

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 222**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2019 PCT/US2019/067247**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2020 WO20132115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2019 E 19845789 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023 EP 3898981**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades del almacenamiento de glucógeno**

30 Prioridad:

18.12.2018 US 201862781380 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2024

73 Titular/es:

**ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
60 Leveroni Court
Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**TIPPER, CHRISTOPHER;
CLARK, KELLY REED y
WADSWORTH, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 969 222 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

Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades del almacenamiento de glucógeno

5 Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado en formato ASCII y que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 16 de diciembre de 2019, se denomina DIM-010WO_SL_ST25.txt y tiene un tamaño de 42,290 bytes.

10

Campo técnico de la invención

Esta solicitud se refiere generalmente a los vectores virales, y más particularmente a los vectores virales adenoasociados, para el tratamiento de enfermedades del almacenamiento de glucógeno, tales como la enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo la

15

Antecedentes de la invención

La enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo la (también conocida como GSD-Ia o enfermedad de von Gierke) es un trastorno hereditario causado por la acumulación de glucógeno en las células del cuerpo. La acumulación de glucógeno en ciertos órganos y tejidos, especialmente el hígado, los riñones y el intestino delgado, afecta su capacidad de funcionar normalmente. La GSD-Ia se manifiesta típicamente durante el primer año de vida con hipoglucemia severa y hepatomegalia causada por la acumulación de glucógeno. Los individuos afectados presentan retraso en el crecimiento, pubertad retardada, acidemia láctica, hiperlipidemia, hiperuricemia, y, en adultos, una alta incidencia de adenomas hepáticos. Véase Lei et al., 1993, Science 262: 580-3.

20

25

La GSD-Ia es una enfermedad genética rara y huérfana causada por la deficiencia de glucosa-6-fosfatasa-alfa (G6Pasa- α) activa, una enzima clave involucrada en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. La G6Pasa- α , codificada por el gen G6PC, cataliza la hidrólisis de glucosa-6-fosfato (G6P) a glucosa y fosfato en el paso final de la glucogenólisis y gluconeogénesis. Hasta la fecha se han identificado más de 80 mutaciones responsables de la deficiencia de G6Pasa- α y el desarrollo asociado de GSD-Ia. Véase Chou et al., 2010, Nat Rev Endocrinol 6(12): 676-88.

30

Actualmente no hay cura para la GSD-Ia y la suplementación dietética es el estándar actual de atención para los pacientes. Cuando se siguen estrictamente, las estrategias dietéticas suelen permitir el crecimiento normal y el desarrollo de la pubertad, sin embargo, la terapia dietética falla en prevenir completamente la aparición de hiperlipidemia, hiperuricemia, acidemia láctica y acumulación de grasa hepática. Véase Rake et al., 2002, Eur J Pediatr 161 Suppl 1: S20-34.

35

Se han explorado enfoques de terapia génica que utilizan virus adenoasociados (AAV) recombinantes portadores de G6Pasa- α para el manejo de GSD-Ia. Véase, por ejemplo, Patente estadounidense Núm. 9.644.216 y Publicación de patente estadounidense Núm. 2017/0362670. Sin embargo, para utilizar vectores AAV para la terapia génica humana, el desarrollo de procesos de producción robustos, confiables y escalables para los vectores es crucial. Los inventores actuales han descubierto que la modificación de la región de promotor/potenciador del gen G6PC para eliminar ciertas secuencias, descritas en la presente como "elementos Alu", mejora dramáticamente el rendimiento y la calidad de rAAV cuando se expresa desde varias plataformas de células hospederas.

40

45

Breve descripción de la invención

Esta invención proporciona métodos y composiciones para tratar enfermedades del almacenamiento de glucógeno. Más específicamente, se proporcionan en la presente moléculas de ácido nucleico recombinante, vectores de virus adenoasociados (AAV) y virus adenoasociado recombinante (rAAV) que se pueden utilizar en aplicaciones de terapia génica para el tratamiento de GSD-Ia.

50

En un aspecto, la aplicación se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de promotor/potenciador de G6PC (GPE) modificado, en donde el GPE modificado carece de una o más secuencias al menos 80 % idénticas a un elemento Alu, que se selecciona de los nucleótidos contiguos 934 - 1127 (Alu - 1), 1488 - 1823 (Alu - 2), y 1995 - 2350 (Alu - 3) de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el GPE modificado tiene una secuencia 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 %) idéntica a los nucleótidos contiguos 146-2123 de la SEQ ID NO: 1, o 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 %) idéntica a cualquiera de SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12.

55

En otro aspecto, la solicitud se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de promotor/potenciador de G6PC (GPE) modificado descrita en la presente y una secuencia codificante de G6Pasa- α , en la que el GPE modificado es capaz de dirigir la expresión de la secuencia codificante de G6Pasa- α . En algunas realizaciones, la secuencia codificante de G6Pasa- α comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende además una secuencia de señal de poliadenilación (poliA), tal como una secuencia de señal de poliA SV40 (SEQ ID NO: 14). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico

60

65

recombinante comprende además un intrón (SEQ ID NO: 13). En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

5 En otro aspecto, la aplicación se refiere a un vector recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante descrita en la presente. En algunas realizaciones, el vector es un vector de virus adenoasociado (AAV), tal como un vector AAV de serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o rh10 (es decir, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, o rh10). En una realización ejemplar, el vector AAV es un vector AAV de serotipo 8 (AAV8). Además se proporcionan células hospederas que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante o un vector recombinante divulgado en la presente. En realizaciones específicas, las células hospederas pueden ser adecuadas para la propagación de AAV.

15 En otro aspecto, la aplicación se relaciona con un método para aumentar el rendimiento de rAAV, y el método comprende suministrar un vector AAV descrito en la presente a un cultivo de células hospederas y recolectar el rAAV del cultivo celular. En algunas realizaciones, el cultivo de la célula hospedera es un cultivo eucariota de la célula hospedera.

También se proporciona en la presente un rAAV que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante o un vector AAV divulgado en la presente. En algunas realizaciones, la aplicación se refiere a un rAAV para el tratamiento de GSD-IA, y un rAAV que comprende una cápside AAV, y un genoma vectorial AAV empaquetado en el mismo, dicho genoma vectorial AAV comprende una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) AAV 5'; una secuencia de GPE modificado divulgada en la presente; una secuencia codificante que codifica una glucosa-6-fosfatasa alfa (G6Pasa- α), o un fragmento activo o variante de la misma; y una secuencia ITR AAV 3'. En algunas realizaciones ejemplares, la cápside AAV es una cápside AAV8. En algunas realizaciones, el genoma vectorial incluye la secuencia de ITR 5' y 3' idéntica a la SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, el genoma vectorial incluye el GPE modificado que comprende los nucleótidos contiguos 146-2123 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el genoma vectorial comprende además una secuencia de señal de poliadenilación (poliA), por ejemplo, una secuencia de señal de poliA SV40 (SEQ ID NO: 14). En algunas realizaciones, el genoma vectorial comprende además un intrón (SEQ ID NO: 13). En algunas realizaciones, la G6Pasa- α comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) idéntica a la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa- α comprende la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa- α consiste en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia codificante de G6Pasa- α es al menos 80% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) idéntica a la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones ejemplares, el genoma vectorial comprende una secuencia de ácido nucleico idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2.

35 La solicitud se refiere además a las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV de la invención. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica además comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la administración subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o intravenosa. En una realización ejemplar, la composición farmacéutica se formula para la administración intravenosa.

40 En otro aspecto, la aplicación se refiere a los métodos de tratamiento de la enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia) en un sujeto humano que comprende la administración al sujeto humano de una cantidad terapéuticamente eficaz de un rAAV divulgado en la presente. En algunas realizaciones, el rAAV se administra por vía subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o intravenosa. En una realización ejemplar, el rAAV se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 1×10^{14} copias del genoma (GC)/kg. En otras realizaciones, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{12} a aproximadamente 1×10^{13} copias del genoma (GC)/kg. En algunas realizaciones, se administra una dosis única de rAAV. En otras realizaciones, se administran dosis múltiples de rAAV.

50 Estos y otros aspectos y características de la invención se describen en las siguientes secciones de la solicitud.

Breve descripción de las figuras

La invención se puede entender más completamente con referencia a los siguientes dibujos. La **FIGURA 1A** es una representación esquemática del casete de expresión G6PC limitado por dos repeticiones de terminales invertidas AAV2 (ITR, SEQ ID NO: 15) y comprende un GPE, un intrón, un gen G6PC humano optimizado por codones (hG6PCco) y una cola de poli A tardía de SV40. Abreviaturas utilizadas: GPE: REGIÓN DE PROMOTOR/POTENCIADOR DE G6Pasa; hG6PCco: región codificante de glucosa-6-fosfatasa humana (optimizada por codones); ITR: repetición terminal invertida; SV40L pA: señal de poliadenilación tardía de SV40; UTR: región no traducida. La FIGURA 1B es una ilustración de casetes de expresión G6PC que contienen el GPE tipo silvestre (DTC161) o modificado (DTC175 que comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de las secuencias Alu - 1 y Alu - 2, DTC176 que comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE en el que están presentes los tres elementos Alu, pero las orientaciones de las secuencias Alu - 1 y Alu - 2 se invierten, DTC177 que comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de las secuencias Alu - 1, Alu - 2 y Alu - 3, DTC178 que comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de la secuencia Alu - 3, y DTC179 que comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE en el que están presentes los tres elementos Alu, pero la orientación de la secuencia Alu - 3 se invierte). La FIGURA 2 es una representación esquemática de un vector AAV ejemplar (DTC161),

con varios componentes clave mostrados en la misma. Las características del vector se proporcionan a continuación:

Tipo	Inicio	Final	Descripción
Región	1	145	Repetición terminal invertida (ITR)
Región	146	3,009	Promotor/potenciador de G6PC (GPE)
Región	3,010	3,331	Intrón quimérico
Gen	3,332	4,405	ADNc optimizado por codones de hG6PC
Región	4,426	4,623	Señal de poliadenilación tardía de SV40
Región	4,624	4,768	Repetición terminal invertida (ITR)

5 La FIGURA 3 es una representación esquemática del plásmido Rep/Cap pAAV2-8.KanR (p2123-FH) AAV, que proporciona la función Rep y Cap en el empaque de rAAV cuando se transfecta junto con vectores AAV en células hospederas. La FIGURA 4 es una representación esquemática del plásmido auxiliar de adenovirus pAdDeltaF6 (Kan) para la producción de rAAV cuando se transfecta conjuntamente con vectores AAV y plásmidos Rep/Cap en células hospederas. La FIGURA 5 es un gráfico de barras que muestra los títulos de rAAV producidos a partir de células hospederas después de la transfección de varios vectores AAV. Se realizaron tres pruebas bajo cada condición y se mostraron desviaciones estándar. * indica $P < 0,05$ en comparación con DTC161. La FIGURA 6 es un gráfico que muestra los títulos de rAAV producidos trazados en función del tamaño del genoma vectorial. La FIGURA 7 es una imagen de un gel de agarosa, que muestra bandas de ADN liberado, evaluando la degradación de la cápside y la capacidad de liberación de ADN empaquetado, cuando el ADN de longitud completa aislado de rAAV de un vector viral de control, DTC161, DTC175, DTC176, DTC177, DTC178 y DTC179 se someten a una electroforesis en gel de agarosa. Los ADN virales de longitud completa están entre 3,8 kb - 5 kb. ** denota la degradación de la cápside y el genoma intacto del ADN de longitud completa aislado del vector viral de control tras el tratamiento con dodecil sulfato de sodio (SDS). La FIGURA 8A es un gráfico que muestra trazas de ultracentrifugas analíticas de densidades de partículas de la preparación del vector DTC161 producido en células HEK293. La FIGURA 8B es un gráfico que muestra trazas de ultracentrifugas analíticas de densidades de partículas de un vector DTC177 (representado por la SEQ ID NO: 1) preparación producida en células HEK293. Abreviaturas utilizadas: RI: Índice de refracción. La FIGURA 9A es una curva dosis-respuesta para la expresión inducida de G6Pasa- α después de la infección con rAAV derivado del vector DTC161. La FIGURA 9B es una curva dosis-respuesta para la expresión inducida de G6Pasa- α después de la infección con rAAV derivado del vector DTC177 (representado por la SEQ ID NO: 1). El eje X indica las dosis de rAAV utilizadas para infectar las células hepáticas HuH7. El eje Y indica la expresión inducida del ARNm G6PC en las células. El rAAV derivado de un vector DTC161 producido por lotes de desarrollo se utilizó como estándar de referencia. Abreviaturas utilizadas: REF: Referencia estándar; UNK: muestra de prueba.

Descripción detallada de la invención

30 Esta invención proporciona una gama de nuevos agentes y composiciones para ser utilizados para aplicaciones terapéuticas. Las moléculas y composiciones de esta invención se pueden utilizar para mejorar, prevenir o tratar enfermedades asociadas con la enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia) o aumentar la presencia o función de glucosa-6-fosfatasa-alfa (G6Pasa- α) en un sujeto.

