



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-076254- -00000-0000

Fecha: 2012-05-09 15:30:30

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 261

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: CONSTRUCTO DE VECTOR VIRICO NOVEDOSO PARA SINTESIS DOPA CONTINUA OPTIMIZADA ESPECIFICA DE NEURONAS IN VIVO.

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL: A61K 48/00

71. SOLICITANTE: GENEPOD THERAPEUTICS AB

DOMICILIO: Lund, Suecia.

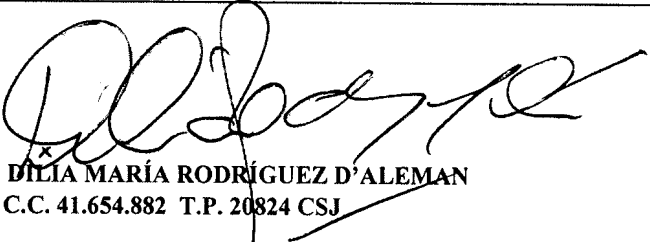
74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO No. 12-076254- -00000-0000 Fecha: 2012-05-09 15:30:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 261
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/EP2010/067155	Fecha 09 de Noviembre de 2010
	Publicación Internacional No.	WO 2011/054976 A2	Fecha 12 de mayo de 2011
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
	CONSTRUCTO DE VECTOR VÍRICO NOVEDOSO PARA SÍNTESIS DOPA CONTINUA OPTIMIZADA ESPECÍFICA DE NEURONAS IN VIVO		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 48/00		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
	GENEPOD THERAPEUTICS AB		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN: c/o Tomas Björklund, Östra Vallgatan 59A, S-223 61 Lund ,		No. TELÉFONO:
	CIUDAD: Lund,		CORREO ELECTRONICO:
	PAÍS DE RESIDENCIA: Suecia		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Suecia
7	INVENTOR (ES)		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. BJÖRKLUND,	Tomas	Sueco
	2. BJÖRKLUND,	Anders	Sueco
	3. KIRIK,	Deniz	Sueco
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
	1. Suecia		Lund
	2. Suecia		Lund
	3. Suecia		Lund
	DIRECCIÓN		
	Östra Vallgatan 59A, S-223 61		
	Lilla Sigridsgatan 2, S-223 50		
	Vipemöllevägen 103, S-224 66		
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
	☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	RODRÍGUEZ D'ALEMAN	DILIA MARÍA	C.C. 41.654.882 T.P.20824 CSJ
	DIRECCIÓN	Carrera 11 No. 86-53, Piso 6	No. TELÉFONO 6181088
	CIUDAD	Bogotá D.C.	CORREO ELECTRÓNICO clarkemodet@clarkemodet.com.co
	PAÍS	Colombia	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
	1. Estados Unidos de América	US	61/259.502
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2009/11/09

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 12-43374 // 12-45491	Fecha 03/05/2012 09/05/2012
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 20824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción 2. ☒ Reivindicaciones 3. ☒ Dibujos y/o figuras 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.		9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

**CONSTRUCTO DE VECTOR VÍRICO NOVEDOSO PARA SÍNTESIS DOPA CONTINUA
OPTIMIZADA ESPECÍFICA DE NEURONAS IN VIVO**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a constructos de vector vírico especialmente constructos de vector rAAV sencillos que comprenden secuencias de polinucleótido que codifican dos polipéptidos a expresarse diferencialmente en una célula objetivo. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho vector y al suministro en tejido cerebral humano y al uso médico de dicho vector para el tratamiento de enfermedades asociadas con disfunción de catecolamina. En particular, la invención se refiere al tratamiento de enfermedades asociadas con deficiencia de dopamina, tal como mal de Parkinson y trastornos relacionados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El mal de Parkinson afecta a personas desde 30 años de edad y mayores. La edad media al inicio es de aproximadamente 60 años. Los principales síntomas clínicos son rigidez, bradiquinesia y temblor en reposo. Además, la enfermedad puede mostrar un intervalo de otros síntomas tales como hipotensión, insuficiencia cognitiva, inestabilidad de posición, y muchos más.

La enfermedad es principalmente un trastorno de ganglios basales causada por la degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal en el cerebro (células nerviosas que usan dopamina (DA) como su sustancia de señalización, localizada en la sustancia negra del tallo cerebral que se proyecta al putamen y

000002

núcleo caudado). El trastorno es progresivo durante muchos años.

El estándar de tratamiento actual se basa en la sustitución de dopamina por la adición de L-dopa (que se convierte en dopamina en el cerebro), u otros agentes que estimulan el receptor de dopamina. Aunque las estrategias de tratamiento actuales que apuntan a la sustitución de la deficiencia de dopamina son a menudo muy eficientes en la fase temprana de la enfermedad (hasta 7-10 años), eventualmente la mayoría de los pacientes comienza a experimentar una disminución en la respuesta al tratamiento y eventos adversos incrementados. El más problemático de estos es las disquinesias inducidas por L-dopa que aparecen como resultado del tratamiento con el fármaco de elección actual, L-dopa, o agonistas de dopamina. Ya que los pacientes con mal de Parkinson tienden a vivir más y más con su enfermedad, debido a los tratamientos mejorados en años recientes, la disquinesia inducida por L-dopa posee un problema incrementado especialmente para pacientes con inicio temprano de la enfermedad. Hoy en día hay algunas opciones de tratamiento para disquinesias, y estas a menudo son complicadas y el acceso es limitado.

Un enfoque que se ha probado en modelos animales preclínicos de mal de Parkinson es refinar la estrategia de reemplazo de dopamina farmacológica clásica al usar un enfoque de terapia génica para obtener un reemplazo de dopamina local en el putamen y núcleo caudado donde la deficiencia de dopamina es aún más avanzada. Este enfoque se llama la "estrategia de reemplazo de enzimas". El raciocinio para este tratamiento viene de las observaciones clínicas en pacientes con el mal de Parkinson (PD),

000003

lo que sugiere que los movimientos involuntarios anormales severos (es decir, disquinesias), inducido por medicación de L-DOPA oral, podrán aliviarse por agonistas de L-DOPA o DA en infusión ya sea por medio de ruta intravenosa o duodenal. De esta manera, la hipótesis actual es que las disquinesias se desarrollan, al menos en parte, debido al suministro intermitente en pulsos de DA que el paradigma de suministro de L-dopa oral eleva. Estos pacientes se benefician del estímulo de DA continuo también por la reducción dramática en el tiempo total gastado en estado "apagado".

