón optimizado versión 2.0 y 2.1 (UGT1A1 2.0 y UGT1A1 2.1, respectivamente) se probaron *in vitro*. Los vectores UGT1A1 2.0 y UGT1A1 2.1 difieren solamente por el hecho de que contienen el intrón HBB2 de tipo salvaje (SEQ ID N°: 5) o un intrón HBB2 modificado donde se han eliminado los ARF (SEQ ID N°: 6), respectivamente. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 3. Este experimento muestra que la versión 2.1 del vector UGT1A1 con codón optimizado es más potente que la versión 2.0 en células humanas *in vitro*.

La figura 4 muestra el resultado del análisis *in silico* del marco de lectura alternativo (ARF) dentro de los vectores UGT1A1 de tipo salvaje (A) y el UGT1A1v2.1 con codón optimizado (B). El vector v2.1 tiene solamente un número limitado de ARF en comparación con la secuencia de tipo salvaje y mayormente en la orientación inversa con respecto al promotor. Además, se puede ver en la figura 4 que el ARF9 y 10 que están normalmente presentes en el intrón HBB2 (usado en el constructo UGT1A1 de tipo salvaje representado en A) se han eliminado del intrón HBB2 modificado de la SEQ ID N°: 6 introducido en el vector optimizado UGT1A1v2.1.

Después, se administró el vector AAV8-hAAT-coUGT1A1v2.1 con codón optimizado a una dosis de  $5 \times 10^{12}$  vg/kg. Se realizó la inyección del vector en la vena de la cola en ratas Gunn homocigotas de 6 semanas de edad (UGT1A1 -/-). En el gráfico de la figura 5 se muestran los niveles de bilirrubina total (TB) medidos cada semana después de las inyecciones y en ratas Gunn de tipo salvaje inyectadas con PBS (WT, línea gris), heterocigotas (UGT1A1 +/-, línea punteada) y homocigotas (línea negra). Todos los datos se expresan como media  $\pm$  SE. La inyección del vector con codón optimizado dio como resultado la corrección completa del fenotipo de la enfermedad.

El vector AAV8-hAAT-UGT1A1v2.1 también se administró a una dosis de  $5 \times 10^{11}$  vg/kg. El vector se administró mediante inyección en la vena de la cola en ratas Gunn homocigotas de 6 semanas de edad (UGT1A1 -/-). En el gráfico de la figura 6 se muestran los niveles de bilirrubina total (TB) medidos cada semana después de las inyecciones y en ratas Gunn de tipo salvaje inyectadas con PBS (WT, línea gris), heterocigotas (UGT1A1 +/-, línea punteada) y homocigotas (línea negra). Todos los datos se expresan como media  $\pm$  SE. La inyección del vector con codón optimizado dio como resultado la corrección completa del fenotipo de la enfermedad.

Los dos vectores con codón optimizado (v2.1 y v3) y el de tipo salvaje AAV8-hAAT-UGT1A1 se administraron adicionalmente a una dosis de  $5 \times 10^{11}$  vg/kg. La inyección en la vena de la cola se ha realizado en ratas Gunn homocigotas de 6 semanas de edad (UGT1A1 -/-). En el gráfico de la figura 7A se muestran los niveles de bilirrubina total (TB) medidos cada semana después de las inyecciones. Todos los datos se expresan como media  $\pm$  SE. Como se muestra en la figura 7 panel A, la inyección de los tres vectores dio como resultado una corrección completa del fenotipo de la enfermedad. Dos meses después de la inyección, se sacrificaron los animales y se cuantificó el nivel de proteína UGT1A1 mediante transferencia de western con un anticuerpo específico para la proteína UGT1A1. La cuantificación de las bandas mostró un aumento en la cantidad de proteína UGT1A1 en ratas tratadas con AAV8-hAAT-coUGT1A1v2.1 incluso si la diferencia no es significativa debido a la alta variabilidad de los niveles de expresión observados en los diferentes animales.

Se ha evaluado la eficacia a largo plazo en ratas Gunn de dos meses de edad inyectadas con  $5 \times 10^{12}$  vg/kg de vector AAV8-v2.1 UGT1A1. Cuatro meses después de la inyección el nivel de bilirrubina promedio en sangre es de 1,75 mg/dl (nivel inicial a D0: 7,49, reducción del 77%) en ratas macho y 0,85 mg/dl (nivel inicial a D0: 6,15 mg/dl, reducción del 86%) en ratas hembra. Este resultado, que indica una corrección a largo plazo del fenotipo, es particularmente sorprendente en comparación con un estudio previo de Pastore *et al.*, que informa de una reducción en ratas hembra de solamente el 50% de los niveles de línea de base de bilirrubina usando un constructo diferente. Tomados en conjunto, los datos mostrados indican que el proceso inventivo aplicado a AAV8-hAAT-coUGT1A1v2.1 dio como resultado un vector con una mejor eficacia *in vivo* en comparación con otros vectores desarrollados para curar CN.

También se probó la eficacia de corrección de la bilirrubina total en el modelo de ratón del síndrome de Crigler-Najjar. La figura 8 es un gráfico que muestra los niveles de Bilirrubina Total (TB) a 1 mes después de la inyección. Los animales se inyectaron en el día 2 después del nacimiento (P2) con una dosis de  $3E10$  vg/ratón.

Se usaron como controles los animales afectos no tratados mantenidos vivos con 15 días de fototerapia (UNTR (PT)).

- 5 Este experimento muestra que el vector de versión 2.1 da el nivel más alto de corrección de TB de todos los vectores. Todos los datos se expresan como media  $\pm$  SD. Cada punto representa un único animal.