35 A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse 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).

40 A fin de facilitar el examen de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

45 Virus adenoasociado (AAV): Un virus pequeño, incapaz de replicarse, sin envoltura que infecta a los humanos y algunas otras especies de primates. No se sabe que el AAV cause enfermedad y provoca una respuesta inmunitaria muy leve. Los vectores de terapia génica que utilizan AAV pueden infectar tanto células en división como en reposo y pueden persistir en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de la célula hospedera. Estas características hacen del AAV un vector viral atractivo para la terapia génica. Actualmente existen 12 serotipos reconocidos de AAV (AAV1 - 12).

50 Administración/administrar: Proporcionar o dar a un sujeto un agente, tal como un agente terapéutico (por ejemplo, un AAV recombinante), por cualquier vía efectiva. Las vías ejemplares de administración incluyen, pero no se limitan a, la inyección (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intravenosa), vía oral, intraductal, sublingual, rectal, transdérmica, intranasal, vaginal y por inhalación.

55 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 particular (tal como una

especie o grupo de especies en particular). Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico puede optimizarse para su expresión en células de mamíferos o en una especie de mamíferos en particular (tales como células humanas). La optimización por codones no altera la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

5 Potenciador: Secuencia de ácido nucleico que aumenta la velocidad de transcripción al aumentar la actividad de un promotor.

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

15 Enfermedad del almacenamiento de glucógeno (GSD): Grupo de enfermedades que son el resultado de defectos en el procesamiento de la síntesis de glucógeno o crisis nerviosa en los músculos, el 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. Actualmente hay 11 enfermedades del almacenamiento de glucógeno reconocidas (GSD tipo I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, XI, XII y XIII). La GSD-I consiste en dos trastornos autosómicos recesivos, la GSD-IA y la GSD-Ib (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). La GSD-IA es el resultado de una deficiencia en glucosa-6-fosfatasa- α . Las deficiencias en el transportador de glucosa-6-fosfato (G6PT) son responsables de GSD-Ib.

20 Enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia): También conocida como la enfermedad de von Gierke, la GSD-Ia es la enfermedad del almacenamiento de glucógeno más común, con una incidencia de aproximadamente 1 de cada 100,000 nacimientos vivos. GSD-Ia es una enfermedad genética que es causada por la deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfatasa- α (G6Pasa- α). La deficiencia de G6Pasa- α perjudica la capacidad del hígado para producir glucosa libre a partir del glucógeno y de la gluconeogénesis. Los pacientes afectados por GSD-Ia son incapaces de mantener la homeostasis de la glucosa y presentan hipoglucemia en ayuno, retraso del crecimiento, hepatomegalia, nefroegalia, hiperlipidemia, hiperuricemia y academia láctica (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). Actualmente no hay cura para la GSD-Ia

25 Intrón: Un tramo 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.

30 Repetición termina invertida (ITR): Secuencias simétricas de ácido nucleico en el genoma de virus adenoasociados requeridas para una replicación eficiente. Las secuencias de ITR se encuentran en cada extremo del genoma del ADN AAV. Las ITR actúan como los orígenes de la replicación para la síntesis de ADN viral y son necesarias para la encapsidación vectorial.

35 Aislados: Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína, virus o célula) ha sido sustancialmente separado o purificado lejos de otros componentes biológicos en la célula o tejido del organismo, o el propio organismo, en el que el componente es de origen natural, tales como otros cromosomas y extracromosomas ADN y ARN, proteínas y células. Las moléculas y proteínas de ácido nucleico que han sido "aisladas" incluyen las purificadas por métodos estándar de purificación. El término también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas por expresión recombinante en una célula hospedera, así como moléculas y proteínas de ácido nucleico sintetizadas químicamente.

40 Ligado operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico está ligada operativamente con 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 ligado operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN ligadas operativamente son contiguas y, cuando es necesario, para unir dos regiones de codificación de proteínas, en el mismo marco de lectura.

45 Portador farmacéuticamente aceptable: Los portadores farmacéuticamente aceptables (vehículos) útiles en esta divulgación son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15a edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más compuestos, moléculas o agentes terapéuticos.

50 En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales usualmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, disolución salina fisiológica, disoluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como un vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas en polvo, píldora, comprimido, o cápsula), los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, o estearato de magnesio de grado farmacéutico. Además de los portadores biológicamente neutros, las

composiciones farmacéuticas a administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes amortiguadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

5 Prevenir, tratar o mejorar una enfermedad: "Prevenir" una enfermedad (tal como GSD-IA) se refiere a la inhibición del desarrollo completo de una enfermedad. "Tratar" se refiere a una intervención terapéutica que alivia 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 síntomas de una enfermedad.

10 Promotor: Una región de ADN que dirige/inicia la transcripción de un ácido nucleico (por ejemplo, un gen). Un promotor incluye las secuencias necesarias de ácido nucleico cerca del sitio de inicio de la transcripción.

15 Purificado: El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Así, por ejemplo, un péptido purificado, proteína, virus, u otro compuesto activo es aquel que se aísla en su totalidad o en parte de proteínas asociadas naturalmente y otros contaminantes. En ciertas realizaciones, el término "sustancialmente purificado" se refiere a un péptido, proteína, virus u otro compuesto activo que ha sido aislado de una célula, medio de cultivo celular, u otra preparación en bruto y se ha sometido a fraccionamiento para eliminar varios componentes de la preparación inicial, tales como proteínas, residuos celulares, y otros componentes.

20 Recombinante: Una molécula de ácido nucleico recombinante es aquella que tiene una secuencia que no es de origen natural o tiene una secuencia que está hecha por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otra manera. Esta combinación artificial se puede lograr mediante la síntesis química o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

25 Del mismo modo, un virus recombinante es un virus que comprende una secuencia (tal como la secuencia genómica) que no es de origen natural o está hecho por una combinación artificial de al menos dos secuencias de origen diferente. El término "recombinante" también incluye ácidos nucleicos, proteínas y virus que han sido alterados únicamente por adición, sustitución o delección de una porción de una molécula de ácido nucleico natural, proteína o virus. Como se usa en la presente, "AAV recombinante" se refiere a una partícula AAV en la que se ha empaquetado una molécula de ácido nucleico recombinante como una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica G6Pasa- α .

30 Identidad de secuencia: La identidad o similitud entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de la identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de la secuencia se puede medir en términos de identidad porcentual; cuanto mayor sea el porcentaje, más idénticas serán las secuencias. La similitud de secuencia puede medirse en términos de similitud porcentual (que tiene en cuenta las sustituciones conservativas de aminoácidos); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares serán las secuencias. Los homólogos u ortólogos de las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia cuando se alinean utilizando métodos estándar. Esta homología es más significativa cuando las proteínas ortólogas o ADNc se derivan de especies que están más estrechamente relacionadas (tales como las secuencias humanas y de ratón), en comparación con especies más distantemente relacionadas (tales como las secuencias humanas y de *C. elegans*).

45 Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineamiento se describen en: Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins y Sharp, CABIOS5:151-3, 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 secuencia y los cálculos homológicos.

50 The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) está disponible en varias fuentes, incluido el Centro Nacional de Información Biológica (NCBI) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias BLASPT, BLASTOST, BLASTOX, TBSTOST y TBLASX. Se puede encontrar información adicional en el sitio web de NCBI.

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

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

65

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 ser sintetizado 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 se está tratando con el agente. La cantidad eficaz del agente dependerá de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, el sujeto o las células que se están tratando, 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 alterar la capacidad del vector para replicarse y/o integrarse en una célula hospedera. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula hospedera, 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 la traducción de genes o genes insertados. En algunas realizaciones en la presente, el vector es un vector AAV.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la materia a la cual pertenece esta divulgación. Los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por "que comprende A o B" se entenderá que todos los tamaños de base o de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos, son aproximados y se proporcionan para su descripción. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden utilizarse en la práctica o prueba de la presente divulgación, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

I. Un ácido nucleico recombinante

Un aspecto de la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico recombinante, que incluye un promotor/potenciador de G6PC modificado (GPE) que carece de uno o más elementos Alu en comparación con el GPE tipo silvestre, en donde el GPE modificado es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α (SEQ ID NO: 5). En algunas realizaciones, el GPE modificado se obtiene mediante la eliminación de uno o más elementos Alu del promotor endógeno para el gen G6PC humano, tal como la eliminación de uno o más de los nucleótidos contiguos 934 - 1127 (Alu - 1), 1488 - 1823 (Alu - 2), y 1995 - 2350 (Alu - 3) de la SEQ ID NO: 6. En algunas otras realizaciones, el GPE modificado se obtiene mediante la eliminación de uno o más elementos Alu del promotor endógeno para el gen G6PC de otros mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, roedores, etc. En algunas realizaciones, el GPE modificado no afecta la expresión del gen G6PC en comparación con el GPE tipo silvestre. En algunas realizaciones, el GPE modificado es capaz de mejorar la expresión del gen G6PC en comparación con el GPE tipo silvestre. En algunas realizaciones, el GPE modificado tiene una actividad comparable para impulsar la expresión del gen G6PC en el hígado como el GPE tipo silvestre, y una actividad muy baja para impulsar la expresión de G6Pasa- α en otros tejidos.

En algunas realizaciones, el GPE modificado incluye una secuencia de ácido nucleico desprovista de una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a los nucleótidos contiguos 934 - 1127 (Alu - 1) de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el GPE modificado incluye una secuencia de ácido nucleico desprovista de una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a los nucleótidos contiguos 1488 - 1823 (Alu - 2) de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el GPE modificado incluye una secuencia de ácido nucleico desprovista de una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntica a los nucleótidos contiguos 1995 - 2350 (Alu - 3) de la SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, el GPE modificado incluye una secuencia de ácido nucleico desprovista de una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a Alu - 1 y una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a Alu - 2 de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el GPE modificado incluye una secuencia de ácido nucleico desprovista de una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a Alu - 1 y una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a Alu - 3 de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el GPE modificado incluye una secuencia de ácido nucleico desprovista de una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o

- 100 %) idéntica a Alu - 2 y una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a Alu - 3 de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el GPE modificado incluye una secuencia de ácido nucleico desprovista de una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a Alu - 1, una secuencia al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a Alu - 2, y una secuencia al menos 80 % (e.g., 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a Alu - 3 de la SEQ ID NO: 6.
- 10 En algunas realizaciones de la invención actual, la secuencia de ácido nucleico recombinante incluye un GPE con una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a los nucleótidos contiguos 146 - 2123 de la SEQ ID NO: 1, en donde el GPE es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α . En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico recombinante incluye un GPE con una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 7, en donde el GPE es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α . En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico recombinante incluye un GPE con una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 8, en donde el GPE es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α . En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico recombinante incluye un GPE con una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 9, en donde el GPE es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α . En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico recombinante incluye un GPE con una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 10, en donde el GPE es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α . En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico recombinante incluye un GPE con una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 11, en donde el GPE es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α . En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico recombinante incluye un GPE con una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 12, en donde el GPE es capaz de dirigir la expresión de una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α .
- Otro aspecto de la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico recombinante que incluye un GPE modificado divulgado en la presente y una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α . En algunas realizaciones, la G6Pasa- α incluye una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la G6Pasa- α incluye la SEQ ID NO: 5, o un fragmento activo o variante de la misma. En una realización ejemplar, la G6Pasa- α comprende o consiste en la SEQ ID NO: 5.
- En algunas realizaciones, la secuencia codificante de G6Pasa- α incorpora una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 4.
- En algunas realizaciones, la secuencia codificante que codifica la G6Pasa- α humana está optimizada por codones para la expresión en células humanas. La optimización por codones se puede realizar en el ADNc humano de G6PC utilizando la tecnología de optimización por codones OptimumGene™ (GenScript, Piscataway, NJ). Las secuencias de ADNc G6PC optimizadas pueden ser examinadas y modificadas para eliminar posibles marcos de lectura alternativos (ARF) de secuencias ATG internas no en marco que teóricamente podrían codificar péptidos de 9 o más aminoácidos en longitud. Por ejemplo, se pueden realizar modificaciones adicionales en las secuencias de ADNc de G6PC optimizado por codones para evitar posibles respuestas de linfocitos T citotóxicos a productos transgénicos generados a partir de ARF (Li et al., 2009, PNAS 106: 10770-4). En algunas realizaciones, la secuencia de codificación optimizada por codones para G6Pasa- α humana incorpora una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 3.
- En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico recombinante que incluye el GPE modificado y la secuencia codificante que codifica G6Pasa- α como se describe en la presente incluye además un intrón y/o señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, el intrón se coloca entre el GPE y la secuencia codificante de G6Pasa- α . En algunas realizaciones, el intrón es un intrón quimérico, lo que aumenta la expresión transgénica de G6Pasa- α . El intrón puede estar compuesto por el sitio donante 5' del primer intrón del gen β -globina humano y la rama y el sitio aceptor 3' del intrón de una región variable de cadena pesada del gen de la inmunoglobulina, en donde las secuencias de los sitios donante y aceptor, junto con el sitio ramificado, se han cambiado para que coincidan con las secuencias de consenso para el

empalme. En algunas realizaciones, el intrón incluye una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 13.