Estas enzimas diferentes son necesarias para la producción de dopamina, especialmente tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) y aminoácido descarboxilasa aromático (AADC). Las dos primeras regulan la producción de L-DOPA a partir de tirosina (un aminoácido dietético) mientras que AADC convierte la L-DOPA en dopamina. Ninguna de estas enzimas son únicas para las neuronas dopaminérgicas pero también pueden presentarse en células no dopaminérgicas. La adición de estas enzimas al área objetivo desnervada puede resultar en la producción de L-DOPA o dopamina localmente. La ventaja de esta estrategia puede ser que proporciona una producción constante de L-DOPA con relación a terapia orales convencionales donde los niveles de L-DOPA en el plasma (y también niveles cerebrales) fluctúan. También se localiza el tratamiento al área del cerebro que necesita de sustitución mientras que otras partes del cuerpo no se "tratan" lo que resulta en un efecto favorable contra la relación de efecto colateral.

Los datos pre-clínicos publicados que usan este enfoque han

000004

proporcionado las siguientes observaciones:

1. se puede obtener la expresión de los tres genes en el putamen y núcleo caudado por transducción usando vectores rAAV múltiples [Kaplitt MG, et al: Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain; Nat Genet 1994 **8** 148-54; Mandel RJ, et al: Characterization of intrastriatal recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer of human tyrosine hydroxylase and human GTP-cyclohydrolase I in a rat model of Parkinson's disease; J Neurosci 1998 **18** 4271-84; Shen Y, et al: Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease; Hum Gene Ther 2000 **11** 1509-19].

2. La eficiencia de TH depende de GCH1 (que produce el co-factor de tetrahidrobiopterina, BH4). Mandel y colaboradores han mostrado esto al medir niveles de L-dopa usando micro diálisis [Mandel RJ, et al: Characterization of intrastriatal recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer of human tyrosine hydroxylase and human GTP-cyclohydrolase I in a rat model of Parkinson's disease; J Neurosci 1998 **18** 4271-84].

3. en un modelo de mono de mal de Parkinson (el modelo MPTP) la expresión de AADC puede resultar en una conversión más eficiente de L-dopa oral y se piensa que este mecanismo mejora la función en registro motor UPDRS de mono (UPDRS es la escala de evaluación clínica estándar para síntomas de Parkinson) [Bankiewicz KS, et al: Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC; Mol Ther

000005

2006 **14** 564-70].

4. La expresión de los tres genes puede resultar en una función mejorada tanto en modelos de rata [Shen Y, et al: Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease; Hum Gene Ther 2000 **11** 1509-19] como en modelos de mono [Muramatsu S, et al: Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. Hum Gene Ther 2002 **13** 345-54] del mal de Parkinson].

5. La expresión de TH y GCH1 es suficiente para obtener niveles de L-dopa estriatales que pueden resultar en una mejora funcional en el modelo de rata de mal de Parkinson y puede adicionalmente reducir significativamente la disquinesia inducida por L-dopa [Kirik D, et al: Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer; Proc Natl Acad Sci 2002 **99** 4708-13; Carlsson et al: Reversal of dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease by continuous L-DOPA delivery using rAAV vectors; Brain 2005 **128** 559-69]. Sin embargo, estos estudios se condujeron usando dos vectores de serotipo 2 AAV separados que contienen cada uno ya sea el gen GCH1 o el gen TH, ambos bajo el control de un promotor sintético grande (promotor de b-actina de pollo que contiene un intrón gamma-globulina de conejo, precedido con un elemento potenciador del promotor citomegalovirus, nombrado como la b-actina de pollo, CBA, promotor). Como tal, no fue posible de ninguna manera controlar la relación de expresión

000006

de los dos genes en el nivel celular; ni el promotor permite la expresión limitada a neuronas.

Con respecto al estado actual del arte dentro del campo de la presente invención, Sun et al (2004), describe un vector de expresión vírico no AAV con dos unidades transcripcionales, cada una regulada por un promotor específico de neurona. No describe el nivel relativo de transcripción de las dos unidades. In vitro aquí es las cantidades comparables de células que expresan TH y GCH-1 cuando se transducen con el vector tanto del gen 3 como el gen 4. En ambos casos, TH y GCH-1 están en diferentes transcriptos. En el vector del gen 4, GCH-1 se traduce desde un sitio IRES (después del VMAT-2 ORF).

Shen et al 2000, describe la co-transducción de células HEK-293 con AAV-TH, AAV-AADC y AAV-GCH-1. En un estudio de titulación, se transdujeron 293 células con AAV-TH y AAV-AADC y cantidades variadas de AAV-GCH-1. Los resultados muestran un incremento en tanto L-dopa como dopamina con titulación incrementada de AAV-GCH-1. AAVGCH-1 se probó en titulaciones hasta iguales como para AAV-TH. Las relaciones descritas son 1:10, 1:2 y 1:1 (AAV-GCH-1:AAV-TH). Se condujo la terapia génica in vivo con una relación 1:1 de los dos vectores (con y sin AAV-AADC).

Kirik et al, 2002 y Carlsson et al 2005 describen la co-administración de una mezcla 1:1 de AAV-TH y AAVGCH1, en la cual la titulación de AAV-TH es aproximadamente 3.5 veces la de AAV-GCH-1 (relación de 1:3.5). Ninguna de estas referencias establece porqué se usó esta relación.

La US 7,419,829 (Oxford Biomedica) describe un elemento WPRE

000007

mutado y su uso en un vector de tres genes (EIAV) con TH, AADC, y GCH-1 separados por secuencias IRES. El elemento WPRE aumenta la expresión de los tres genes en la misma extensión.

La WO 96/05319 (Arch Development) describe vectores
5 dicistrónicos con ya sea un sitio IRES o el promotor en el LTR
retrovírico 5', que controla la expresión de un cistron tanto
cadena arriba como cadena abajo. En un experimento de
transducción doble con fibroblastos, este describe una actividad
TH de 242.6 pmol/mg/min y una actividad GCH1 de 35.8 pmol/mg/min.
10 Esto se traduce en una relación de 1:6.8 entre las dos enzimas en
una base de actividad. Además, la referencia describe una
concentración de BH4 óptima (500 QM) con objeto de alcanzar
actividad TH máxima. La concentración L-DOPA en células
transducidas con TH fue máximo más allá de 50 QM BH4 y no
15 incrementa además con concentraciones más altas de BH4.