#### Referencias

- Allay *et al.*, Hum Gene Ther. 2011 May; 22(5): 595-604.
- Bartel *et al.*, Front Microbiol. 2011 Oct 4; 2: 204
- 10 Bortolussi *et al.*, FASEB J. 2012 Mar; 26(3): 1052-63
- McCarty *et al.*, Gene Ther. 2003 Dec; 10(26): 2112-8
- Pastore *et al.*, Mol Ther. 2013 May; Vol. 21; suplemento 1; S192-3 (Abstract Nº. 499)
- Seppen *et al.*, Mol Ther. 2006 Jun; 13(6): 1085-92
- Shen *et al.*, Mol Ther. 2007 Nov; 15(11): 1955-62
- 15 Tenney *et al.*, Virology. 2014 Apr; 454-455: 227-36
- Zhong *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Jun 3; 105(22): 7827-32

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> GENETHON <i>et al.</i>	
	<120> TRATAMIENTO DE LA HIPERBILIRRUBINEMIA	
5	<130> B1801PC00	
	<160> 11	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 1602	
15	<212> ADN	
	<213> homo sapiens	
	<400> 1	
	atggctgtgg agtcccaggg cggacgcca cttgtcctgg gcctgctgct gtgtgtgctg	60
	ggcccagtggt tgtcccatgc tgggaagata ctgttgatcc cagtggatgg cagccactgg	120
	ctgagcatgc ttggggccat ccagcagctg cagcagaggg gacatgaaat agttgtccta	180
	gcacctgacg cctcgttgta catcagagac ggagcatttt acacctgaa gacgtaccct	240
	gtgccattcc aaagggagga tgtgaaagag tcttttgta gtctcgggca taatgttttt	300
	gagaatgatt ctttcctgca gcgtgtgatc aaaacataca agaaaataaa aaaggactct	360
	gctatgcttt tgtctggctg ttcccactta ctgcacaaca aggagctcat ggcctccctg	420
	gcagaaagca gctttgatgt catgctgacg gaccctttcc ttccctgcag ccccatcgtg	480
	gcccagtagc tgtctctgcc cactgtattc ttcttgcatg cactgcatg cagcctggaa	540
	tttgaggcta cccagtgccc caaccattc tcctacgtgc ccaggcctct ctcctctcat	600
	tcagatcaca tgaccttccg gcagcgggtg aagaacatgc tcattgcctt ttcacagaac	660
	tttctgtgag acgtggttta ttccccgtat gcaacccttg cctcagaatt ccttcagaga	720
	gaggtgactg tccaggacct attgagctct gcatctgtct ggctgtttag aagtgacttt	780
	gtgaaggatt accctaggcc catcatgccc aataggttt ttgttggtgg aatcaactgc	840
	cttcacaaa atccactatc ccaggaattt gaagcctaca ttaatgcttc tggagaacat	900
	ggaattgtgg ttttctcttt gggatcaatg gtctcagaaa ttccagagaa gaaagctatg	960
	gcaattgctg atgctttggg caaaatccct cagacagtcc tgtggcggta cactggaacc	1020
	cgaccatcga atcttgcgaa caacacgata cttgttaagt ggctaccca aaacgatctg	1080
	cttggtcacc cgatgacccg tgcctttatc acccatgctg gttcccatgg tgtttatgaa	1140
	agcatatgca atggcgttcc catggtgatg atgcccttgt ttggtgatca gatggacaat	1200
	gcaaagcgca tggagactaa gggagctgga gtgaccctga atgttctgga aatgacttct	1260
	gaagatttag aaaatgctct aaaagcagtc atcaatgaca aaagttacaa ggagaacatc	1320
20	atgcgcctct ccagccttca caaggaccgc ccggtggagc cgctggacct ggccgtgttc	1380

ES 2 744 565 T3

tgggtggagt ttgtgatgag gcacaagggc gcgccacacc tgcgccccgc agcccacgac 1440  
 ctcacctggt accagtagca ttccttggac gtgattggtt tcctcttggc cgtcgtgctg 1500  
 acagtggcct tcatcacctt taaatggtgt gcttatggct accggaaatg cttggggaaa 1560  
 aaagggcgag ttaagaaagc ccacaaatcc aagaccatt ga 1602  
 <210> 2  
 5 <211> 1602  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> UGT1A1 v2.1 optimizada  
 <400> 2  
 atggctgtgg aatcacaagg aggtagacca ctggttctcg gacttttgct ttgctgctg 60  
 gggcccgtgg tgcgcatgc cggaaagatc ctgctgatcc cggtgatgg atcacactgg 120  
 ctgtccatgc tgggtgcat ccaacagctc cagcagcggg gccacgaaat tgtggtcctg 180  
 gccccggacg cttccctgta tattcgggac ggagcgttct aactctcaa gacctacct 240  
 gtccccttcc aaagggagga cgtgaaggaa agctttgtgt cgctggggca taatgtgttc 300  
 gagaacgaca gcttctcca aagggttatt aaaacctaca agaagatcaa aaaggattcg 360  
 gccatgctcc tttccggatg ttcacacctg ttgcataaca aggaattgat ggccagcctg 420  
 gcagaatcca gctttgacgt catgcttact gaccggttct tgccttgctc cccgattgtg 480  
 gcccaatacc tgcgctccc aaccgtgttc ttcctgcacg ccttgccttg ttcgctggaa 540  
 ttcgaagcga ctcagtgtcc caatccgttc tcctacgtcc cgcgcccgtc tcaagccat 600  
 tcggatcaca tgactttcct ccagcgcgtc aagaacatgc tcattgcgtt cagccagaac 660  
 tttctgtgcg acgtggttta ctcaccttac gctaccttgg cttctgagtt cctgcagaga 720  
 gaagtgactg tgcaagatct gctgtcctca gcgtccggtt ggttgttccg gtctgacttc 780  
 gtcaaggact acccgcgccc gatcatgccg aatatggtct ttgtgggagg tatcaactgc 840  
 ctgcatcaaa acccactgag ccaggagttt gaggcgtaca tcaacgcctc gggagagcat 900  
 ggaatcgtgg tgttctccct cggttccatg gtgtccgaga tcccggaaaa gaaggcaatg 960  
 gccatcgcag atgccctggg caaaatcccg cagaccgtgc tctggcgcta cacgggtact 1020  
 cggcctagca atttggcaaa caacaccatc ctggtgaaat ggctgccgca gaacgacctc 1080  
 ctgggccacc caatgactcg cgctttcatt acccatgagg gctcgcacgg agtctacgaa 1140  
 tccatctgca atggagtccc gatggtgatg atgccacttt tcggagatca gatggataat 1200  
 gcaaaaagaa tggaaaccaa gggggccgga gtgacgctga acgtgcttga aatgacctcg 1260  
 15 gaagatctgg agaacgctct caaagcggtg atcaacgaca agtcctacaa ggaaaacatc 1320