5 Una señal de poliadenilación se puede colocar en dirección 3' de la secuencia codificante que codifica G6Pasa- α para la poliadenilación eficiente del ARNm G6PC. Se pueden utilizar diversas señales de poliadenilación, por ejemplo, una señal de poliadenilación tardía de virus símico 40 (SV40), una señal de poliadenilación hGH, una señal de poliadenilación BGH, o una señal de poliadenilación rbGlob. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación tardía de SV40. En algunas realizaciones, la señal de poliadenilación incluye una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 14.

15 Otro aspecto de la invención proporciona un vector recombinante que incluye un GPE modificado, y una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α divulgada en la presente. En algunas realizaciones, el vector recombinante incluye además un intrón y/o una señal de poliadenilación descrita en la presente. El vector puede ser un vector de expresión de mamíferos, un vector de expresión bacteriana, un vector de expresión de levadura, un vector de lentivirus, un vector de retrovirus, un vector de adenovirus, un vector de virus adeno asociado (AAV), un vector de ARNi, un vector de expresión CRE-LOX, un vector de expresión CRISPR, un vector de expresión de TALEN, etc. El vector puede incluir además un intrón y/o una señal de poliadenilación como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el vector recombinante incluye además una secuencia de ácido nucleico de relleno situada entre el GPE y el intrón, y/o entre el intrón y la secuencia codificante de G6Pasa- α .

25 En algunas realizaciones, el vector recombinante es un vector AAV. El vector AAV puede ser un vector AAV del serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 (es decir, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV 12), así como cualquiera de las más de 100 variantes aisladas de tejidos de primates humanos y no humanos (véase, por ejemplo, Choi et al., *Curr Gene Ther.*, 5:299-310, 2005; y Gao et al., *Curr Gene Ther.*, 5:285-297, 2005). Los vectores de AAV de cualquier serotipo se pueden utilizar en la presente invención, y la selección de serotipo AAV dependerá en parte del tipo de célula(s) que son el objetivo de la terapia génica. Para el tratamiento de GSD-IA, el hígado es uno de los órganos objetivo relevantes.

30 En algunas realizaciones, el vector AAV recombinante incluye una secuencia ITR AAV, que funciona como el origen de la replicación del ADN vectorial y la señal de empaque del genoma vectorial, cuando las funciones AAV y adenovirus auxiliares se proporcionan en *trans*. Además, la ITR actúa como el objetivo para el rascado endonucleático de cadena única por las proteínas Rep grandes, resolviendo genomas individuales a partir de intermedios de replicación.

35 En algunas realizaciones ejemplares, el vector AAV es un vector AAV de serotipo 8 (AAV8), y el vector incluye un GPE modificado, un intrón, una secuencia codificante que codifica G6Pasa- α , y una señal de poliadenilación tardía de SV40 descrita en la presente. En algunas realizaciones, el vector incluye además dos secuencias de repetición terminal invertida (ITR) AAV2 (SEQ ID NO: 15): un 5' del GPE y un 3' de la señal de poliadenilación. En algunos ejemplos particulares no limitativos, el vector recombinante incluye una secuencia de ácido nucleico al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

45 II. Una célula hospedera que comprende un ácido nucleico recombinante

Además se proporcionan células hospederas aisladas que comprenden las moléculas o vectores de ácido nucleico recombinante divulgados en la presente. Se puede utilizar una amplia gama de células hospederas, tales como células de bacterias, levaduras, insectos, mamíferos, etc. En algunas realizaciones, la célula hospedera puede ser una célula (o una línea celular) apropiada para la producción de AAV recombinante (rAAV), por ejemplo, una célula HeLa, Cos-7, HEK293, A549, BHK, Vero, RD, HT-1080, ARPE-19, o MRC-5.

55 Las moléculas o vectores de ácido nucleico recombinante pueden suministrarse al cultivo celular hospedero usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, se genera una línea celular hospedera estable que tiene la molécula o vector de ácido nucleico recombinante insertado en su genoma. En algunas realizaciones, se genera una línea celular hospedera estable, que contiene un vector AAV descrito en la presente. Después de la transfección del vector AAV al cultivo hospedero, la integración del rAAV en el genoma del hospedero puede ser evaluada por varios métodos, tales como selección antibiótica, clasificación celular activada por fluorescencia, southern blot, detección basada en PCR, hibridación fluorescente *in situ* descritos por Nakai et al., *Nature Genetics* (2003) 34, 297-302; Philpott et al., *Journal of Virology* (2002) 76(11):5411-5421, y Howden et al., *J Gene Med* 2008; 10:42-50. Además, se puede establecer una línea celular estable de acuerdo con protocolos bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en Clark, *Kidney International* Vol 61 (2002):S9-S15, y Yuan et al., *Human Gene Therapy* 2011 May;22(5):613-24.

65 III. Un AAV recombinante

Esta invención también proporciona un rAAV que comprende una cápside AAV y un genoma vectorial AAV descrito en la

presente. La cápside AAV puede ser de serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 (es decir, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, o rh10). En algunas realizaciones, la cápside es una cápside AAV8.

5 Un rAAV puede ser producido por las células hospederas, que se suministran con los vectores AAV divulgados en la presente y las funciones del gen AAV Rep y Cap, así como funciones auxiliares adicionales. Las funciones del gen Rep y Cap pueden ser proporcionadas a la célula hospedera por diversos medios, por ejemplo, por un plásmido o cualquier tipo de vector que contenga los genes AAV Rep y Cap tipo silvestre, y la electroporación de los ARNm Rep y Cap. Las funciones auxiliares adicionales pueden ser proporcionadas, por ejemplo, por una infección por adenovirus (AV), por un plásmido que transporta todos los genes necesarios de la función auxiliar AV, o por otros virus, tales como el virus del herpes simple (HSV) o el baculovirus. Cualquier gen, función génica u otro material genético necesario para la producción de rAAV por la célula hospedera puede existir transitoriamente dentro de la célula hospedera, o ser insertado de forma estable en el genoma de la célula hospedera. Los métodos de producción RAAV adecuados para su uso con los métodos de la invención actual incluyen los divulgados en Clark et al., *Human Gene Therapy* 6:1329-1341 (1995), Martin et al., *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269 (2013), Thorne et al., *Human Gene Therapy* 20:707-714 (2009), Fraser Wright, *Human Gene Therapy* 20:698-706 (2009), y Virag et al., *Human Gene Therapy* 20:807-817 (2009).

En una realización ejemplar, las células HEK293 se transfectan con el vector AAV que incluye la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2; un plásmido que codifica cuatro proteínas de replicación viral AAV2 tipo silvestre (Rep) y las tres proteínas de cápside (cap) viral AAV tipo silvestre del serotipo 8; y un plásmido que contiene regiones de un genoma de adenovirus que son importantes para la replicación AAV, específicamente, E2A, E4 y ARN VA. Los rAAV que contienen una cápside AAV8 pueden ser producidos posteriormente y aislados de las células hospederas. En algunas realizaciones, el GPE modificado que carece de uno o más elementos Alu en el vector AAV mejora el empaque del rAAV producido a partir de las células hospederas. En algunas realizaciones, el GPE modificado que carece de uno o más de los elementos Alu en el vector AAV afecta la formación de la estructura auto-complementaria y, por lo tanto, mejora el rendimiento del rAAV producido a partir de las células hospederas.

La lisis de las células infectadas por AAV se puede lograr mediante métodos que tratan química o enzimáticamente las células con el fin de la liberación de partículas virales infecciosas. Estos métodos incluyen el uso de nucleasas, tales como benzonasa o DNAsa, proteasas, tal como tripsina, o detergentes o tensoactivos. También se pueden utilizar interrupciones físicas, tales como homogeneización o molienda, o la aplicación de presión a través de una celda de presión de microfluidizador, o ciclos de congelación y descongelación. Alternativamente, el sobrenadante se puede recolectar de las células infectadas por AAV sin la necesidad de lisis celular.

Puede ser necesario purificar la muestra que contiene rAAV y partículas de virus auxiliares para eliminar, por ejemplo, los desechos celulares resultantes de la lisis celular. Los métodos de purificación mínima del virus auxiliar y las partículas AAV se conocen en la técnica, y cualquier método apropiado se puede utilizar para preparar muestras que contengan tanto AAV como partículas de virus auxiliar para su uso en los métodos de la presente invención. Dos métodos de purificación ejemplares son la purificación de gradiente de densidad a base de cloruro de cesio (CsCl) y de iodixanol. Ambos métodos se describen en Strobel et al., *Human Gene Therapy Methods*, 26(4): 147-157 (2015). La purificación mínima también se puede lograr usando cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, resina de afinidad de sefarosa AVB (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) o una resina de afinidad AAV8, AAV9 o AAVX POROS™ CaptureSelect™ (Thermo Fisher Scientific, Millersburg, PA). Los métodos de purificación de AAV utilizando resina de afinidad sefarosa AVB se describen en, por ejemplo, Wang et al., *Mol Ther Methods Clin Dev.*, 2:15040 (2015).

Puede ser necesario inactivar el virus auxiliar por calor. Las técnicas de inactivación por calor se basan en las diferentes etapas térmicas de AAV y partículas de virus auxiliares. Por ejemplo, las partículas AAV pueden calentarse a temperaturas de hasta 56 °C y permanecer intactas, mientras que las partículas AV se vuelven inactivas. Conway et al., *Gene Therapy* 6, 986-993, 1999, describe la inactivación térmica diferencial del VHS en muestras que contienen AAV. La inactivación por calor puede lograrse mediante cualquier metodología conocida. En los ejemplos descritos a continuación, la inactivación por calor se logró utilizando un termociclador para calentar y enfriar rápidamente volúmenes de muestra de 300 µL o menos. Este sistema se eligió porque se basa en la transferencia de calor que es principalmente conductora, lo que lo convierte en un modelo viable tanto para sistemas de flujo continuo como para sistemas de lotes más grandes que emplean mezcla activa. Ejemplos de sistemas de flujo continuo incluyen el paso de la muestra a través de un intercambiador de calor de flujo continuo, tal como el intercambiador de calor de un solo uso DHX™ para la fabricación bioterapéutica (Thermo Fisher Scientific, Millersburg, PA). Tales sistemas permiten al operador controlar el proceso de inactivación por calor controlando la tasa de flujo de la muestra a través del intercambiador de calor, controlando así la duración del proceso de calentamiento y la temperatura del intercambiador de calor, controlando así la temperatura de inactivación por calor.

Alternativamente, la inactivación por calor puede lograrse utilizando sistemas por lotes de varios tamaños. Por ejemplo, la inactivación por calor puede lograrse a escala de 1 L, colocando la muestra que contiene AAV en un frasco de PETG de 1 L y colocando el frasco en un baño maría a la temperatura de inactivación deseada durante el período de tiempo deseado, con mezclado; por ejemplo, las muestras pueden calentarse a 47 °C durante 20 minutos. A una escala mayor, la inactivación por calor puede lograrse colocando la muestra que contiene rAAV en una bolsa de bioprocesamiento de 5 L en una plataforma basculante controlada por temperatura establecida a la temperatura de inactivación deseada, durante

el período de tiempo deseado. Por ejemplo, la plataforma de balanceo puede ajustarse a 49 °C a una velocidad de balanceo de 30 RPM, con un ángulo de mezclado de 12° durante 40 minutos.

La inactivación por calor puede ocurrir a cualquier temperatura en donde hay una diferencia suficiente en la estabilidad entre las partículas rAAV y las partículas de virus ayudantes que las partículas de virus ayudantes se inactivan sustancialmente mientras las partículas rAAV activas permanecen. Un experto en la técnica entenderá que se pueden requerir temperaturas más altas para lograr mayores niveles de reducción AV. En algunas realizaciones, el paso de inactivación por calor incluye el uso de una disolución amortiguadora que contiene sales kosmotrópicas y/o cationes divalentes o trivalentes. Los métodos de inactivación térmica en presencia de una disolución amortiguadora que contiene sales kosmotrópicas y/o cationes divalentes o trivalentes se describen en WO/2017/172772.

Una vez que se ha logrado la inactivación por calor, puede ser necesario o deseable determinar la eficiencia de la inactivación. La eficacia de un protocolo de inactivación está determinada por ensayos que detectan la presencia de virus auxiliar capaz de replicarse, tal como un ensayo de placa. Los ensayos de placa para el virus auxiliar son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo los ensayos de placa para AV, VHS, baculovirus, y otros. Los ensayos de placa de adenovirus se pueden llevar a cabo utilizando cualquier tipo de célula apropiada, por ejemplo, células HeLa o HEK293. Los protocolos estándar de ensayo de placas se describen en, por ejemplo, Current Protocols in Human Genetics, 2003. Los ensayos alternativos para medir los títulos de adenovirales incluyen aquellos que permiten la identificación de células infectadas en cultivo mediante la detección de proteínas virales, tales como proteínas hexónicas, utilizando tinciones inmunocitoquímicas. Tales ensayos incluyen el Kit de Inmunoensayo QuickTiter™ Adenovirus (Cell Biolabs, San Diego, CA). La eficiencia de la inactivación se informa generalmente como la reducción logarítmica del virus (LRV).