Ninguna de las referencias mencionadas describe un vector
AAV con un constructo codificado para tanto TH como GCH-1. Todos
los sistemas de un vector en la técnica anterior que codifican
tanto TH como GCH-1 se han hecho en vectores víricos que incluyen
20 piezas mucho más grandes de ácido nucleico. La mayoría de los
sistemas de un vector de la técnica anterior comprenden un
constructo de expresión que codifica AADC. Los vectores AAV
presentan ventajas sobre los sistemas de un vector con base en
HSV, EIAV y Retrovirus para propósitos clínicos. Además, la
ausencia de AADC también es una ventaja sobre la técnica anterior
ya que esto lleva a la generación de L-DOPA en las células
transducidas en lugar de DA.

000008

SUMARIO DE LA INVENCION

El propósito de la presente invención ha sido desarrollar herramientas moleculares nuevas para el tratamiento de trastornos donde las estrategias de tratamiento actuales son insuficientes o
5 donde el tratamiento actual está asociado con efectos colaterales severos y/o donde el individuo tratado desarrolla resistencia contra dicho tratamiento. Más específicamente, la presente invención se refiere a un constructo de expresión novedoso que regula el nivel de enzimas involucradas en biosíntesis de
10 catecolamina, siendo útiles de esta manera en un método para restaurar un balance de catecolamina normal en un sujeto que necesita del mismo.

En particular la invención se refiere al uso de dicho constructo de expresión en un método de tratamiento de trastornos
15 neurológicos, preferiblemente trastornos neurológicos degenerativos no curables en donde la mayoría de los pacientes experimenta respuesta al tratamiento disminuida y eventos adversos incrementados durante el tratamiento prolongado.

La presente invención se refiere principalmente al
20 tratamiento de mal de Parkinson, en donde la estrategia de tratamiento actual involucra la administración de L-DOPA u otros agentes que estimulan el receptor de dopamina. El tratamiento actual es eficiente, particularmente en la fase temprana de la enfermedad, pero durante el tratamiento prolongado la mayoría de los pacientes desarrolla disquinesia inducida por L-DOPA. El desarrollo de disquinesia se considera que está asociado con suministro no continuo de L- DOPA u otros agentes que estimulan el receptor de dopamina. Es un objetivo principal de la presente

000009

invención refinar el tratamiento actual al suministrar los compuestos necesarios para el tratamiento de particularmente mal de Parkinson localmente donde se necesita y a relaciones continuas que disminuyan cualquiera de los efectos adversos.

5 La presente invención se refiere a un sistema de expresión de un vector, que comprende dos polinucleótidos que codifican dos polipéptidos, a administrarse localmente en el sistema nervioso central, en donde dicho sistema de expresión de vector es capaz de expresar diferencialmente los dos polipéptidos codificados con
10 objeto de obtener la proporción exacta de los polipéptidos expresados necesarios para el tratamiento óptico de un trastorno neurológico dado.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de expresión de un vector que comprende

15 a) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1)
20 o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, con la condición de que dicho vector no comprende una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de aminoácido descarboxilasa aromático (AADC), o

000010

b) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde el vector es un vector asociado con adeno (AAV), o

c) un casete de expresión que comprende un promotor, una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido, en donde dicho promotor está ligado operablemente a dicha primera secuencia de nucleótido, y en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción se liga a dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, o

d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna

000011

(IRES) y una segunda secuencia de nucleótido en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción liga dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, y en donde la secuencia que comprende dicha primera secuencia de nucleótido ligada a dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción ligada a dicha segunda secuencia de nucleótido está flanqueada por repeticiones de terminal 5' y 3', y en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dichas repeticiones de terminal comprenden una secuencia capaz de dirigir la expresión de un polipéptido ligado operablemente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema de expresión de un vector que comprende

a) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor

000012

ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante
5 del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, con la condición de que dicho vector no comprende una secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de
10 aminoácido descarboxilasa aromático (AADC), o

b) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de
15 nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
20 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO.

000013

9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y
SEQ ID NO. 14, en donde el vector es un vector asociado con adeno
(AAV), o

c) un casete de expresión que comprende un promotor, una
5 primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que
inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma
interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido, en donde
dicho promotor está ligado operablemente a dicha primera
secuencia de nucleótido, y en donde dicha secuencia de nucleótido
10 que inicia la traducción liga dicha primera y dicha segunda
secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de
nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1)
o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en
donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o
15 variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido
seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y en
donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un
polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento
20 biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho
polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del
mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del
grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9,
SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ
ID NO. 14, o

d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de
nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción
tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una

000014

segunda secuencia de nucleótido en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción liga dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, y en donde la secuencia que comprende dicha primera secuencia de nucleótido ligada a dicha
5 secuencia de nucleótido que inicia la traducción ligada a dicha segunda secuencia de nucleótido está flanqueada por repeticiones de terminal 5' y 3', y en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en
10 donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un
15 polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9,
20 SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, en donde dichas repeticiones de terminal comprenden una secuencia capaz de dirigir la expresión de un polipéptido ligado operablemente.

En ciertas modalidades, el vector puede ser un vector vírico asociado con adeno (AAV). En modalidades preferidas, la invención comprende elementos reguladores, tal como elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota (WPRE), con el constructo del vector con objeto de regular la expresión

000015

diferenciada de los polipéptidos codificados. En ciertas modalidades, la expresión diferencial de los polipéptidos puede ser ventajosa para el flujo continuo de DOPA para el tratamiento pretendido de mal de Parkinson. También puede ser ventajoso para
5 dicho vector ser funcional en células de mamífero, preferiblemente células neuronales.

Un constructo de un vector, en donde es posible expresar diferencialmente dos o más polinucleótidos que codifican polipéptido también puede ser útil para otras aplicaciones tales
10 como tratamiento de otros trastornos, en donde se desea una estequiometría específica entre dos o más polipéptidos.

En otro aspecto la invención se refiere a un método para determinar la relación de expresión del polipéptido de ciclohidroxilasal GTP (SEQ ID NOs. 1, 2, 3, 4, 5 y 6) y
15 polipéptido de tirosina hidroxilasa (SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14), respectivamente, o variantes de los mismos, dicho polipéptido codificado por el vector como se define en la presente, comprende medir la:

- a. actividad enzimática de los polipéptidos, o
- 20 b. cantidad de BH_4 producido, o
- c. cantidad expresada de dichos polipéptidos, o
- d. nivel de mRNA transcrito correspondiente a los polipéptidos del polipéptido de ciclohidroxilasal GTP y tirosina hidroxilasa, respectivamente.