ES 2 744 565 T3

	atgcgcctga gctccctcca caaggaccga ccagtggaac cgctggacct cgcggtcttt	1380
	tgggtggagt tcgtgatgag gcacaagggc gccccccacc tcagaccgcg agctcatgac	1440
	ctcacttggg accagtacca ttcgctggat gtcacggct ttctcctggc ggtcgtgctc	1500
	accgtggcgt tcatcacctt caagtgctgc gcctacggat atcgcaaatg cttggggaag	1560
	aaaggacggg tgaagaaggc acacaagtca aagacgcact ga	1602
	<210> 3	
5	<211> 1602	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> UGT1A1 v3 optimizada	
	<400> 3	
	atggccgtgg aatctcaggg cggcagacct ctggtgctgg gcctgctgct gtgtgtgctg	60
	ggacctgtgg tgtctcagcg cggcaagatc ctgctgatcc ccgtggatgg cagccactgg	120
	ctgtctatgc tgggcgcat tcagcagctg cagcagaggg gccacgagat cgtggtgctg	180
	gcccctgatg ccagcctgta catcagagat ggcgccttct acaccctgaa aacctacccc	240
	gtgcccttcc agcgcgagga cgtgaaagaa agcttcgtgt ccctgggcca caactgttc	300
	gagaacgaca gcttcctgca gagagtgatc aagacctaca agaagatcaa gaaagacagc	360
	gccatgctgc tgagcggctg ctcccatctg ctgcacaaca aagaactgat ggcctccctg	420
	gccgagagca gcttcgacgt gatgctgacc gaccattcc tgccctgcag ccctatcgtg	480
	gcccagtacc tgagcctgcc taccgtgttc ttctcgcag ccctgccttg ctccctggaa	540
	ttcgaggcca cccagtgcc caacccttc agctacgtgc ccagaccact gagcagccac	600
	agcgaccaca tgaccttctc gcagcgcgtg aagaacatgc tgatcgcctt cagccagaac	660
	ttcctgtgcg acgtggtgta cagcccctac gctaccctgg ccagcgaatt cctgcagcgg	720
	gaagtgaccg tgcaggacct gctgtctagc gccagcgtgt ggctgttccg cagcgacttc	780
	gtgaaggact accccagacc catcatgccc aacatggtgt tcgtgggcgg catcaactgc	840
	ctgcaccaga accccctgag ccaggaattt gaggcctaca tcaacgccag cggcgagcac	900
	ggcatcgtgg tgtttagcct gggcagcatg gtgtccgaga tccccgagaa aaaggccatg	960
	gctatcgccg acgccctggg aaagatcccc cagacagtgc tgtggcggta caccggcacc	1020
	agaccagca acctggccaa caacaccatc ctctgtaa at ggctgcccc aacgacctg	1080
	ctgggccacc ctatgacccg ggcctttatc acacagccg gctcccatgg cgtgtacgag	1140
	agcatctgca acggcgtgcc catggcatg atgccctgt tcggcgacca gatggacaac	1200
	gccaagcggg tggaaacaaa gggcgtggc gtgaccctga acgtgctgga aatgaccagc	1260
15	gaggacctgg aaaacgcctt gaaggccgtg atcaacgaca agagctaaa agaaaacatc	1320

ES 2 744 565 T3

	atgCGGctgt ccagcctgca caaggacaga cccgtggaac ccctggacct ggccgtgttc	1380
	tgggtggaat tcgtgatgcg gcacaagggc gctccccatc tgaggcctgc agctcacgac	1440
	ctgacctggg atcagtacca cagcctggac gtgatcggct tcctgctggc agtgggtgctg	1500
	accgtggcct tcatcacctt caagtgctgc gcctacggct accggaagtg cctgggcaag	1560
	aaaggcagag tgaagaaggc ccacaagagc aagaccact ga	1602
	<210> 4	
5	<211> 397	
	<212> ADN	
	<213> homo sapiens	
	<400> 4	
10	gatcttgcta ccagtggaac agccactaag gattctgcag tgagagcaga gggccagcta	60
	agtggacttc tcccagagac tgtctgactc acgccacccc ctccaccttg gacacaggac	120
	gctgtggttt ctgagccagg tacaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca	180
	ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcggcgcgact cagatcccag ccagtggact	240
	tagcccctgt ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct	300
	cccccgttgc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct	360
	cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtgaat	397
	<210> 5	
15	<211> 441	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
20	<223> intrón HBB2	
	<400> 5	
	gtacacatat tgaccaaatc agggtaattt tgcatttgta attttaaaaa atgctttctt	60
	cttttaatat acttttttgt ttatcttatt tctaataact tccctaactct ctttctttca	120
	gggcaataat gatacaatgt atcatgcctc tttgcacat tctaaagaat aacagtgata	180
	atctctgggt taaggcaata gcaatatttc tgcatataaa tatttctgca tataaattgt	240
	aactgatgta agaggtttca tattgctaag agcagctaca atccagctac cattctgctt	300
	ttattttatg gttgggataa ggctggatta ttctgagtcc aagctaggcc cttttgctaa	360
	tcattgtcat acctcttacc ttcctccac agctcctggg caacgtgctg gtctgtgtgc	420
25	tggcccatca ctttggcaaa g	441
	<210> 6	
	<211> 441	
30	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
35	<223> intrón HBB2 modificado	

ES 2 744 565 T3

<400> 6

gtacacatat	tgaccaaadc	agggtaattt	tgcattingta	atthtaaaaa	atgctttctt	60
ctthtaatat	actthttttgt	ttatcttatt	tctaataactt	tccctaactct	ctthctttca	120
gggcaataat	gatacaatgt	atcatgcctc	tttgacccat	tctaagaat	aacagtgata	180
atthctgggt	taaggcaata	gcaatatttc	tgcatataaa	tatthctgca	tataaattgt	240
aactgatgta	agaggtttca	tattgctaata	agcagctaca	atccagctac	cattctgctt	300
ttatthctg	gttgggataa	ggctggatta	ttctgagtcc	aagctaggcc	ctthtgctaa	360
tcttgttcat	acctcttacc	ttcctccac	agctcctggg	caacctgctg	gtctctctgc	420
tggcccatca	ctthggcaaa	g				441