La cuantificación de las partículas de rAAV se complica por el hecho de que la infección por AAV no produce efecto citopático *in vitro* y, por lo tanto, no se pueden utilizar ensayos de placa para determinar títulos infecciosos. Sin embargo, las partículas de AAV se pueden cuantificar utilizando una serie de métodos, incluyendo la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) (Clark et al., Hum. Gene Ther. 10, 1031-1039 (1999)) o hibridación por transferencia en mancha (Samulski et al., J. Virol. 63, 3822-3828 (1989)), o por densidad óptica de preparaciones vectoriales altamente purificadas (Sommer et al., Mol. Ther. 7, 122-128 (2003)). Las partículas resistentes a la DNasa (DRP) se pueden cuantificar mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) (DRP-qPCR) en un termociclador (por ejemplo, un termociclador iCycler iQ de formato de bloque de 96 pozos (Bio-Rad, Hercules, CA)). Las muestras que contienen partículas de AAV se incuban en presencia de DNasa I (100 U/ml; Promega, Madison, WI) a 37 °C durante 60 min, seguido de la digestión de proteinasa K (Invitrogen, Carlsbad, CA) (10 U/ml) a 50 °C durante 60 min, y luego se desnaturalizan a 95 °C durante 30 min. El conjunto de sondas de cebador debe ser específico para una porción no nativa del genoma vectorial AAV, por ejemplo, la secuencia poli(A) de la proteína de interés. El producto PCR puede amplificarse utilizando cualquier conjunto apropiado de parámetros de ciclo, basados en la longitud y composición de los cebadores, sonda y secuencia amplificada. Los protocolos alternativos se divulgan en, por ejemplo, Lock et al., Human Gene Therapy Methods 25(2): 115-125 (2014).

La infectividad de las partículas de rAAV se puede determinar mediante un ensayo de dosis infecciosa de cultivo tisular al 50 % (TCID₅₀), como se describe en, por ejemplo, Zhen et al., Human Gene Therapy 15:709-715 (2004). En este ensayo, las partículas vectoriales AAV se diluyen en serie y se utilizan para co-infectar una línea celular que expresa Rep/Cap junto con partículas AV en placas de 96 pozos. 48 horas después de la infección, se extrae el ADN celular total de pozos infectados y de control. La replicación del vector AAV se mide luego usando qPCR con sonda y cebadores específicos de transgenes. La infectividad TCID₅₀ por mililitro (TCID₅₀/ml) se calcula con la ecuación de Kärber, utilizando las proporciones de pozos positivos para AAV en diluciones seriales de 10 veces.

IV. AAV recombinante para terapia génica

AAV pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*. El AAV es un virus pequeño y sin envoltura que empaqueta un genoma lineal de ADN de cadena única. Tanto las cadenas sentido como antisentido del ADN AAV se empaquetan en cápsides AAV con la misma frecuencia.

El genoma AAV se caracteriza por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean dos marcos de lectura abiertos (ORB). En el genoma AAV2, por ejemplo, los primeros 125 nucleótidos de ITR son un palíndromo, que se pliega sobre sí mismo para maximizar el emparejamiento de la base y forma una estructura de horquilla en forma de T. Las otras 20 bases de la ITR, denominada secuencia D, permanecen sin emparejarse. Las ITR son secuencias de acción en cis importantes para la replicación del ADN AAV; la ITR es el origen de la replicación y actúa como cebador para la síntesis de segunda cadena por ADN polimerasa. El ADN de doble cadena formado durante esta síntesis, que se llama monómero de forma replicante, se utiliza para una segunda ronda de replicación auto-cebadora y forma un dímero de forma replicante. Estos intermedios de doble cadena se procesan a través de un mecanismo de desplazamiento de cadena, lo que da como resultado un ADN de cadena única utilizado para el envasado y ADN de doble cadena utilizado para la transcripción. Dentro de la ITR se encuentran los elementos de unión a Rep y un sitio de resolución terminal (TRS). Estas características son utilizadas por la proteína reguladora viral Rep durante la replicación AAV para procesar los intermedios de doble cadena. Además de su papel en la replicación de AAV, la ITR también es esencial para el empaque del genoma AAV, la transcripción, la regulación negativa en condiciones no permisivas y la integración específica del sitio (Days y Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008).

El ORF izquierdo de AAV contiene el gen Rep, que codifica cuatro proteínas: Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. El ORF correcto contiene el gen de la caperuza, que produce tres proteínas virales de la cápside (VP1, VP2 y VP3). La cápside AAV contiene 60 proteínas virales de la cápside dispuestas en una simetría icosaédrica. 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 más utilizados para la terapia génica. Aunque el AAV infecta a los seres humanos y algunas otras especies de primates, no se sabe que cause enfermedades y provoca una respuesta inmunitaria muy leve. Los vectores de terapia génica que utilizan AAV pueden infectar tanto células en división como en reposo y persistir en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de la célula hospedera. Debido a las características ventajosas de AAV, la presente divulgación contempla el uso de AAV para las moléculas de ácido nucleico recombinante y los métodos divulgados en la presente.

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

Los métodos para producir rAAV adecuados para la terapia génica son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. No. 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 de ácido nucleico recombinante y métodos divulgados en la presente.

Las composiciones que comprenden el rAAV divulgado en la presente comunicación y un portador farmacéuticamente aceptable se proporcionan en la presente divulgación. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración de rAAV se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 2012/0219528. Los portadores farmacéuticamente aceptables (vehículos) útiles en esta divulgación son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15a edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más compuestos, moléculas o agentes terapéuticos.

En algunas realizaciones, el rAAV se formula en un amortiguador/portador adecuado para la infusión en sujetos humanos. La disolución amortiguadora/portador debe incluir un componente que evite que el rAAV se adhiera a la tubería de infusión, pero no interfiera con la actividad de unión a rAAV *in vivo*. Entre las diversas disoluciones adecuadas cabe citar una o varias de las siguientes: una disolución salina amortiguadora, un tensoactivo y una sal o mezcla fisiológicamente compatible de sales ajustada a una fuerza iónica equivalente a aproximadamente 100 mm de cloruro de sodio (NaCl) a aproximadamente 250 mm de cloruro de sodio, o una sal fisiológicamente compatible ajustada a una concentración iónica equivalente. El pH puede estar en el rango de 6,5 a 8,5, o 7 a 8,5, o 7,5 a 8. Se puede seleccionar un tensoactivo adecuado, o una combinación de tensoactivos, entre los poloxámeros, es decir, copolímeros tribloque no iónicos compuestos por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno 10 (óxido de polipropileno) flanqueados por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (Hidroxiestearato Macrogol-15), LABRASOL (Polioxiglicérido caprílico), polioxi 10 oleil éter, TWEEN (ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilenados), etanol y polietilenglicol.

La invención actual también proporciona métodos para tratar a un sujeto diagnosticado con una enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo 1a (GSD-1a) y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un rAAV (o una composición que comprende el rAAV) divulgada en la presente.

Se puede utilizar cualquier método o vía adecuado para administrar un rAAV o una composición que contiene rAAV descrita en la presente. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, la vía sistémica, oral, por inhalación, intranasal, intratraqueal, intraarterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica y otras vías de administración parentales. En algunas realizaciones, el rAAV o la composición que comprende los rAAV se administran por vía intravenosa.

La dosis específica administrada puede ser una dosis uniforme para cada paciente, por ejemplo, $.0 \times 10^{13}$ - $1,0 \times 10^{15}$ copias genómicas (GC) del virus por paciente. Alternativamente, la dosis del paciente puede adaptarse al peso corporal aproximado o al área superficial del paciente. Otros factores para determinar la dosificación apropiada pueden incluir la enfermedad o afección a tratar o prevenir, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, y la edad, sexo y condición médica del paciente. Refinamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento es hecho rutinariamente por los expertos en la técnica, especialmente en vista de la información de dosificación y los ensayos divulgados en la presente. La dosificación también se puede determinar mediante el uso de ensayos conocidos para determinar las dosificaciones utilizadas junto con los datos de dosis-respuesta adecuados. Por ejemplo, la dosis biológica óptima del rAAV administrado puede identificarse evaluando el tiempo (en minutos) hasta el primer episodio hipoglucémico (definido como glucosa < 60 mg/dL (< 3,33 mmol/L) durante un ayuno

controlado, que terminará cuando se produzca hipoglucemia o se alcancen 15 horas. La dosificación de un paciente individual también se puede ajustar a medida que se monitorea el progreso de la enfermedad.

En algunas realizaciones, el rAAV se administra a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente $1,0 \times 10^{11}$ copias del genoma por kilogramo de peso corporal del paciente (GC/kg) a aproximadamente 1×10^{14} GC/kg, aproximadamente 5×10^{11} copias del genoma por kilogramo de peso corporal del paciente (GC/kg) a aproximadamente 5×10^{13} GC/kg, o aproximadamente 1×10^{12} a aproximadamente 1×10^{13} GC/kg, medido por qPCR o PCR digital de gotas (ddPCR). En algunas realizaciones, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 2×10^{12} GC/kg. En algunas realizaciones, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 6×10^{12} GC/kg. En algunas realizaciones, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{13} GC/kg. El rAAV puede administrarse en una dosis única o en dosis múltiples (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis) según sea necesario para obtener los resultados terapéuticos deseados.

Las dosis pueden administrarse una o más veces a la semana, al mes o al año, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Por ejemplo, cada dosis puede administrarse con un intervalo mínimo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 3 meses, 6 meses o 1 año. Los expertos en la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosis en función de los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del constructo o complejo objetivo en fluidos corporales o tejidos.

V. Métodos para aumentar el rendimiento viral recombinante y la eficacia de la terapia génica

La invención actual también proporciona un método para aumentar el rendimiento de un virus recombinante de las células hospederas, en donde el método comprende la eliminación de uno o más elementos Alu o secuencias relacionadas con elementos Alu de un vector viral recombinante. En algunas realizaciones, la secuencia relacionada con el elemento Alu es al menos 50 % idéntica a un elemento Alu, por ejemplo, seleccionado de los nucleótidos contiguos 934 - 1127 (Alu - 1), 1488 - 1823 (Alu - 2), y 1995 - 2350 (Alu - 3) de la SEQ ID NO: 6. El vector viral recombinante puede ser, por ejemplo, un vector de lentivirus, un vector de retrovirus, un vector de adenovirus, o un vector de virus adenoasociado (AAV). En algunas realizaciones, uno o más elementos de Alu o secuencias relacionadas con elementos de Alu se eliminan de una región de promotor/potenciador dentro del vector viral. En algunas realizaciones, uno o más elementos de Alu o secuencias relacionadas con elementos de Alu se eliminan de una región de intrón dentro del vector viral. En alguna realización, la eliminación de los elementos de Alu o secuencias relacionadas con elementos de Alu reduce las estructuras auto-complementarias formadas durante el empaque de las partículas virales recombinantes y, por lo tanto, mejora el rendimiento viral de las células hospederas.

A lo largo de la descripción, donde las composiciones se describen como que tienen, incluyen, o comprenden componentes específicos, o donde los procesos y métodos se describen como que tienen, incluyen, o comprenden pasos específicos, se contempla que, además, existen composiciones de la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en los componentes enumerados, y que existen procesos y métodos de acuerdo con la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en, los pasos de procesamiento enumerados.

En la solicitud, cuando se dice que un elemento o componente se incluye y/o selecciona de una lista de elementos o componentes enumerados, debe entenderse que el elemento o componente puede ser cualquiera de los elementos o componentes enumerados, o bien, el elemento o componente se puede seleccionar de un grupo formado por dos o más elementos o componentes enumerados.

Además, debe entenderse que los elementos y/o características de una composición o un método descrito en la presente pueden combinarse de diversas maneras sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención, ya sea de manera explícita o implícita en la presente. Por ejemplo, cuando se hace referencia a un compuesto en particular, dicho compuesto puede utilizarse en diversas realizaciones de composiciones de la presente invención y/o en métodos de la presente invención, a menos que se entienda lo contrario en el contexto. En otras palabras, dentro de esta aplicación, las realizaciones han sido descritas y representadas de una manera que permite escribir y dibujar una aplicación clara y concisa, pero se pretende y se entenderá que las realizaciones puedan combinarse o separarse de diversas formas sin separarse de las enseñanzas e inventos actuales. Por ejemplo, se entenderá que todas las características descritas y representadas en la presente pueden ser aplicables a todos los aspectos de la invención o invenciones descritas y representadas en la presente.

Debe entenderse que la expresión "al menos uno de" incluye individualmente cada uno de los objetos enumerados después de la expresión y las diversas combinaciones de dos o más de los objetos enumerados a menos que se entienda lo contrario a partir del contexto y el uso. Debe entenderse que la expresión "y/o" en relación con tres o más objetos enumerados tiene el mismo significado a menos que se entienda lo contrario a partir del contexto.