En ciertas modalidades de la presente invención, la relación se mide preferiblemente al determinar la cantidad de mRNA expresado, más preferiblemente al determinar la cantidad de proteína expresada o al determinar la actividad de enzimas de TH

000016

expresada (tirosina hidroxilasa) y GCH1 (polipéptido de
ciclohdroxilasa1 GTP). La relación de enzimas de TH expresada y
GCH1 es entre 15:1 hasta 1:1, preferiblemente entre 10:1 hasta
3:1, más preferiblemente entre 8:1 y 3:1, más preferiblemente
5 entre 7:1 y 4:1, tal como entre 7:1 y 5:1, por ejemplo 6:1.
(Detallado en la Figura 3).

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula
hospedera aislada que comprende el vector como se define en la
presente anteriormente.

10 En aspectos adicionales la invención se refiere a usos
médicos del sistema de expresión de vector de la invención, el
polinucleótido del vector y el polipéptido codificado.

Preferiblemente el uso médico es para el tratamiento de una
enfermedad, un trastorno o daño del sistema nervioso, más
15 preferiblemente para el tratamiento de trastornos neurológicos
degenerativos tal como mal de Parkinson.

En aspectos adicionales la invención se refiere a una célula
hospedera aislada transformada o transducida con el vector de la
invención y a una línea de célula empacada capaz de producir un
20 virión infeccioso de la invención.

En un aspecto el vector de la presente invención, se usa
como un medicamento.

Adicionalmente, la invención se refiere a una composición
farmacéutica que comprende el vector como se define en la
presente anteriormente y un portador o diluyente
farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto la composición farmacéutica es para uso en un
método de tratamiento de mal de Parkinson, dicha composición

000017

comprende un sistema de expresión de un vector y una formulación para suministrar dicho vector al ganglio basal, en donde dicho sistema de expresión de un vector comprende

5 a) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en
10 donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, con la
15 condición de que dicho vector no comprenda una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de aminoácido descarboxilasa aromático (AADC), o

b) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que
20 comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde el

vector es un vector asociado con adeno (AAV), o

5 c) un casete de expresión que comprende un promotor, una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido, en donde dicho promotor está ligado operablemente a dicha primera secuencia de nucleótido, y en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción se liga a dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de
10 nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, o

15 d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción se liga a dicha
20 primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, y en donde la secuencia que comprende dicha primera secuencia de nucleótido ligada a dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción ligada a dicha segunda secuencia de nucleótido está flanqueada por repeticiones de terminal 5' y 3', y en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o

000019

un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dichas repeticiones de terminal comprenden una secuencia capaz de dirigir la expresión de un polipéptido ligado operablemente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para
5 administrar la composición farmacéutica de la invención, en donde dicha composición farmacéutica se administra por inyección, oralmente a través de por ejemplo un comprimido, por un rocío, cutáneamente o por inhalación. Dicha inyección es preferiblemente intracraneal, intracerebral, intravítrea, intranasal,
10 intravenosa, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea o una inyección en bolo o continua.

También se proporciona un kit, que comprende la composición farmacéutica de la invención, dicho kit también comprende instrucciones para administrar la composición farmacéutica de la
15 invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1A-1B: (Fig. 1A) Perspectiva de una estrategia de suministro de DOPA continua de la presente invención. (Fig. 1B) Ejemplo comparativo usando un sistema de dos vectores tradicional
20 que carece de la posibilidad de controlar los niveles de expresión relativos de GCH y TH.

Figura 2: Constructos de vector. Se generó un constructo de genes para expresar tanto tirosina hidroxilasa (TH) como ciclohidrolasa 1 GTP (GCH-1) a partir de un genoma de vector sencillo. Para alcanzar una expresión incrementada de TH sobre el gen GCH1, se agregó un elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota (WPRE). Ambos genes se condujeron por el promotor Synapsin 1 humano (SYN-1) y se aumentó

000020

el tráfico usando una secuencia de poliadenilación SV40 (pA). La secuencia de gen completa se insertó entre repeticiones de terminal invertida (ITR) del serotipo 2 AAV.

Figuras 3A-3D: Modelado de la dependencia BH4 y GCH1 para
5 función TH. Los valores de datos de las mediciones de actividad de enzima TH *in vivo* e *in vitro* junto con western blots semi-cuantitativos para mediciones de proteína TH en los 6 grupos fueron vectores rAAV5-TH y rAAV5-GCH1 se mezclaron en relaciones
10 variadas, se unificaron en una variable de lectura sencilla al normalizar las cantidades a registro cero. Esto resulta en una cantidad adimensional que puede entonces compararse y modelarse directamente. (Fig. 3a) registros Z individuales de actividad de enzima TH *in vivo* e *in vitro* y niveles de proteína TH agrupados como una función de la síntesis BH4 en el estrato depurado de DA
15 después de transducción de rAAV5-TH y rAAV5-GCH1. Esta operación reveló que los resultados de los tres ensayos convergen actualmente en un patrón general cuando se agrupan como una función de los niveles BH4 de estrato. (Fig. 3b) Niveles BH4 de estrato agrupados como una función de gc rAAV5-GCH1 inyectada.
20 Los niveles BH4 en el estrato no se incrementan linealmente con concentraciones incrementadas de rAAV5-GCH1, sino al contrario muestran una saturación clara a niveles arriba de $3.6E9$ gc. (Fig. 3c) Formación de grupos de los registros Z de las tres pruebas de la función de enzima TH en un modelo sencillo, agrupados como una función de los niveles BH4 del estrato. (Fig. 3d) Registros Z promedio de las tres pruebas de función TH agrupadas como una función de las copias del genoma de rAAV5-GCH1 inyectadas. Líneas sólidas en B-D representan el ajuste no lineal alcanzado después

000021

de aplicar un modelo de saturación $y = Ax / (B + x) + C$ usando un algoritmo Levenberg-Marquardt modificado.

Figuras 4A-4F: Recuperación de la función motora. Se probaron animales con una denervación DA unilateral en una
 5 batería de pruebas de comportamiento. Con base en su desempeño en las pruebas de cilindro (Fig. 4a) y rotaciones inducidas por fármaco (Figs. 4d, 4e) tienen ya sea una cirugía simulada (grupo de Simulación Les) o reciben el vector rAAV sencillo terapéutico (TH-GCH1). La recuperación completa se apreció en el grupo TH-
 10 GCH1 con 5 semanas en la prueba de cilindro (Fig. 4a) y prueba en etapas (Fig. 4b). Esto se mantiene a través del experimento. Esto también se apreció en la prueba de corredor (Fig. 4c) mientras que la recuperación fue parcial en rotaciones inducidas por amfetamina (Fig. 4d) y apomorfina (Fig. 4e). La recuperación en
 15 la función motora completa tal como en la prueba de escalera también fue importante (Fig. 4f). * = significativamente diferente del grupo de Simulación Les.