5 <210> 7

<211> 1438  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10

<220>

<223> intrón FIX

15 <400> 7

ggtttgtttc	ctthtttaaa	atacattgag	tatgcttgcc	ttttagatat	agaaatatct	60
gatgctgtct	tcttcaactaa	atthtgatta	catgatttga	cagcaatatt	gaagagtcta	120
acagccagca	cgaggttgg	taagtactgg	ttctttgta	gctaggtttt	cttcttcttc	180
atthtaaaaa	ctaaatagat	cgacaatgct	tatgatgcat	ttatgtttaa	taaactgt	240
tcagttcatg	atthggctcat	gtaattcctg	ttagaaaaca	ttcatctcct	tggtttaaaa	300
aaattaaaag	tgggaaaaca	aagaaatagc	agaatatagt	gaaaaaaaaat	aaccacatta	360
ttthtgtttg	gacttaccac	tttgaaatca	aatgggaaa	caaagcaca	aacaatggcc	420
ttatthacac	aaaaagtctg	atthtaagat	atatgacatt	tcaaggtttc	agaagtatgt	480
aatgaggtgt	gtctctaatt	ttthaaatta	tatatcttca	atthaaagt	ttagttaaaa	540
cataaagatt	aacctttcat	tagcaagctg	ttagttatca	ccaacgcttt	tcatggatta	600
ggaaaaaatc	atthtgcttc	tatgtcaaac	atcttggagt	tgatatttgg	ggaaacacaa	660
tactcagttg	agtccctag	gggagaaaag	cacgcttaag	aattgacata	aagagtagga	720
agttagctaa	tgcaacatat	atcactttgt	ttthtcacaa	ctacagtgac	tttatgtatt	780
tcccagagga	aggcatacag	ggaagaaatt	atcccatttg	gacaaacagc	atgttctcac	840
aggaagcatt	tatcacactt	acttgtcaac	tttctagaat	caaatctagt	agctgacagt	900
accaggatca	ggggtgcaa	ccctaagcac	ccccagaaag	ctgactggcc	ctgtggttcc	960

ES 2 744 565 T3

cactccagac atgatgtcag ctgtgaaatc gacgtcgtg gaccataatt aggcttctgt 1020  
 tcttcaggag acatttggtc aaagtcattt gggcaacatc attctgaaaa cagcccagcc 1080  
 agggatgatg atcactttgc aaagatcctc aatgagctat tttcaagtga tgacaaagtg 1140  
 tgaagttaac cgctcatttg agaactttct ttttcatcca aagtaaattc aatatgatt 1200  
 agaaatctga ccttttatta ctggaattct cttgactaaa agtaaaattg aattttaatt 1260  
 cctaaatctc catgtgtata cagtactgtg ggaacatcac agattttggc tccatgccct 1320  
 aaagagaaat tggctttcag attatttga ttaaaaaaca agactttctt aagagatgta 1380  
 aaatttcat gatgtttct ttttggctaa aactaaagaa ttattctttt acatttca 1438

<210> 8

5 <211> 1438  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>

10 <223> FIX intrón modificado

<400> 8

ggtttgtttc cttttttaa atacattgag tatgcttgcc ttttagatat agaaatatct 60  
 gatgctgtct tcttactaa attttgatta catgatttga cagcaatatt gaagagtcta 120  
 acagccagca cgaggttg taagtactgg ttctttgta gctaggtttt cttcttcttc 180  
 attttataaa ctaaatagat cgacattgct tttgttgcatt ttatgtttaa taaacactgt 240  
 tcagttcatg atttggctcat gtaattcctg ttagaaaaca ttcattcctt tggtttaaaa 300  
 aaattaaaag tgggaaaaca aagaaatagc agaatatagt gaaaaaaaat aaccacatta 360  
 tttttgtttg gacttaccac tttgaaatca aattgggaaa caaaagcaca aacaatggcc 420  
 ttatttacac aaaaagtctg attttaagat atatgacatt tcaaggtttc agaagtatgt 480  
 aatgaggtgt gtctctaatt ttttaatta tatatcttca atttaaagt ttagttaaaa 540  
 cataaagatt aacctttcat tagcaagctg ttagttatca ccaacgcttt tcatggatta 600  
 ggaaaaaatc attttgtctc tttgtcaaac atcttggagt tgatatttgg ggaaacacaa 660  
 tactcagttg agttccctag gggagaaaag cacgcttaag aattgacata aagagtagga 720  
 agttagctat tgcaacatat atcactttgt ttttccaca ctacagtgac tttttgtatt 780  
 tcccagagga aggcatacag ggaagaaatt atcccatttg gacaaacagc ttgttctcac 840  
 aggaagcatt tatcacactt acttgtcaac tttctagaat caaatctagt agctgacagt 900  
 accaggatca ggggtgcaa ccctaagcac ccccagaaag ctgactggcc ctgtggttcc 960  
 cactccagac atgatgtcag ctgtgaaatc gacgtcgtg gaccataatt aggcttctgt 1020  
 tcttcaggag acatttggtc aaagtcattt gggcaacatc attctgaaaa cagcccagcc 1080  
 15 agggatgatg atcactttgc aaagatcctc aatgagctat tttcaagtgt tgacaaagtg 1140

ES 2 744 565 T3

	tgaagttaac cgctcatttg agaactttct ttttcatcca aagtaaattc aaatatgatt	1200
	agaaatctga ccttttatta ctggaattct cttgactaaa agtaaaattg aattttaatt	1260
	cctaaatctc catgtgtata cagtactgtg ggaacatcac agattttggc tccatgccct	1320
	aaagagaaat tggctttcag attatttggg ttaaaaacaa agactttctt aagagatgta	1380
	aaattttctt gttgttttct tttttgctaa aactaaagaa ttattctttt acatttca	1438
	<210> 9	
5	<211> 881	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> intrón de la beta-globina de pollo	
	<400> 9	
	gcgggagtcg ctgcgttgcc ttgcgcccgt gccccgctcc gccgcccct cgcgccgcc	60
	gccccggctc tgactgaccg cgttactccc acaggtgagc gggcgggacg gcccttctcc	120
	tccgggctgt aattagcgtc tggtttaatg acggcttgtt tcttttctgt ggctgcgtga	180
	aagccttgag gggctccggg agggcccttt gtgcgggggg agcggctcgg ggggtgcgtg	240
	cgtgtgtgtg tgcgtgggga gcgcccgtg cggctccgcg ctgcccggcg gctgtgagcg	300
	ctgcgggcgc gccgcggggc tttgtgcgct ccgcagtgtg cgcgagggga gcgcgcccg	360
	gggcggtgcc ccgcggtgcg ggggggctg cgaggggaac aaaggctgcg tgcggggtgt	420
	gtgcgtgggg gggtagcag ggggtgtggg cgcgtcggtc gggctgcaac cccccctgca	480
	ccccctccc cgagttgctg agcacggccc ggcttcgggt gcggggctcc gtacggggcg	540
	tggcgcgggg ctgcgctgc cgggcggggg gtggcggcag gtgggggtgc cgggcggggc	600
	ggggccgctc cgggccgggg agggctcggg ggaggggccc gcgggcccc ggagcgccgg	660
	cggctgtcga ggcgcccga gccgcagcca ttgcctttta tgtaatcgt gcgagagggc	720
	gcagggactt cctttgtccc aaatctgtgc ggagccgaaa tctgggaggc gccgccgcac	780
	cccctctagc gggcgcgggg cgaagcgtg cggcgccggc aggaaggaaa tgggcgggga	840
15	gggccttcgt gcgtcgccgc gccgcccgtc ccttctccct c	881
	<210> 10	
	<211> 881	
20	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<223> intrón de la beta-globina de pollo optimizado	
	<400> 10	
30	gcgggagtcg ctgcgttgcc ttgcgcccgt gccccgctcc gccgcccct cgcgccgcc	60