El uso del término "incluir", "incluye", "incluyendo", "tener", "tiene", "contener", "contiene", o "conteniendo", incluyendo equivalentes gramaticales de los mismos, debe entenderse generalmente como abierto y no limitativo, por ejemplo, sin excluir elementos o pasos adicionales no recitados, a menos que se indique específicamente o se entienda lo contrario a partir del contexto.

Cuando el uso del término "aproximadamente" sea anterior a un valor cuantitativo, la presente invención también incluye

el valor cuantitativo específico en sí, a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se utiliza en la presente, el término “aproximadamente” se refiere a una variación de $\pm 10\%$ del valor nominal a menos que se indique lo contrario o se deduzca.

5 Debe entenderse que el orden de los pasos o el orden para llevar a cabo ciertas acciones es inmaterial, siempre y cuando la presente invención permanezca operativa. Además, se pueden llevar a cabo dos o más pasos o acciones simultáneamente.

10 El uso de cualquier y todos los ejemplos, o lenguaje que denota ejemplo, por ejemplo, “tal como” o “que incluye/incluyendo”, tiene la intención meramente de ilustrar mejor la presente invención y no representa una limitación en el alcance de la invención a menos que se reclame lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse en el sentido de que indica que algún elemento no reclamado es esencial para la práctica de la presente invención.

15 Ejemplos

La invención que ahora se describe de manera general, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no tiene la intención de limitar la invención.

20 Ejemplo 1 - Vectores AAV y rAAV producidos a partir de los vectores

Vector AAV

25 Se construyó un vector AAV que incluía un casete de expresión G6PC delimitado por dos repeticiones terminales invertidas AAV2 (ITR, SEQ ID NO: 15). El casete de expresión G6PC fue definido en su extremo 5' del promotor/potenciador de G6PC (GPE) por la secuencia de cebador “1S” enumerada en Yiu et al., 2010, *Molecular Therapy* 18(6): 1076-84 y su sitio asociado de la endonucleasa de restricción KpnI. El casete de expresión G6PC fue definido en su extremo de la señal de poliadenilación tardía de SV40 3' por alineamiento con el genoma SV40 y un sitio asociado de la endonucleasa de restricción Sall. Todos los casetes de expresión G6PC contienen un GPE, un intrón, un gen G6PC humano optimizado por codones y una cola de poli A tardía de SV40, como se ilustra en la FIGURA 1A. Se crearon diferentes versiones de los casetes de expresión G6PC, cada uno de los cuales contiene un GPE tipo silvestre, o un GPE modificado como se ilustra en la FIGURA 1B. Los elementos de los casetes de expresión G6PC se describen a continuación.

35 El promotor/potenciador de G6PC tipo silvestre (GPE, SEQ ID NO: 6) es del *Homo sapiens*, y definido por RefSeq NG_011808. Esta secuencia es el promotor endógeno del gen G6PC humano, y tiene actividad casi exclusiva en el hígado y actividad mínima en el riñón. El GPE tipo silvestre contiene 3 elementos Alu, ubicados en los nucleótidos contiguos 934 - 1127 (Alu - 1), 1488 - 1823 (Alu - 2) y 1995 - 2350 (Alu - 3) de la SEQ ID NO: 6. El vector AAV DTC 161 contiene un casete de expresión G6PC que comprende el GPE tipo silvestre. El vector AAV DTC175 contiene un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de las secuencias Alu - 1 y Alu - 2. El vector AAV DTC176 contiene un casete de expresión G6PC que comprende un GPE en el que se invierten las orientaciones de las secuencias Alu - 1 y Alu - 2. El vector AAV DTC177 (representado por la SEQ ID NO: 1) contiene un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de las secuencias Alu - 1, Alu - 2, y Alu - 3. El vector AAV DTC178 contiene un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de la secuencia Alu - 3. El vector AAV DTC 179 contiene un casete de expresión G6PC que comprende un GPE en el que se invierte la orientación de la secuencia Alu - 3.

50 El intrón quimérico (SEQ ID NO: 13) está compuesto por el sitio donante 5' del primer intrón del gen β -globina humano, y la rama y el sitio aceptor 3' del intrón de una región variable de cadena pesada del gen de la inmunoglobulina. Las secuencias de los sitios donantes y aceptores, junto con el sitio de punto de ramificación, se han cambiado para que coincidan con las secuencias de consenso para el empalme (CI-neo Mammalian Expression Vector Technical Bulletin TB215, Promega Life Sciences Corporation). El propósito del intrón quimérico es mejorar la expresión génica.

55 El ADNc de G6PC (SEQ ID NO: 4) es de *Homo sapiens*, y está optimizado por codones para la expresión en células humanas. La optimización por codones se realizó en el ADNc humano de G6PC utilizando la tecnología de optimización por codones OptimumGene™ patentada (GenScript, Piscataway, NJ). Las secuencias de ADNc optimizadas fueron examinadas y modificadas para eliminar posibles marcos alternativos de lectura (ARF) de secuencias internas de ATG no en marco que teóricamente podrían codificar péptidos de 9 o más aminoácidos en longitud. Por ejemplo, un ADNc G6PC optimizado por codones está representado por la SEQ ID NO: 3.

60 La señal de poliadenilación tardía del virus símico 40 (SV40) (Genbank # J02400, SEQ ID NO: 14) Proporciona una secuencia *cis* para la poliadenilación eficiente del ARNm G6PC. Este elemento funciona como una señal para un evento de escisión específico en el extremo 3' de la transcripción naciente y la adición de una larga cola de poliadenilo.

65 Cada casete de expresión G6PC fue clonado en un vector AAV. Todos los vectores AAV tenían una cadena principal que codificaba el gen de resistencia a la kanamicina. Un vector AAV DTC161 (pDTX.hG6PCco.401) se ilustra en la FIGURA 2 como un ejemplo.

Viriones rAAV

5 El genoma vectorial AAV es un genoma de ADN de cadena única. Sólo las secuencias entre e inclusivas de las secuencias ITR se empaquetan en el virion AAV. Los viriones fueron producidos por transfección de tres plásmidos en células del riñón embrionario humano 293 (HEK293), que proporcionan productos de los genes E1a y E1b. El primer plásmido es el vector AAV descrito en la presente. El segundo plásmido es pAAV2-8.KanR (p2123-FH), un plásmido de empaque que contiene los genes de AAV2 rep y AAV8 cap de tipo silvestre. El tercer plásmido es pAdDeltaF6 (KAN), un plásmido auxiliar de adenovirus.

10 El plásmido Rep/Cap adenoasociado pAAV2/8.KanR(p2123-FH) (8354 pb) codifica las cuatro proteínas de replicación viral AAV2 tipo silvestre (Rep) y las tres proteínas de cápside VP (cap) tipo silvestre del serotipo 8. Una ilustración del plásmido pAAV2/8.KanR (p2123-FH) se muestra en la FIGURA 3. Dentro del plásmido, el promotor AAV p5 que normalmente impulsa la expresión del gen Rep se ha movido desde el extremo 5' de la región Rep al extremo 3' de la región Cap AAV8. Esta disposición introduce un espaciador entre el promotor y el gen Rep (es decir, la cadena principal del plásmido) que da como resultado una regulación a la baja de la expresión de Rep y un aumento en la capacidad de soportar la producción de rAAV de alto título. El gen para la resistencia a la kanamicina y el origen MB1 se incluyen para la producción de plásmido en *E. coli*.

20 El plásmido pAdDeltaF6(Kan) contiene las regiones del genoma de adenovirus que son importantes para la replicación de AAV, específicamente, E2A, E4 y ARN VA (FIGURA 4). Las funciones de adenovirus E1 también son necesarias, pero son proporcionadas por las células hospederas HEK293. El plásmido no contiene otra replicación de adenovirus, genes estructurales, o los elementos cis críticos para la replicación de adenovirus, tal como ITR adenovirales, y, por lo tanto, no se espera que se genere adenovirus infeccioso. El gen para la resistencia a la kanamicina y el origen MB1 se incluyen para la producción de plásmido en *E. coli*.

Ejemplo 2 - La delección de elementos Alu mejora el rendimiento de rAAV

30 Se utilizaron vectores AAV que contenían el GPE tipo silvestre o un GPE modificado para transfectar las células HEK293 con el plásmido Rep/Cap y el plásmido auxiliar descrito anteriormente.

35 El GPE modificado contiene elementos Alu eliminados (en los vectores DTC175, DTC177 y DTC178) o elementos Alu invertidos en su dirección (en los vectores DTC176 y DTC179). El vector viral DTC175 comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de las secuencias Alu - 1 y Alu - 2, el vector viral DTC176 comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE en el que están presentes los tres elementos Alu, pero las orientaciones de las secuencias Alu - 1 y Alu - 2 se invierten, el vector viral DTC177 comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de las secuencias Alu - 1, Alu - 2 y Alu - 3, el vector viral DTC178 comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE con una delección de la secuencia Alu - 3, y el vector viral DTC179 comprende un casete de expresión G6PC que comprende un GPE en el que están presentes los tres elementos Alu, pero la orientación de la secuencia Alu - 3 se invierte).

45 El día 5 después de la co-transfección, las células infectadas se lisaron durante 2 horas a 37 °C en la disolución amortiguadora de lisis que contenía desoxicolato de sodio y Benzonase®. El sobrenadante de las muestras se digirió secuencialmente con DNasa I y Proteinasa K para liberar el ADN genómico rAAV. A continuación, se utilizó qPCR TaqMan amplificando la región codificante de BGH-poliA del vector AAV para determinar el número de copia del genoma (GC) rAAV basado en una curva estándar de plásmido rAAV. La FIGURA 5 es un gráfico de barras que muestra los títulos de rAAV producidos a partir de células hospederas después de la transfección de varios vectores AAV. La FIGURA 5 muestra los títulos de rAAV medidos por qPCR, y sugiere que la delección de uno o más de los elementos Alu del GPE (en los vectores DTC175, DTC177 y DTC178) aumentó significativamente el rendimiento de rAAV en comparación con DTC161, que contiene el GPE tipo silvestre. Sin embargo, la reversión de uno o más de los elementos Alu (en vectores DTC176 y DTC179) no mejoró el rendimiento de rAAV en comparación con DTC161. La cuantificación del rendimiento viral se resume en la Tabla 1. Como se muestra en la Tabla 1, la delección de uno o más elementos Alu del GPE mejora significativamente el rendimiento de rAAV. Un segundo análisis que muestra los títulos de rAAV producidos como una función del tamaño del genoma del vector se presenta como un gráfico en la FIGURA 6. La FIGURA 6 muestra que el genoma vectorial tiene el tamaño más pequeño, DTC177 (representado por la SEQ ID NO: 1), produjo los títulos más altos.

Tabla 1: Resumen de cuantificación de los rendimientos virales producidos a partir de células HEK293 después de la transfección de vectores AAV (DTC161, DTC175, DTC176, DTC177, DTC178 o DTC179).

Nombre de la muestra	Contenido de Alu	Tamaño del genoma (pb)	Rendimiento bruto (pliegue sobre DTC161)	GC/mL promedio después de la cromatografía de afinidad (doblado sobre DTC161)
DTC161	Todos los 3	4768	1,20e10	4,72E+12
DTC 175	1+2 delección	4238	1,58e10 (1,3)	9,50E+12 (2,0)

Nombre de la muestra	Contenido de Alu	Tamaño del genoma (pb)	Rendimiento bruto (pliegue sobre DTC161)	GC/mL promedio después de la cromatografía de afinidad (doblado sobre DTC161)
DTC 176	Todos los 3	4768	1,15e10 (0,9)	4,95E+12 (1,1)
DTC 177	1+2+3 deleción	3882	2,22e10 (1,9)	9,75E+12 (2,1)
DTC 178	3 deleción	4412	1,70e10 (1,4)	8,22E+12 (1,7)
DTC 179	Todos los 3	4768	0,98e10 (0,8)	3,56E+12 (0,8)

Ejemplo 3 - La deleción de elementos Alu mejora el empaque de rAAV

5 Con el fin de evaluar si la deleción de uno de más elementos de Alu tiene un impacto en el empaque de los rAAV, los rAAV producidos como se describe en el Ejemplo 2 se recolectaron y el ADN total se aisló de cada rAAV (producido a partir de un vector viral de control, DTC161, DTC175, DTC176, DTC177, DTC178, o DTC179). Aproximadamente, la cantidad total de $7,12 \times 10^{10}$ de cada GC de rAAV fue sometida a electroforesis en gel de agarosa, y posteriormente fue teñida con SYBR Gold. El vector viral de control utilizado en este experimento fue AAV8-LSP-hFIXco3-WPRE-pA (generado en Virovek, purificación personalizada, catálogo/lote # 150282 de 061015), que proporcionó migración de tamaño de ADN conocido en el gel, y la confirmación de que el método experimental era capaz de alterar la integridad de la cápside AAV y liberar el ADN empaquetado.