Figura 5A-5G: Análisis post mortem de expresión de transgen y síntesis DA. Seis meses después de la inyección rAAV en
 20 animales lesionados 6-OHDA se evaluó la función del vector rAAV TH-GCH1 sencillo bioquímicamente y usando inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica revela una expresión robusta tanto de transgenes TH (Fig. 5a) como transgenes GCH1 (Fig. 5b). Esta expresión se acopló a una producción muy eficiente de tanto DOPA (barra cerrada en Fig. 5c) como BH4 (barra cerrada en Fig. 5d) hasta un grado mucho mayor que en el estrato intacto (barra abierta en Fig. 5d). Los niveles de dopamina también se reconstituyeron significativamente (Fig. 5e) y los niveles del

000022

metabolito intermediario DOPAC se restauran hasta el 50% del normal (Fig. 5f) y el metabolito final HVA (Fig. 5g) se eleva hasta dos veces los niveles normales.

Figura 6: Mapa de vector con el constructo de una modalidad

5 de la presente invención.

Figura 7: Relación de respuesta a la dosis con respecto a recuperación de la función motora. Se probaron animales con denervación DA unilateral, completa, en la prueba de pasillo antes de la inyección AAV (llamada línea base de Lesión).

10 Posteriormente, se balancearon en cuatro grupos con base en su desempeño. Todos los animales lesionados reciben entonces una inyección estereotáctica con un volumen igual de vector rAAV5-TH:GCH1 [5µl] pero con una concentración incrementada.

15 Esto resulta en los siguientes cuatro grupos de dosis; 0.7% [9.1E8 gc], 3.4% [4.6E9gc], 9.8% [1.3E10gc], 100% [1.3E11gc].

Se incluyó un grupo de control intacto de tamaño igual, emparejado por edad, como referencia en todos los puntos de tiempo. Los animales se vuelven a probar entonces en la prueba de pasillo 12 semanas después de la inyección AAV. Se

20 apreció recuperación completa en los dos grupos de tratamiento que reciben las concentraciones de vector más altas, es decir, debajo de una dosis de vector 1.3E10gc rAAV5-TH:GCH1. 4.6E9gc que resulta en un 50% de recuperación, mientras que la recuperación de la dosis 9.1E8 gc fue significativamente inferior. * = diferencia importante en un ANOVA factorial de dos vías seguido por prueba HSD post-hoc de Tukey.

Figura 8: Cuantificación por microdiálisis de niveles de

000023

dopamina extracelular. Se dividieron los animales con una denervación DA unilateral, completa, en dos grupos (grupo TH-GCH1 y solamente lesión 6-OHDA). Los animales en el grupo TH-GCH1 reciben entonces una inyección estereotáctica del vector rAAV5-TH:GCH1 a titulación completa. También se incluyeron animales emparejados por edad intactos, no lesionados, en el estudio (Ctrl Intacto). Al menos 6 meses más tarde, se cuantificaron los niveles de dopamina usando microdiálisis en línea. Se redujeron los niveles de dopamina extracelular hasta cercal del 90% en el grupo de control de Lesión. Después de la inyección de rAAV5-TH:GCH1 en la otra mano, se restauraron los niveles de dopamina extracelular hasta más del doble que aquellos de animales intactos. * = significativamente diferente del control de Lesión en un ANOVA de una vía seguido por prueba HSD post-hoc de Tukey.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Agonista: El término 'agonista' usado en la presente se refiere a un fármaco que se une a un receptor de una célula y dispara una respuesta por la célula.

Biológicamente activo: El término 'biológicamente activo' cuando es usado en la presente en conexión con enzimas codificadas por el constructo de vector de la invención, se refiere a la actividad enzimática de dichas enzimas, significa la capacidad para catalizar una cierta reacción enzimática. En particular actividad biológica se refiere a la actividad enzimática de tirosina hidroxilasa (TH) y GTP-ciclohidrolasa (GCH-1).

000024

Fragmento biológicamente activo: El término "fragmento biológicamente activo" como es usado en la presente, se refiere a una parte de un polipéptido, incluyendo enzimas, que comparten la actividad biológica del polipéptido de longitud completa. La actividad biológica del fragmento puede ser más pequeña que, más grande que, o igual a la actividad enzimática del polipéptido de longitud completa nativo.

Variante biológicamente activa: El término "variante biológicamente activa" como es usado en la presente, se refiere a una parte de polipéptido de una proteína, tal como una enzima, que tiene la misma actividad biológica como una proteína de longitud completa nativa. La actividad biológica del fragmento puede ser más pequeña que, más grande que o igual a la actividad enzimática del polipéptido de longitud completa nativo.

Disfunción de catecolamina: El término disfunción de catecolamina como es usado en la presente se refiere a anomalías en síntesis, regulación, almacenado, liberación, absorción o metabolismo de catecolamina en comparación con los mismos parámetros en un individuo saludable. En particular la disfunción de catecolamina es disfunción de dopamina, tal como deficiencia de dopamina. La persona experta en la técnica es capaz de diagnosticar disfunción de catecolamina.

Insuficiencia cognitiva: El término "insuficiencia cognitiva" usado en la presente se refiere a una condición con función mental pobre, asociada con confusión, olvido y dificultad para concentración.

Sustitución conservadora: El término "sustitución de aminoácido conservadora" definido en la presente se refiere a una

000025

sustitución por la cual un aminoácido es sustituido por otro con una o más características físicas y/o químicas compartidas. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo a las características compartidas. Una sustitución de aminoácido conservadora es una
5 sustitución de un aminoácido con un grupo predeterminado de aminoácidos por otro aminoácido dentro del mismo grupo, en donde los aminoácidos dentro de grupos predeterminados exhiben características similares o sustancialmente similares.

Trastorno: El término 'trastorno' usado en la presente se
10 refiere a una enfermedad o problema médico, y es una condición anormal de un organismo que atrofia las funciones corporales, asociada con síntomas y señales específicas. Está causada por factores externos, tal como organismos invadidos, o puede causarse por disfunciones internas, tal como producción o
15 transporte de catecolamina atrofiado. En particular, un trastorno como es usado en la presente es una disfunción de producción de dopamina o concentración de dopamina fisiológica anormal.

Expresión: El término 'expresión' de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido significa transcripción de
20 tal secuencia de ácido nucleico como mRNA y/o transcripción y traducción de tal secuencia de ácido nucleico lo que resulta en la producción de tal proteína.