ES 2 744 565 T3

gccccggctc tgactgaccg cgttactccc acaggtgagc gggcgggacg gcccttctcc 120  
 tccgggctgt aattagcgcg tggtttaatg acggcttggt tcttttctgt ggctgcgtga 180  
 aagccttgag gggctccggg agggcccttt gtgcgggggg agcggctcgg ggggtgcgtg 240  
 cgtgtgtgtg tgcgtgggga gcgccgcgtg cggctccgcg ctgcccgcg gctgtgagcg 300  
 ctgcggggcg gccgcggggc tttgtgcgct ccgcagtgtg cgcgagggga gcgcggccgg 360  
 gggcgggtgc ccgcgggtgc gggggggctg cgaggggaac aaaggctgcg tgcgggggtg 420  
 gtgcgtgggg gggtagcag ggggtgtggg cgcgtcggtc gggctgcaac cccccctgca 480  
 cccccctccc cgagttgctg agcacggccc ggcttcgggt gcggggctcc gtacggggcg 540  
 tggcgcgggg ctgcgccgtc cgggcggggg gtggcggcag gtgggggtgc cgggcggggc 600  
 ggggccgcct cgggccgggg agggctcggg ggagggggcg gcgggcccc ggagcgcggg 660  
 cggctgtcga ggcgcggcga gccgcagcca ttgcctttt tgtaatcgt gcgagagggc 720  
 gcagggactt cctttgtccc aaatctgtgc ggagccgaaa tctgggaggc gccgccgcac 780  
 cccctctagc gggcgcgggg cgaagcggtg cggcgcgggc aggaaggaat tgggcgggga 840  
 gggccttctg gcgtgcgcgc gccgccgtcc ccttctccct c 881

<210> 11

- 5 <211> 322
- <212> ADN
- <213> artificial

<220>

- 10 <223> región control de ApoE

<400> 11

aaggctcaga ggcacacagg agtttctggg ctcaccctgc ccccttcaa cccctcagtt 60  
 cccatcctcc agcagctggt tgtgtgctgc ctctgaagtc cactactgaac aaacttcagc 120  
 ctactcatgt ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct 180  
 ccctgcctgc tgacctgga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac 240  
 ctccaacatc cactcgacct cttggaatth cggtgagag gagcagaggt tgtcctggcg 300  
 15 tggtttaggt agtgtgagag gg 322

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una secuencia de ácido nucleico que tiene una secuencia codificante UGT1A1 con codón optimizado, en donde la secuencia con codón optimizado tiene un aumento en el contenido GC y tiene un número disminuido de marcos de lectura abiertos alternativos en comparación con la secuencia codificante de tipo salvaje como se muestra en la SEQ ID N°: 1 en donde dicha secuencia de ácido nucleico comprende:
  - una secuencia de nucleótidos al menos un 97% idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID N°: 2,
  - o
  - la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID N°: 2.
- 10 2. Un constructo de ácido nucleico, que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, siendo dicho constructo un casete de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 ligada operativamente a un promotor.
3. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho promotor es un promotor específico de hígado.
- 15 4. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor de alfa-1 antitripsina (hAAT), el promotor de transtiretina, el promotor de la albúmina y el promotor de la globulina que une tiroxina (TBG).
5. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 2 a 4, que comprende además un intrón.
- 20 6. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho intrón se selecciona del grupo que consiste en un intrón de beta globina b2 humana (o HBB2), un intrón FIX y un intrón de la beta-globina de pollo.
7. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el intrón es un intrón modificado con ARF disminuidos o sin ARF, siendo en particular dicho intrón modificado un intrón HBB2 modificado, un intrón FIX modificado o un intrón de beta-globina de pollo modificado.
- 25 8. El constructo de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho intrón se selecciona del grupo que consiste en el intrón HBB2 modificado mostrado en la SEQ ID N°: 6, el intrón FIX modificado mostrado en la SEQ ID N°: 8 o el intrón de la beta-globina de pollo modificado mostrado en la SEQ ID N°: 10.
9. Un vector que comprende el constructo de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 2 a 8, siendo el vector un vector viral, en particular un vector retroviral, como un vector lentiviral, o un vector AAV.
- 30 10. El vector de acuerdo con la reivindicación 9 que es un vector AAV de cadena sencilla o de doble cadena auto-complementario, que tiene una cápside derivada de AAV seleccionada del grupo que consiste en una cápside AAV-1, -2, -5, -6, -7, -8, -9, -rh10, -rh74, -dj o que tiene una cápside quimérica.
11. El vector de acuerdo con la reivindicación 10, que es un vector AAV que tiene una cápside AAV8.
12. El vector de acuerdo con la reivindicación 11, que es un vector AAV pseudotipado.
- 35 13. Una célula aislada transformada con el constructo de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones de 2 a 8 o el vector de las reivindicaciones 9 a 12.
14. La célula aislada de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha célula es una célula de hígado o de músculo.
15. El constructo de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones de 2 a 8, el vector de una cualquiera de las reivindicaciones de 9 a 12 o la célula de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en un método para el tratamiento del síndrome de Crigler-Najjar tipo I o II o del síndrome de Gilbert.