10 Como se muestra en la FIGURA 7, los ADN virales de longitud completa estaban entre 3,8 kb - 5 kb. '*' denota la degradación de la cápside y el genoma intacto del ADN de longitud completa aislado del vector viral de control tras el tratamiento con dodecil sulfato de sodio (SDS).

15 Se observó una mayor intensidad de tinción del ADN de longitud completa aislado de rAAV de DTC177, DTC175 y DTC178 en donde se eliminaron uno o más elementos de Alu del GPE (véase la FIGURA 7). Este resultado sugiere que la deleción de al menos un elemento Alu mejora el empaque de rAAV del genoma viral de longitud completa. Por otra parte, las trazas analíticas de ultracentrifugas de partículas DTC161 y DTC177 analizadas para partículas vacías (que aparecen aproximadamente en 60S) y de ADN de vector completo (que aparecen aproximadamente en 100S), respectivamente, demostraron que el constructo con los elementos Alu eliminados produjo un mayor porcentaje de partículas completas (véanse las FIGURAS 8A-8B). La FIGURA 8A es un gráfico que muestra trazas de ultracentrifugas analíticas de densidades de partículas de la preparación del vector DTC161 producido en células HEK293. La FIGURA 8B es un gráfico que muestra trazas de ultracentrifugas analíticas de densidades de partículas del vector DTC177 (representado por la SEQ ID NO: 1) preparación producida en células HEK293.

Estos datos indican que el empaque mejorado se produce en vectores que carecen de secuencias Alu.

30 Ejemplo 4 - La deleción de elementos Alu en GPE no afecta la potencia del promotor

Con el fin de evaluar si la deleción de uno o más de los elementos Alu afecta la potencia de GPE para dirigir la expresión del gen G6PC *in vivo*, se utilizaron rAAV derivados de diferentes vectores (mostrados en la Tabla 2) para infectar las células hepáticas HuH7. Después de 48 horas de infección, las células se lisaron y se recolectó el ARNm total. La expresión del ARNm G6PC se analizó por RT-PCR cuantitativa. Las FIGURAS 9A-9B presenta curvas dosis-respuesta ejemplares entre la dosis de rAAV y el nivel de expresión de ARNm de G6PC en células hepáticas HuH7 para rAAV derivados de DTC161 y DTC177 (representado por la SEQ ID NO: 1). La FIGURA 9A es una curva dosis-respuesta para la expresión inducida de G6Pasa- α después de la infección con rAAV que contiene DTC161. La FIGURA 9B es una curva dosis-respuesta para la expresión inducida de G6Pasa- α después de la infección con rAAV que contiene DTC177 (representado por la SEQ ID NO: 1). Para calcular la potencia relativa de una muestra de prueba, los valores de ARN (copias genómicas por μg de ARN total) en cada multiplicidad de infección (MOI) para ambos estándares de referencia (rAAV derivado de un vector DTC161 producido por lotes de desarrollo) y la muestra de prueba se añadieron a un molde de archivo GraphPad Prism. El molde utiliza una transformación log-log de los datos y un ajuste lineal que está restringido para que las curvas tengan una pendiente compartida. El eje Y corresponde a los valores de ARN, y el eje X corresponde al MOI de la muestra. Los datos de Intercepto Y y la pendiente generados por el molde GraphPad Prism se utilizaron para determinar los interceptos X del estándar de referencia y la muestra de prueba mediante la implementación de la siguiente fórmula: $X_{\text{Int}} = (0 - [\text{Intercepto Y}]) / \text{Pendiente}$. El valor de potencia relativa final se determina comparando los interceptos X utilizando la siguiente fórmula: $10^{([\text{Intercepto X de referencia}] - [\text{intercepto X de muestra}])}$.

50 Tabla 2. Resumen de la potencia relativa de GPE en cada muestra de rAAV.

Muestra	Potencia relativa
DTC-161	80 %
DTC-175	83 %

Muestra	Potencia relativa
DTC-176	79 %
DTC-177	89 %
DTC-178	75 %
DTC-179	85 %

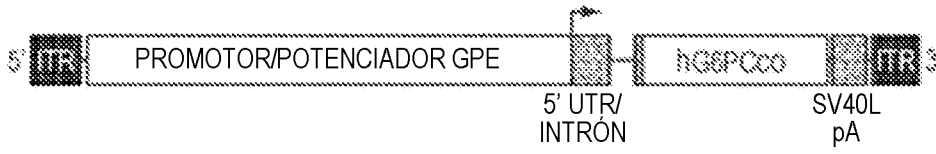
Este resultado sugiere que la delección de uno o más elementos Alu en GPE (en vectores DTC175, DTC177 y DTC178) no compromete la potencia del GPE para impulsar la expresión del gen G6PC *in vivo*.

- 5 Se debe entender que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará incluido en las reivindicaciones anexas.

- 10 Cabe señalar que como se utiliza en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Además, los términos “un” (o “una”), “uno o más” y “al menos uno” se pueden usar indistintamente en la presente. También se debe observar que los términos “comprende”, “comprender”, “contiene”, “incluye” y “tiene” se pueden usar indistintamente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de promotor/potenciador de G6PC (GPE) modificado, en donde la secuencia de GPE modificado carece de una o más secuencias al menos 80 % idénticas a un elemento Alu, en donde dicho elemento Alu se selecciona de los nucleótidos contiguos 934 - 1127 (Alu - 1), 1488 - 1823 (Alu - 2), y 1995 - 2350 (Alu - 3) de la SEQ ID NO: 6.
- 10 2. La molécula de ácido nucleico recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde la secuencia de GPE modificado tiene una secuencia al menos 80 % idéntica a los nucleótidos contiguos 146 - 2123 de la SEQ ID NO: 1, o al menos 80 % idéntica a cualquiera de la SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, o 12.
- 15 3. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de promotor/potenciador de G6PC (GPE) modificado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, y una secuencia codificante de G6Pasa- α , en donde la secuencia de GPE modificado es capaz de dirigir la expresión de la secuencia codificante de G6Pasa- α .
- 20 4. La molécula de ácido nucleico recombinante de conformidad con la reivindicación 3, en donde la secuencia codificante de G6Pasa- α comprende una secuencia idéntica a la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.
- 25 5. La molécula de ácido nucleico recombinante de conformidad con la reivindicación 3 o 4, en donde la molécula de ácido nucleico recombinante comprende además una secuencia de señal de poliadenilación (poliA) y/o un intrón.
- 30 6. La molécula de ácido nucleico recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde la molécula de ácido nucleico recombinante comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
- 35 7. Un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-6.
- 40 8. El vector recombinante de conformidad con la reivindicación 7, en donde el vector es un vector de virus adenoasociado (AAV).
- 45 9. El vector recombinante de conformidad con la reivindicación 8, en donde el vector AAV es un vector AAV de serotipo 8 (AAV8).
- 50 10. Una célula hospedera aislada que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el vector recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9.
- 55 11. Un método para aumentar el rendimiento de rAAV, que comprende suministrar el vector recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 o 9 a un cultivo de células hospederas eucariotas y recolectar el rAAV del cultivo de células eucariotas.
- 60 12. Una composición que comprende el vector recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8 y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. La composición de conformidad con la reivindicación 12 o el vector recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 o 9, para usarse en un método de tratamiento de la enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia) en un sujeto humano, en donde el método comprende administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz del vector recombinante o la composición del mismo.
14. La composición o el vector recombinante para el uso de conformidad con la reivindicación 13, en donde el método de tratamiento de la enfermedad del almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia) en un sujeto humano comprende administrar el vector recombinante a una dosis de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 1×10^{14} copias genómicas (GC)/kg.
15. Un virus adenoasociado recombinante (rAAV) para el tratamiento de GSD-Ia, en donde dicho AAV comprende una cápside AAV y un genoma vectorial empaquetado en el mismo, en donde dicho genoma vectorial comprende:
 (a) una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) AAV 5';
 (b) una secuencia de promotor/potenciador que comprende los nucleótidos contiguos 146 - 2123 de la SEQ ID NO: 1;
 (c) una secuencia codificante que codifica una glucosa-6-fosfatasa alfa (G6Pasa- α); y
 (d) una ITR AAV 3'.
16. El rAAV de conformidad con la reivindicación 15, en donde la G6Pasa- α comprende una secuencia de aminoácidos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 5 y/o la secuencia codificante que codifica la G6Pasa- α es al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.



ABREVIATURAS: GPE, REGIÓN DE PROMOTOR/POTENCIADOR DE G6Pasa; hG6PCco, REGIÓN CODIFICANTE DE GLUCOSA-6-FOSFATASA HUMANA (OPTIMIZADA POR CODONES); ITR, REPETICIÓN TERMINAL INVERTIDA; SV40L pA, SEÑAL DE POLIADENILACIÓN TARDÍA DE SV40; UTR. REGIÓN NO TRADUCIDA

FIG. 1A

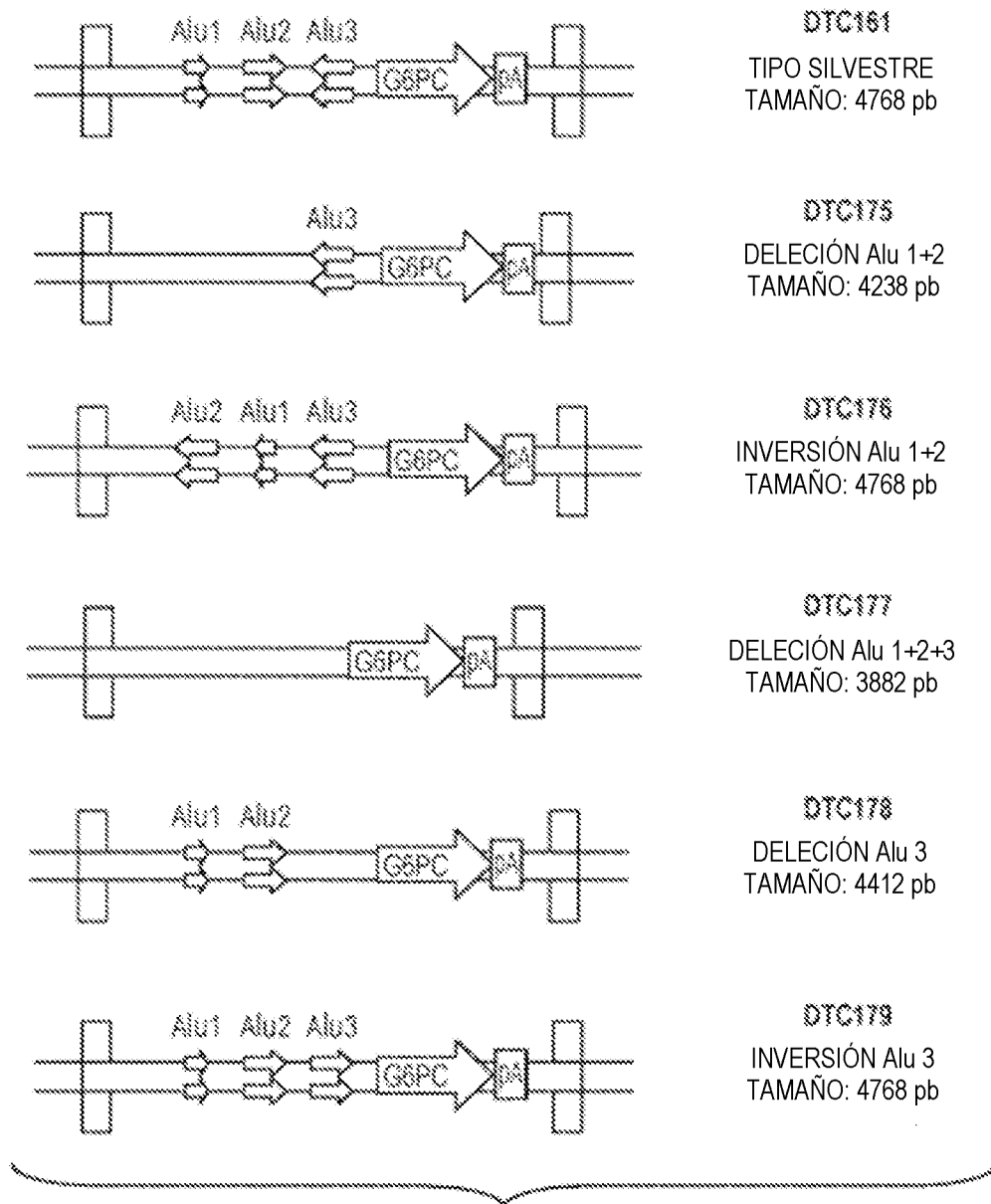
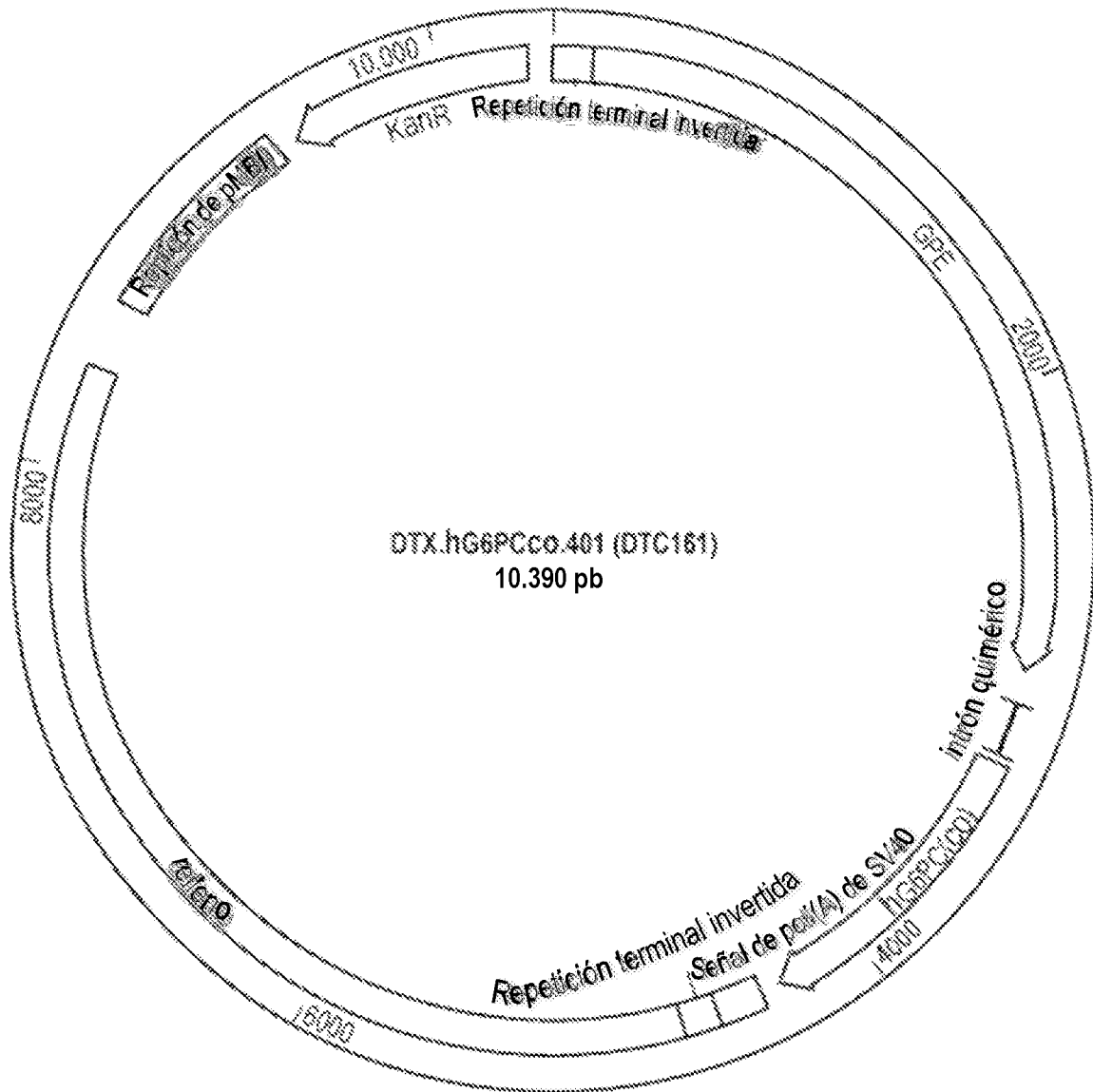