Casete de expresión: El término 'casete de expresión' como es usado en la presente se refiere a una secuencia genómica que proporciona todos los elementos requeridos para resultar en la síntesis de una proteína in vivo. Esto puede incluir, pero no necesariamente se limita a, una secuencia que conduce la transcripción desde ADN hasta mRNA, es decir, una secuencia de

000026

promotor, una estructura de lectura abierta que incluye la secuencia genómica para la proteína de interés y una región no traducida 3' que permite la poliadenilación del mRNA.

Funcional en células de mamífero: El término 'funcional en
5 células de mamífero' como es usado en la presente, significa una secuencia, por ejemplo una secuencia de nucleótido tal como a vector, que cuando se introduce en una célula de mamífero resulta en la traducción en un polipéptido biológicamente activo.

Terapia génica: El término 'terapia génica' usado en la
10 presente se refiere a la inserción de genes en células y tejidos individuales para tratar una enfermedad.

Secuencia de ácido nucleico: El término secuencia de ácido
nucleico como es usado en la presente se refiere a una cadena de
hebra sencilla o hebra doble de dos o más bases de nucleótido
15 incluyendo, sin limitación, ácido desoxiribonucleico (ADN), ácido
ribonucleico (ARN), análogos de cualquiera de ADN o ARN, mRNA, y
cADN.

Ligado operablemente: El término 'ligado operablemente' como
es usado en la presente indica que la secuencia de ácido nucleico
20 que codifica uno o más polipéptidos de interés y secuencias de
regulación transcripcional se conectan de tal manera que permiten
la expresión de la secuencia de ácido nucleico cuando se
introduce en la célula.

Mal de Parkinson: El término 'mal de Parkinson' (también
conocido como mal de Parkinson o PD) usado en la presente se
refiere a un trastorno degenerativo del sistema nervioso central
que a menudo daña las habilidades motoras del paciente, el habla,
y otras funciones. El mal de Parkinson pertenece al grupo de

afecciones llamadas trastornos del movimiento. Se caracteriza por rigidez muscular, temblores, un movimiento físico más lento y, en casos extremos, una pérdida del movimiento físico, el PD es tanto crónico como progresivo.

5 Agente farmacéutico: Los términos 'agente farmacéutico' o 'fármaco' o 'medicamento' se refieren a cualquier agente terapéutico o profiláctico que puede usarse en el tratamiento (incluyendo la prevención, diagnóstico, alivio, o cura) de un mal, aflicción, afección, enfermedad o lesión en un paciente. Las
10 determinantes genéticas, péptidos, polipéptidos y polinucleótidos terapéuticamente útiles pueden incluirse dentro del significado del término farmacéutico o fármaco. Como se define en la presente, un "agente terapéutico", "agente farmacéutico" o "fármaco" o "medicamento" es un tipo de agente bioactivo.

15 Composición farmacéutica: o fármaco, medicamento o agente se refiere a cualquier material químico o biológico, compuesto, o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente al paciente. Algunos fármacos se venden en una forma inactiva que se convierte in vivo en un
20 metabolito con actividad farmacéutica. Para propósitos de la presente invención, los términos "composición farmacéutica" y "medicamento" abarcan tanto el fármaco inactivo como el metabolito activo.

Polipéptido: El término 'polipéptido' como es usado en la presente se refiere a una molécula que comprende al menos dos aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. 'Oligopéptidos' son definidos en la presente como que son polipéptidos de longitud de no más de 100 aminoácidos. El término

000028

"polipéptido" también se pretende que incluya proteínas, es decir biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando comprenden al menos dos polipéptidos, estas pueden formar complejos, pueden ligarse covalentemente o pueden ligarse no
 5 covalentemente. Los polipéptidos en una proteína pueden glicosilarse y/o lipidarse y/o comprender grupos prostéticos.

Polinucleótido: El término 'polinucleótido' usado en la presente se refiere a una molécula que es una molécula de polímero orgánico compuesta de monómeros de nucleótido unidos
 10 covalentemente en una cadena. Un "polinucleótido" como es usado en la presente se refiere a una molécula que comprende al menos dos ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden presentarse naturalmente o modificarse, tal como ácidos nucleicos asegurados (LNA), o ácidos nucleicos de péptido (PNA). Polinucleótido como
 15 es usado en la presente generalmente pertenece a

i) un polinucleótido que comprende una secuencia de codificación predeterminada, o

ii) un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácido predeterminada, o

20 iii) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por polinucleótidos (i) o (ii), en donde dicho fragmento tiene al menos una actividad predeterminada como se especifica en la presente; y

iv) un polinucleótido la hebra complementaria del cual hibridiza bajo condiciones severas con un polinucleótido como se define en cualquiera de (i), (ii) y (iii), y codifica un polipéptido, o un fragmento del mismo, que tiene al menos una actividad predeterminada como se especifica en la presente; y

000029

v) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que se degenera a la secuencia de nucleótido de los polinucleótidos (iii) o (iv);

o la hebra complementaria de tal polinucleótido.

5 Promotor: El término 'promotor' usado en la presente se refiere a una región de ADN que facilita la transcripción de un gen particular. Los promotores se localizan típicamente cerca de los genes que regulan, en la misma hebra y cadena arriba.

10 Proteína: El término 'proteína' usado en la presente se refiere a un compuesto orgánico, también conocido como un polipéptido, que es un péptido que tiene al menos, y preferiblemente más de dos aminoácidos. El término genérico aminoácido comprende aminoácidos tanto naturales como no naturales cualquiera de los cuales puede estar en la forma
15 isomérica 'D' o 'L'.

20 Identidad de secuencia: Identidad de secuencia se determina en una modalidad al utilizar fragmentos de péptidos moduladores de la actividad de proneurotrofina que comprenden al menos 25 aminoácidos contiguos y que tienen una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, tal como 85%, por ejemplo 90%, tal como 95%, por ejemplo 99% idéntica a la secuencia de aminoácido de cualquiera de las SEQ ID NOs de la presente invención, en donde el porcentaje de identidad se determina con el algoritmo GAP, BESTFIT, o FASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, usando pesos de hueco predeterminados.

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia predeterminada", "ventana de comparación", "identidad

000030

de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", e "identidad sustancial".

Una "secuencia predeterminada" es una secuencia definida usada como una base para una comparación de secuencia; una
5 secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADN de longitud completa o secuencia de genes dada en un listado de secuencias, tal como una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID
10 NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, o puede comprender un ADN completo o secuencia de genes. Generalmente, una secuencia predeterminada es al menos 20 nucleótidos en longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos en longitud, y a menudo al menos 50 nucleótidos en
15 longitud.