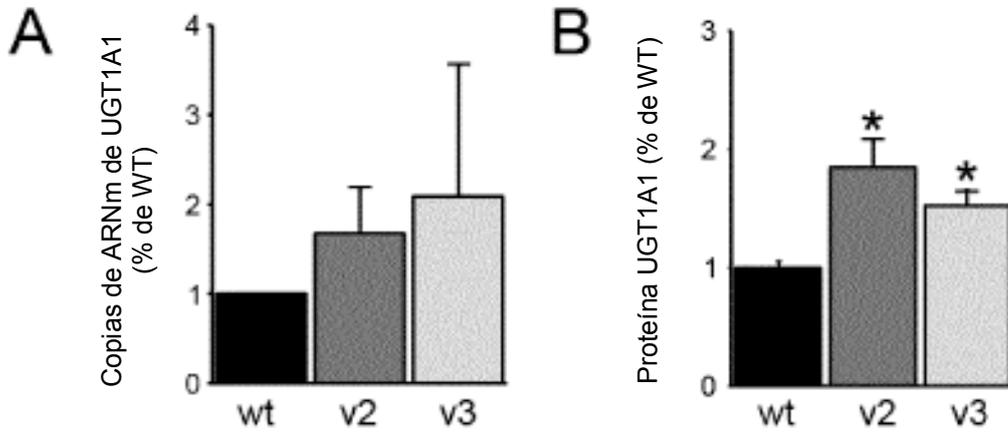


Figura 1

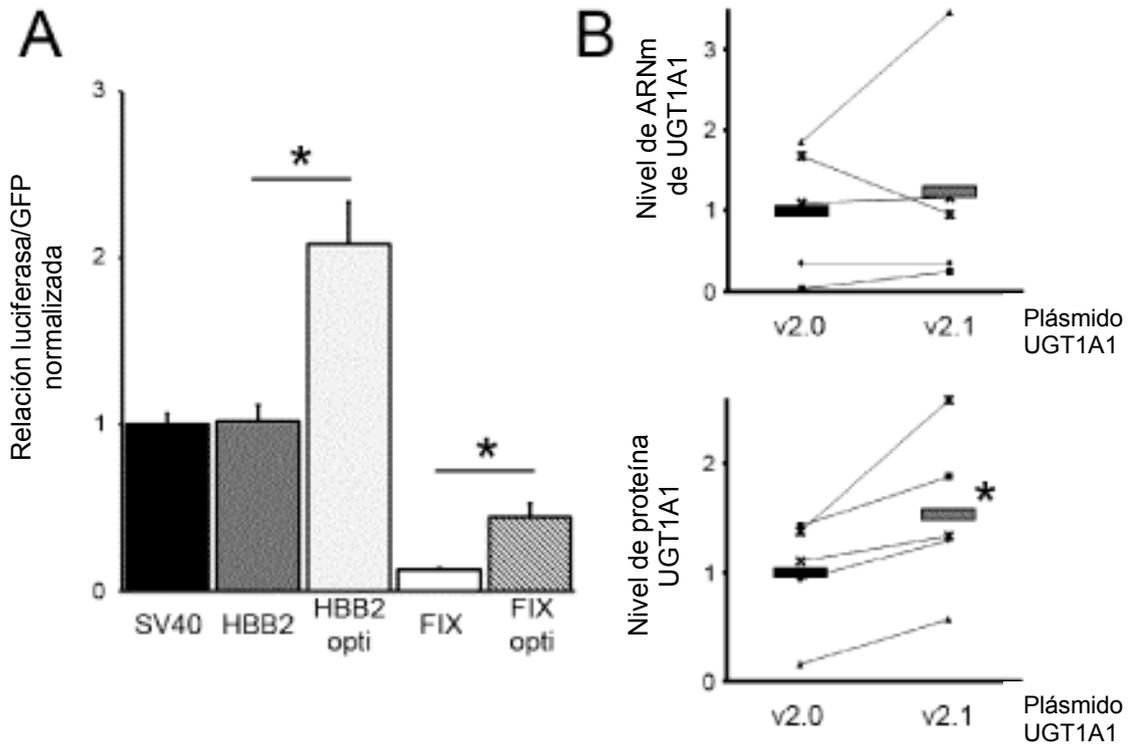


Figura 2

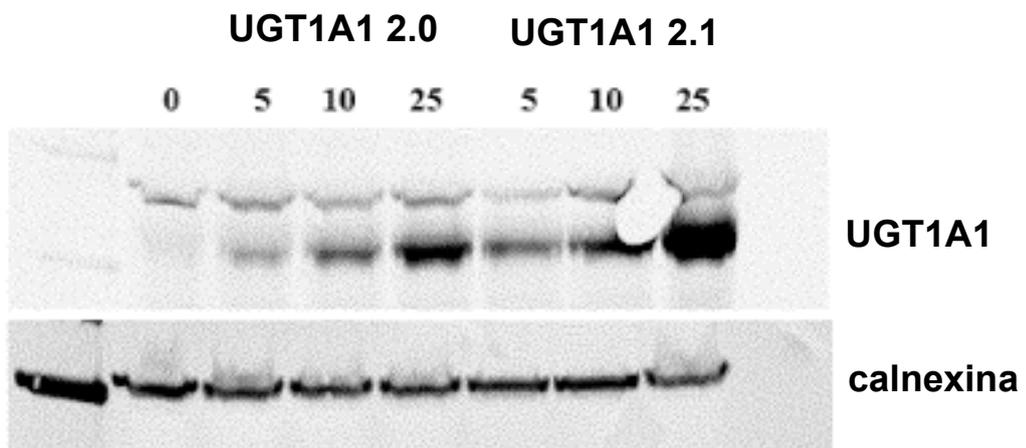
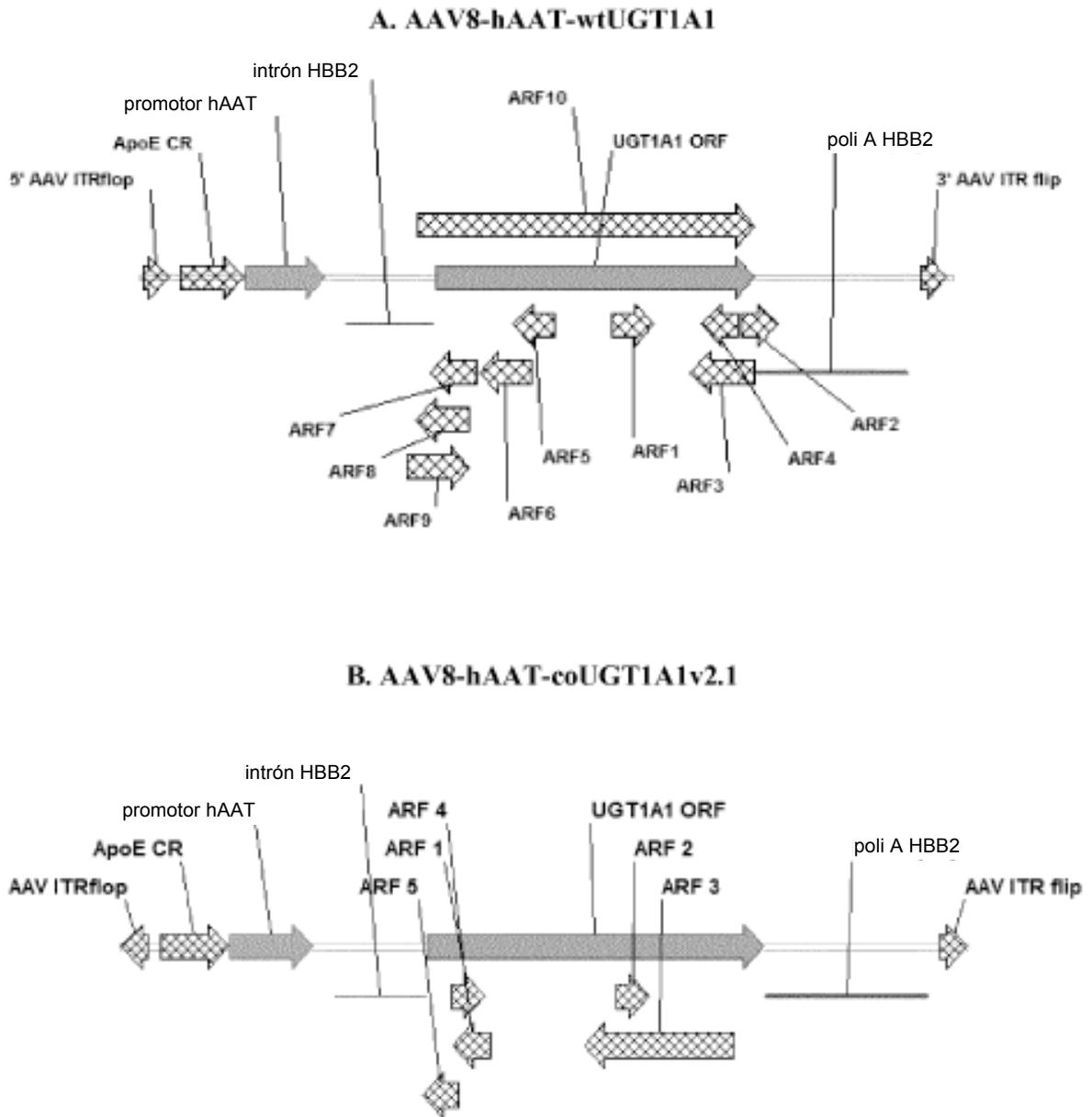