FIG. 1B



CARACTERÍSTICAS DE pDTX.hG6PC.401

TIPO	INICIO	FIN	DESCRIPCIÓN
REGIÓN	1	145	REPETICIÓN TERMINAL INVERTIDA (ITR)
REGIÓN	146	3.009	PROMOTOR/POTENCIADOR DE G6PC (GPE)
REGIÓN	3.010	3.331	INTRÓN QUIMÉRICO
GEN	3.332	4.405	ADNc OPTIMIZADO POR CODONES DE hG6PC
REGIÓN	4.426	4.623	SEÑAL DE POLIADENILACIÓN TARDÍA DE SV40
REGIÓN	4.624	4.768	REPETICIÓN TERMINAL INVERTIDA (ITR)

FIG. 2

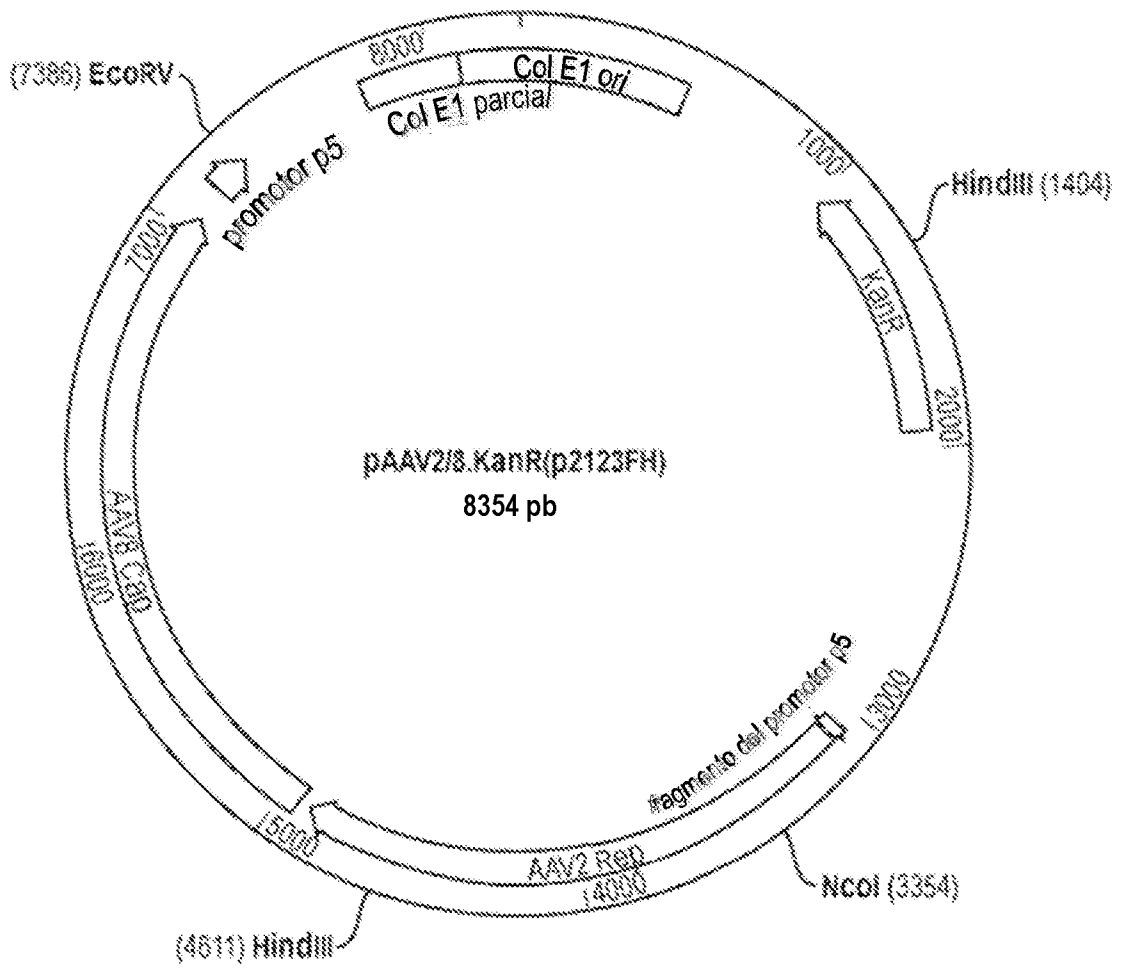


FIG. 3

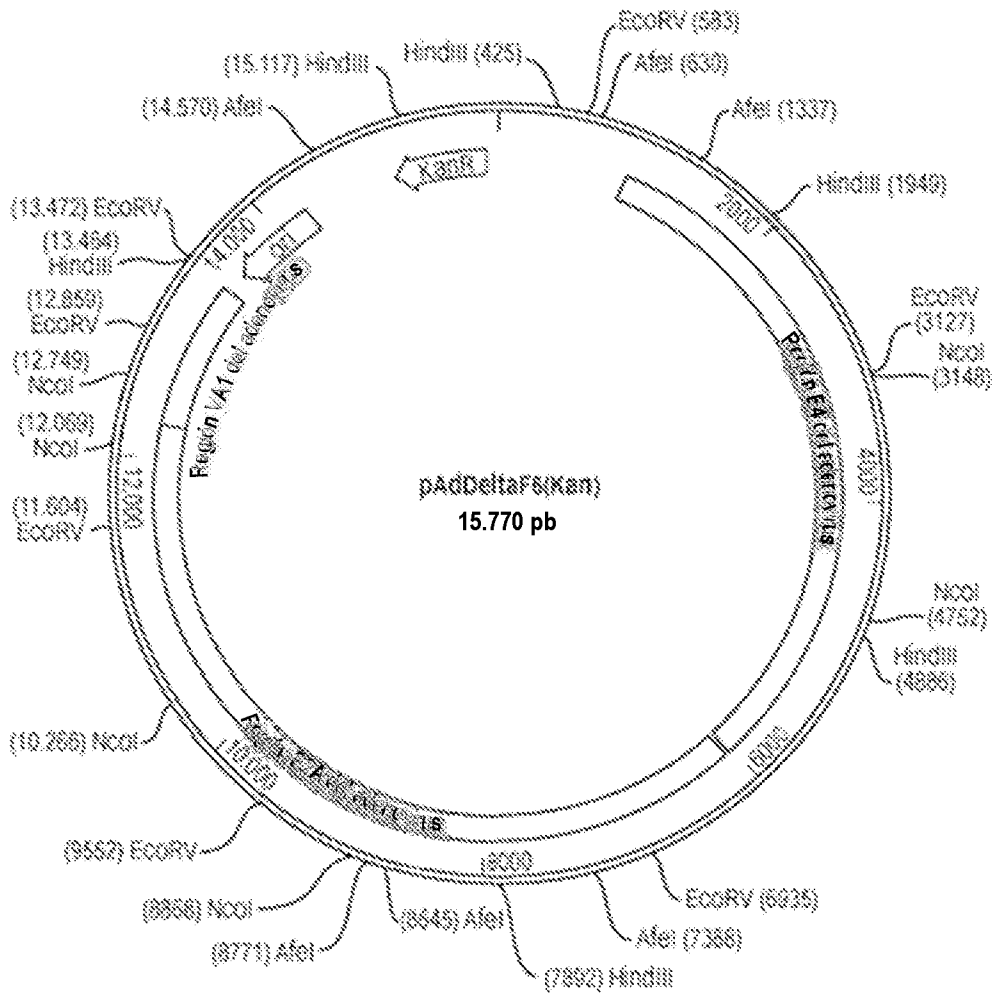


FIG. 4

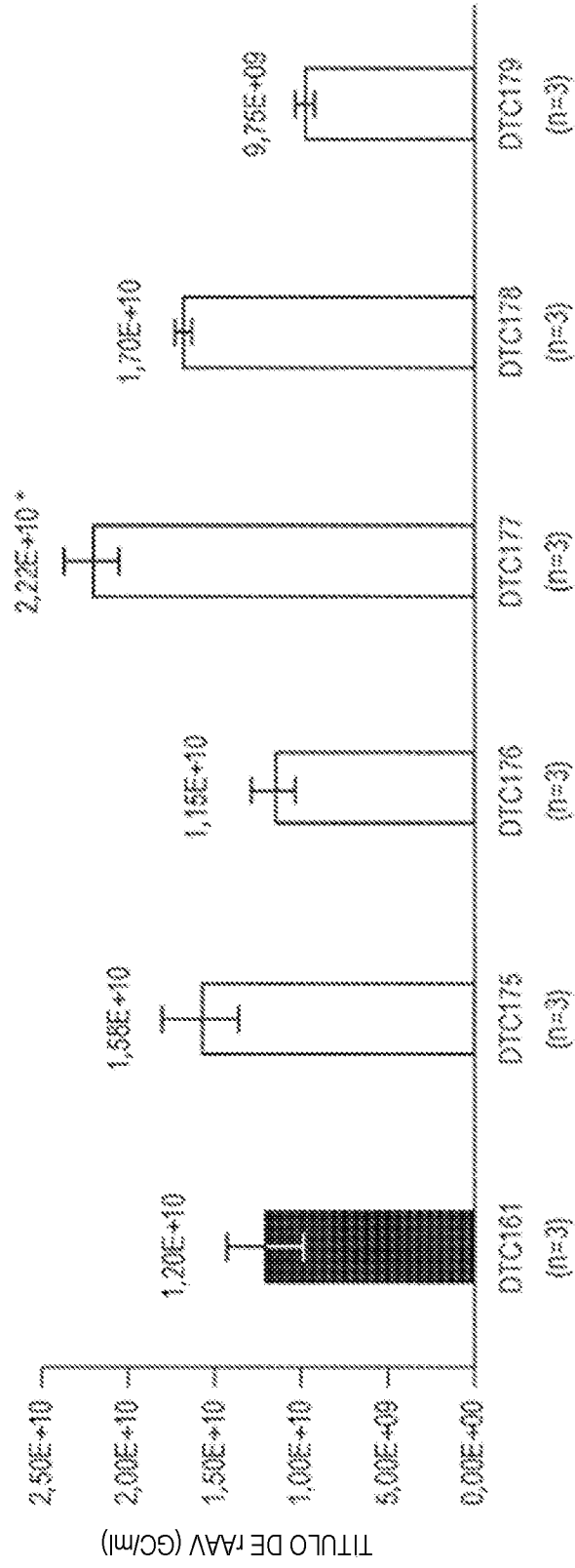


FIG. 5

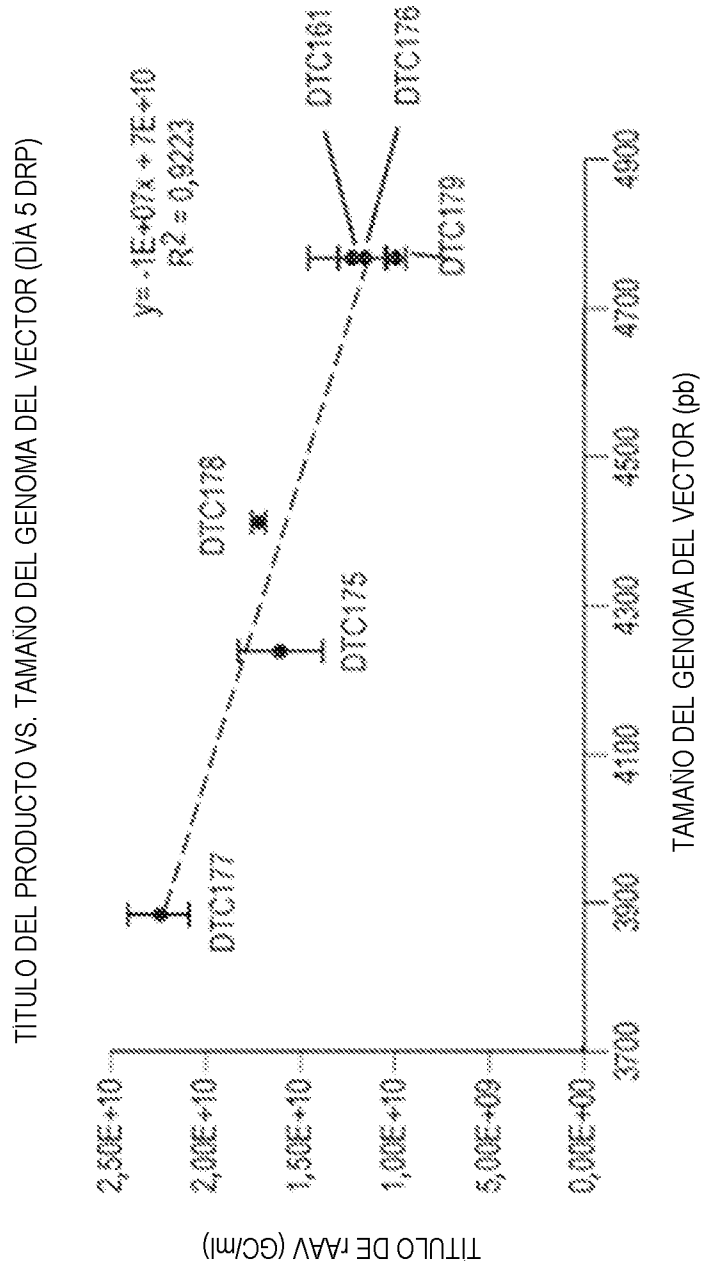


FIG. 6

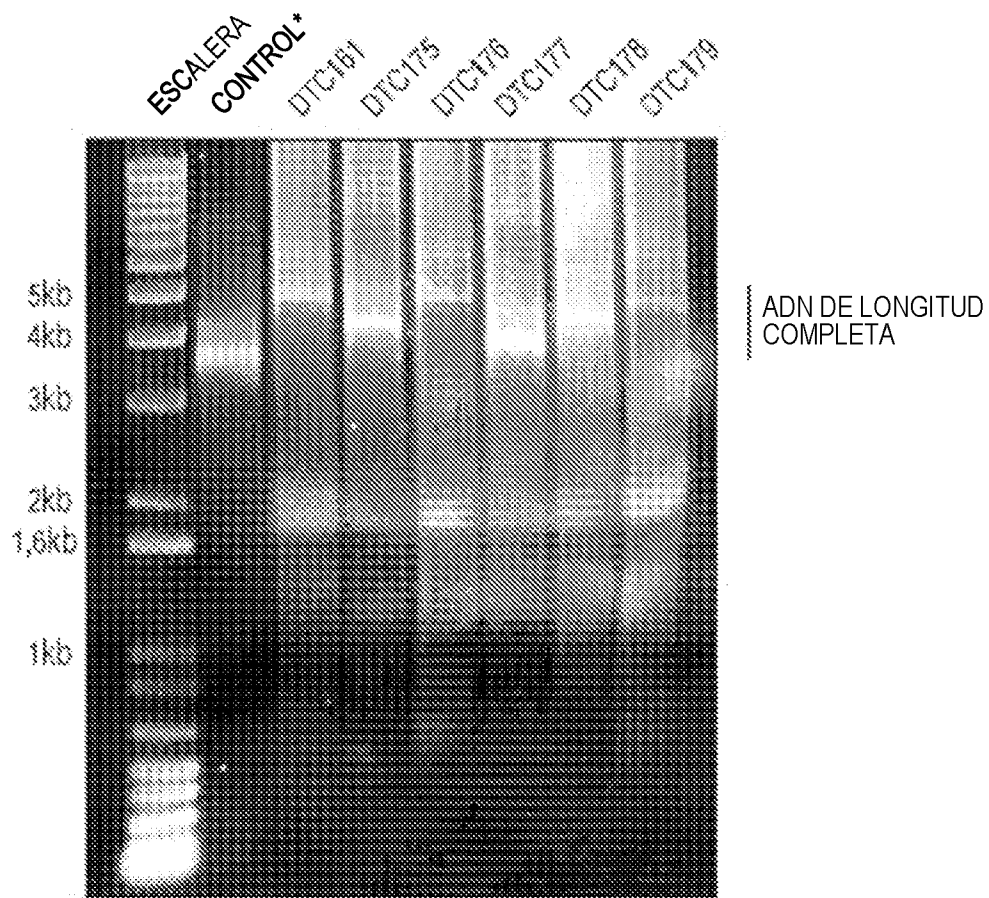


FIG. 7

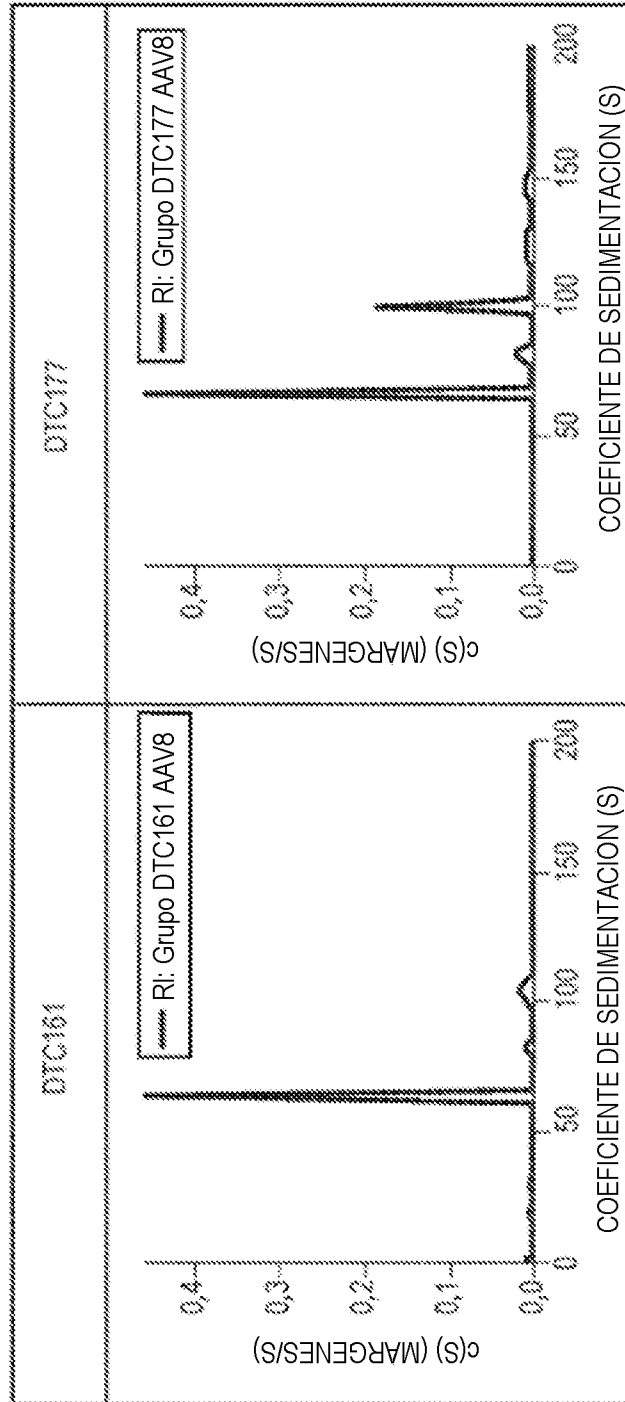


FIG. 8B

FIG. 8A

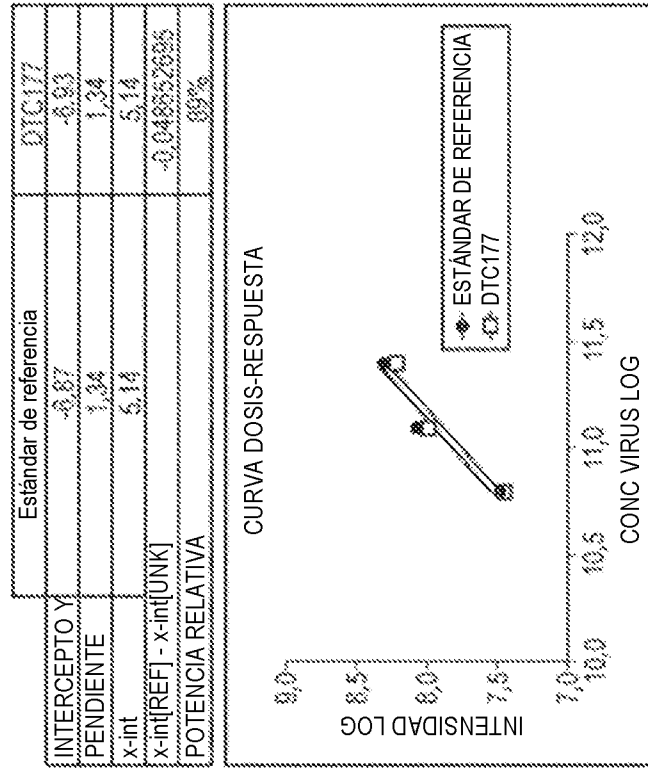


FIG. 9B

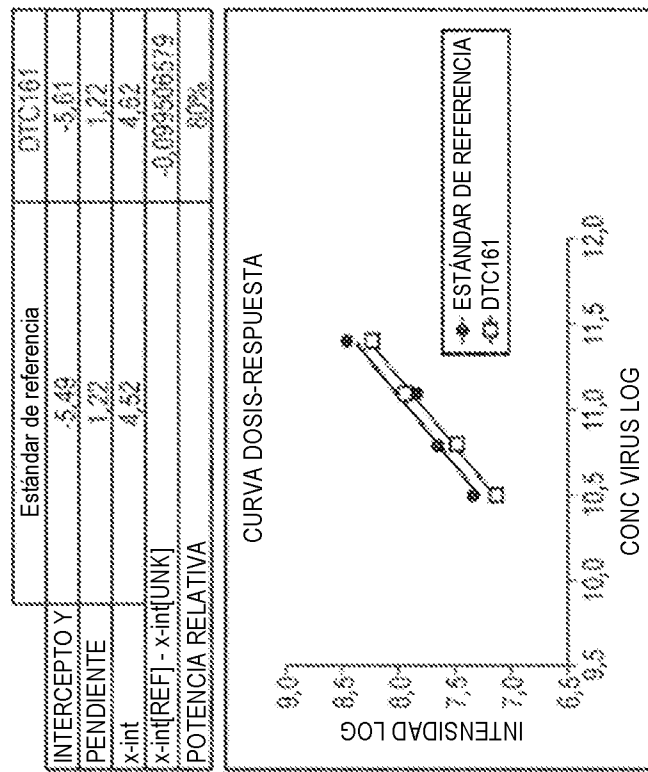


FIG. 9A