Ya que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) pueden comprender además una secuencia que
20 es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente al comparar secuencias de dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como es usado en la presente, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótido contiguas en donde una secuencia de polinucleótido puede compararse a una secuencia predeterminada de al menos 20 nucleótidos contiguos y en donde la

porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) de 20 por ciento o menos comparado con la secuencia predeterminada (que no comprende adiciones o eliminaciones) para
5 alineación óptima de las dos secuencias.

La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede conducirse por el algoritmo local de Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman and Wunsch
10 (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, por la búsqueda del método de similitud de Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.A.) 85: 2444, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group,
15 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección, y la mejor alineación (es decir, la que resulta en el porcentaje más alto de homología sobre la ventana de comparación) generado por los diversos métodos se selecciona.

El término "identidad de secuencia" significa que dos
20 secuencias de polinucleótido son idénticas (es decir, en una base nucleótido por nucleótido) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula al comparar dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinar el número de posiciones en las cuales la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) se presenta en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de

000032

comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicar el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Los términos "identidad sustancial" como es usado en la presente denota una característica de una secuencia de polinucleótido, en donde el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 hasta 95 por ciento de identidad de secuencia, más usualmente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia predeterminada sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótido, frecuentemente sobre una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula al comparar la secuencia predeterminada a la secuencia de polinucleótido que puede incluir eliminaciones o adiciones con un total de 20 por ciento o menos de la secuencia predeterminada sobre la ventana de comparación. La secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de la secuencia de polinucleótido SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22 de longitud completa ilustrada en la presente.

Como se aplica a los polipéptidos, un grado de identidad de secuencia de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos en las posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos. Un grado de homología o similitud de las secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos, es decir relacionados estructuralmente, en las posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos.

000033

El término secuencia "no relacionada" o "no homóloga" significa una secuencia que comparte menos de 40 por ciento de identidad con otra secuencia, aunque preferiblemente menos de 25 por ciento de identidad, con los polipéptidos de la presente invención. El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias de péptido, cuando se alinean de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT usando pesos de espacio predeterminados, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferiblemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren por las sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la capacidad de intercambio de los residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxilo alifáticas es serina y treonina, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptofano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina,

lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

Adicionalmente, las variantes también se determinan con base en un número predeterminado de sustituciones conservadoras de aminoácidos como se define en la presente enseguida. La
5 sustitución de aminoácido conservadora como es usada en la presente se refiere a la sustitución de un aminoácido (con un grupo predeterminado de aminoácidos) por otro aminoácido (dentro del mismo grupo), en donde los aminoácidos exhiben características similares o sustancialmente similares.

10 Dentro del significado del término "sustitución de aminoácido conservadora" como aplica en la presente, un aminoácido puede estar sustituido por otro dentro de los grupos de aminoácidos indicados en la presente enseguida:

i) Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp,
15 Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, y Cys,)

ii) Aminoácidos que tiene cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, y Met)

iii) Aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala Val, Leu, Ile)

20 iv) Aminoácidos que tiene cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)

v) Aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)

vi) Aminoácidos que tiene caednas laterales ácidas (Asp, Glu)

vii) Aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)

viii) Aminoácidos que tiene cadenas laterales de amida (Asn,

000035

Gln)

ix) Aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxí (Ser, Thr)

x) Aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen
5 azufre (Cys, Met),

xi) Aminoácidos débilmente hidrofóbicos, neutros (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)

xii) Aminoácidos ácidos, hidrofílicos (Gln, Asn, Glu, Asp),
y

10 xiii) Aminoácidos hidrofílicos (Leu, Ile, Val)

En consecuencia, una variante o un fragmento de la misma de acuerdo con la invención puede comprender, dentro de la misma variante de la secuencia o fragmento de la misma, o entre diferentes variantes de la secuencia o fragmento de la misma, al
15 menos una sustitución, tal como una pluralidad de sustituciones introducidas independientemente una de la otra.

Es claro de lo resumido anteriormente que la misma variante o fragmento del mismo puede comprender más de una sustitución de aminoácido conservadora a partir de más de un grupo de
20 aminoácidos conservadores como se define en la presente anteriormente.

La adición o eliminación de al menos un aminoácido puede ser una adición o eliminación desde preferiblemente 2 hasta 250 aminoácidos, tal como desde 10 hasta 20 aminoácidos, por ejemplo desde 20 hasta 30 aminoácidos, tal como desde 40 hasta 50 aminoácidos. Sin embargo, las adiciones o eliminaciones de más de 50 aminoácidos, tal como adiciones desde 50 hasta 100 aminoácidos, adición de 100 hasta 150 aminoácidos, adición de

000036

150-250 aminoácidos, también están comprendidas dentro de la presente invención. La eliminación y/o la adición puede - independientemente una de la otra - ser una eliminación y/o una adición dentro de una secuencia y/o al final de la secuencia.

5 Los fragmentos de polipéptido de acuerdo con la presente invención, incluyendo cualquiera de los equivalentes funcionales de los mismos, pueden en una modalidad comprender menos de 250 residuos de aminoácidos, tal como menos de 240 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 225 residuos de aminoácidos,
10 tal como menos de 200 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 180 residuos de aminoácidos, tal como menos de 160 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 150 residuos de aminoácidos, tal como menos de 140 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 130 residuos de aminoácidos, tal como menos de 120 residuos de
15 aminoácidos, por ejemplo menos de 110 residuos de aminoácidos, tal como menos de 100 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 90 residuos de aminoácidos, tal como menos de 85 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 80 residuos de aminoácidos, tal como menos de 75 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 70
20 residuos de aminoácidos, tal como menos de 65 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 60 residuos de aminoácidos, tal como menos de 55 residuos de aminoácidos, por ejemplo menos de 50 residuos de aminoácidos.

"Equivalencia funcional" como se usa en la presente invención está de acuerdo con una modalidad preferida establecida por medios de referencia a la funcionalidad correspondiente de un fragmento predeterminado de la secuencia.

Los equivalentes o variantes funcionales de una TH o GCH-1

000037

se entenderá que exhibe secuencias de aminoácidos que difieren gradualmente de la secuencia TH o GCH-1 predeterminada preferida, así como el número y alcance de inserciones, eliminaciones y sustituciones incluyendo incrementos de sustituciones conservadoras. Esta diferencia se mide como una reducción en la homología entre la secuencia predeterminada preferida y el fragmento o equivalente funcional.

Todos los fragmentos o equivalentes funcionales de SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 se incluyen dentro del alcance de esta invención, sin tener en cuenta el grado de homología que muestran a las secuencias TH y GCH-1 predeterminadas, respectivas, descritas en la presente. La razón para esto es que algunas regiones de TH y GCH-1 pueden ser fácilmente mutables, o capaces de eliminarse completamente, sin ningún efecto importante en la actividad de enlace del fragmento resultante.