Figura 3



**Figura 4**

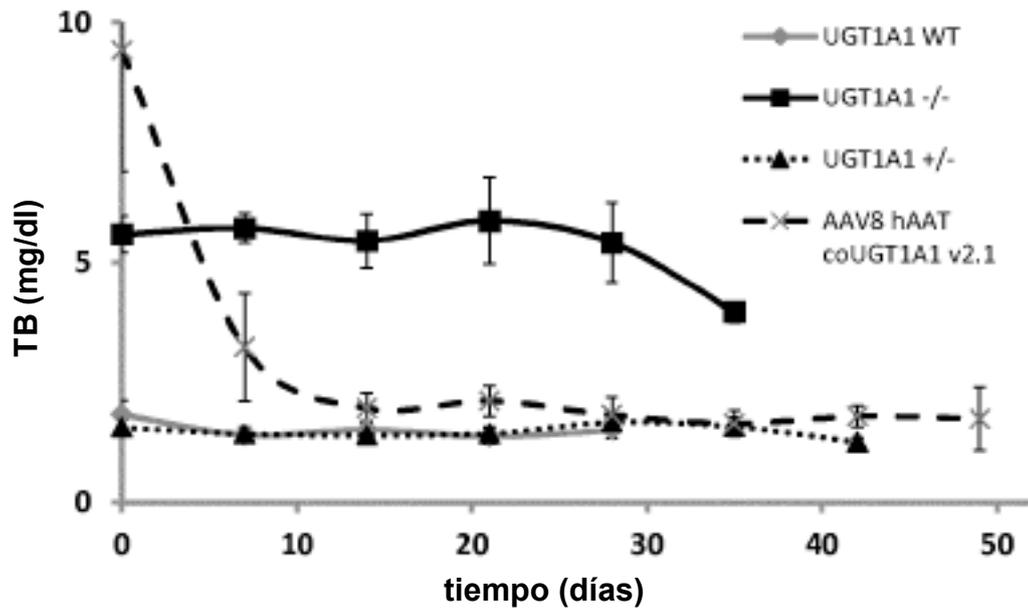


Figura 5

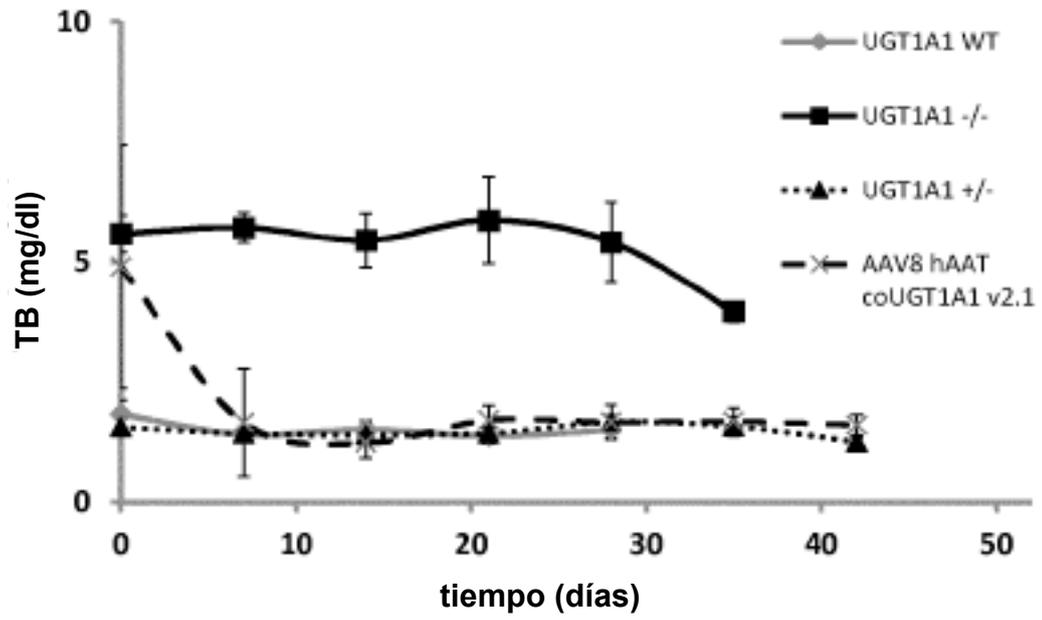


Figura 6

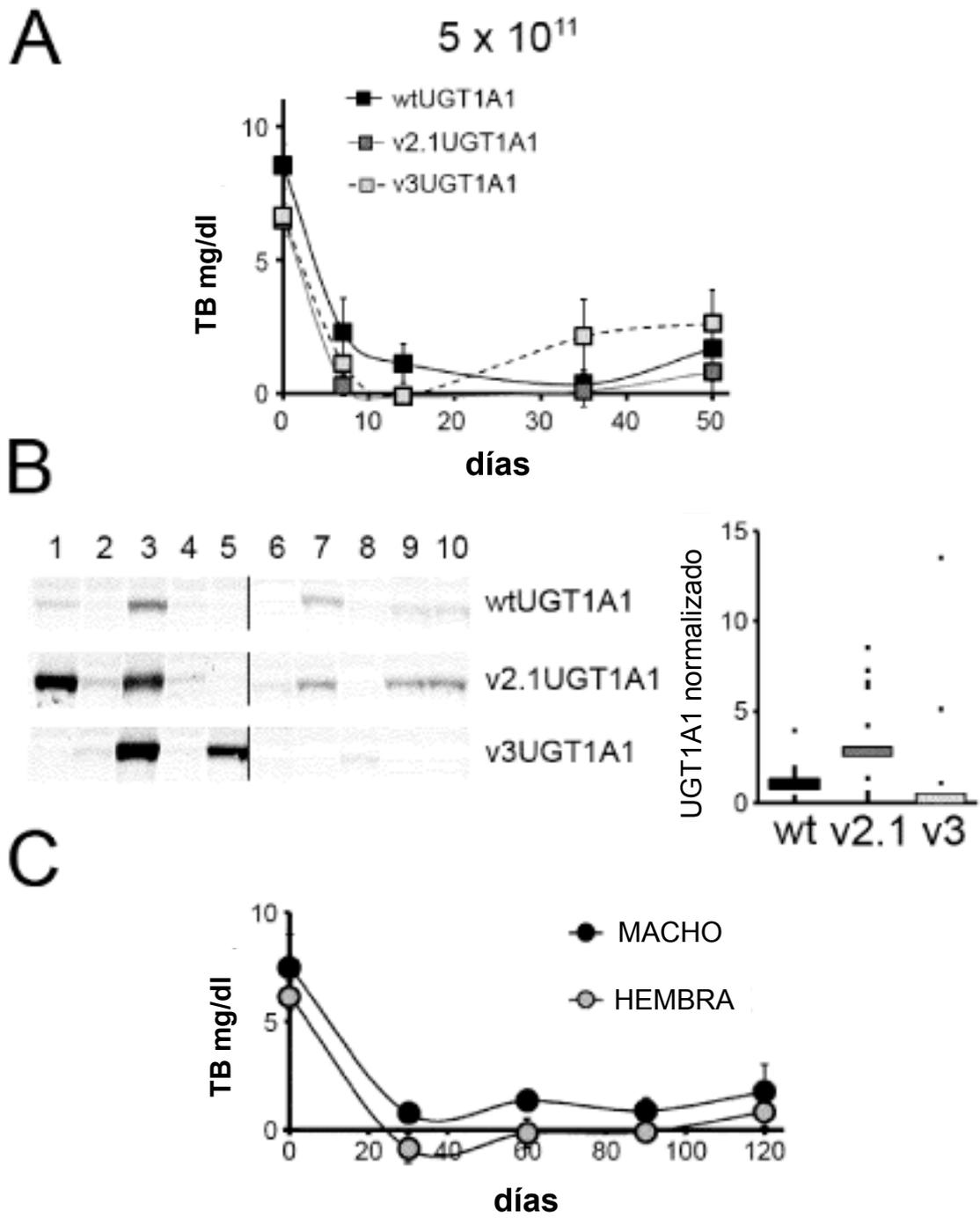


Figura 7

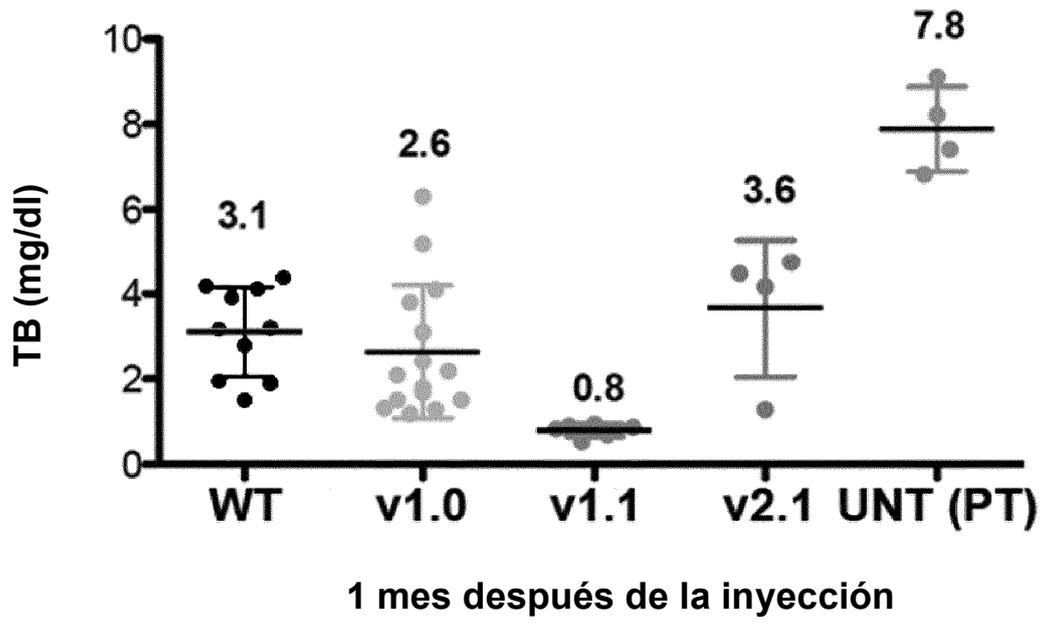


Figura 8