Una variante funcional obtenida por la sustitución puede exhibir bien alguna forma o grado de actividad TH y GCH-1 nativa, y aún ser menos homóloga, si se sustituyen los residuos que contienen cadenas laterales de aminoácido funcionalmente similares. Funcionalmente similar en este aspecto se refiere a características dominantes de las cadenas laterales tal como hidrofóbica, básica, neutra o ácida, o la presencia o ausencia de una masa estérica. En consecuencia, en una modalidad de la invención, el grado de identidad no es una medida principal de un fragmento que es una variante o equivalente funcional de un

000038

fragmento predeterminado preferido de acuerdo con la presente invención.

La homología entre la secuencia de aminoácidos puede calcularse usando matrices de registro bien conocidas tal como cualquiera de BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, y BLOSUM 90.

Los fragmentos que comparten homología con fragmentos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente, se consideran como que caen dentro del alcance de la presente invención cuando estos preferiblemente son de al menos alrededor de 90 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 92 por ciento homólogos, tal como al menos 94 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 95 por ciento homólogos, tal como al menos 96 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 97 por ciento homólogos, tal como al menos 98 por ciento homólogos, por ejemplo al menos 99 por ciento homólogos con dichas secuencias de fragmento predeterminado, respectivamente. De acuerdo con una modalidad de la invención los porcentajes de homología se refieren a porcentajes de identidad.

Los factores adicionales que pueden tomarse en consideración cuando se determina la equivalencia funcional de acuerdo con el significado usado en la presente son i) la capacidad del antisuero para detectar un fragmento TH o GCH-1 de acuerdo con la presente invención, o ii) la capacidad del fragmento TH o GCH-1 funcionalmente equivalente para competir con el correspondiente

000039

fragmento TH o GCH-1 en un ensayo. Un método para determinar una secuencia de aminoácidos inmunogénicamente activos dentro de una secuencia de aminoácido conocida se ha descrito por Geysen en US 5,595,915 y se incorpora en la presente para referencia.

5 Un método apropiadamente adaptable adicional para determinar relaciones de estructura y función de fragmentos de péptido se describe por US 6,013,478, que se incorpora en la presente para referencia. También, los métodos para evaluar la unión de una secuencia de aminoácido a una porción receptora se conocen por el
10 técnico habilidoso.

Además de las sustituciones conservadoras introducidas en cualquier posición de un polipéptido TH o GCH predeterminado preferido, o un fragmento del mismo, también puede ser deseable introducir sustituciones no conservadoras en una o más posiciones
15 de un polipéptido.

Una sustitución no conservadora que lleva a la formación de un fragmento funcionalmente equivalente de TH o GCH-1 podría por ejemplo i) diferir sustancialmente en polaridad, por ejemplo un residuo con una cadena lateral no polar (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe o Met) sustituido por un residuo con una cadena lateral polar tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, o Gln o un aminoácido cargado tal como Asp, Glu, Arg, o Lys, o sustituir un residuo polar o cargado por uno no polar; y/o ii) difiere sustancialmente en su efecto en una orientación de columna del polipéptido tal como sustitución de o para Pro o Gly por otro residuo; y/o iii) difiere sustancialmente en carga eléctrica, por ejemplo sustitución de un residuo negativamente cargado tal como Glu o Asp por un residuo positivamente cargado tal como Lys, His
20

000040

o Arg (y al contrario); y/o iv) difiere sustancialmente en la masa estérica, por ejemplo sustitución de un residuo voluminoso tal como His, Trp, Phe o Tyr por uno que tiene una cadena lateral menor, por ejemplo Ala, Gly o Ser (y al contrario).

5 Las variantes obtenidas por la sustitución de aminoácidos pueden en una modalidad preferida hacerse con base en los valores de hidrofobicidad e hidrofiliicidad y la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido, incluyendo carga, tamaño, y similares. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares
10 que toman varias de las características anteriores en consideración son bien conocidas por aquellos de experiencia en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina y isoleucina.

15 Además de las variantes descritas en la presente, pueden formularse variantes estéricamente similares para imitar las porciones clave de la estructura variante y que tales compuestos pueden también usarse de la misma manera como las variantes de la invención. Esto puede alcanzarse por técnicas de modelado y
20 diseño químico conocidas por aquellos expertos en la técnica. Se entenderá que tales constructos estéricamente similares caen dentro del alcance de la presente invención.

En una modalidad adicional la presente invención se refiere a variantes funcionales que comprenden aminoácidos sustituidos que tienen valores hidrofílicos o índices hidropáticos que están dentro de ± 4.9 , por ejemplo dentro de ± 4.7 , tal como dentro de ± 4.5 , por ejemplo dentro de ± 4.3 , tal como dentro de ± 4.1 , por ejemplo dentro de ± 3.9 , tal como dentro de ± 3.7 , por

000041

ejemplo dentro de ± 3.5 , tal como dentro de ± 3.3 , por ejemplo dentro de ± 3.1 , tal como dentro de ± 2.9 , por ejemplo dentro de ± 2.7 , tal como dentro de ± 2.5 , por ejemplo dentro de ± 2.3 , tal como dentro de ± 2.1 , por ejemplo dentro de ± 2.0 ,
 5 tal como dentro de ± 1.8 , por ejemplo dentro de ± 1.6 , tal como dentro de ± 1.5 , por ejemplo dentro de ± 1.4 , tal como dentro de ± 1.3 por ejemplo dentro de ± 1.2 , tal como dentro de ± 1.1 , por ejemplo dentro de ± 1.0 , tal como dentro de ± 0.9 , por ejemplo dentro de ± 0.8 , tal como dentro de ± 0.7 ,
 10 por ejemplo dentro de ± 0.6 , tal como dentro de ± 0.5 , por ejemplo dentro de ± 0.4 , tal como dentro de ± 0.3 , por ejemplo dentro de ± 0.25 , tal como dentro de ± 0.2 del valor del aminoácido se ha sustituido.

La importancia del aminoácido hidrofílico e hidropático que
 15 incide en conferir función biológica interactiva en una proteína está bien entendido en la técnica (Kyte & Doolittle, 1982 y Hopp, Pat. E.U.A. No. 4,554,101, cada una incorporada en la presente para referencia).

Los valores de índice hidropático de aminoácido como es
 20 usado en la presente son: isoleucina (+4.5); valina (+4.2); leucina (+3.8); fenilalanina (+2.8); cisteína/cistina (+2.5); metionina (+1.9); alanina (+1.8); glicina (-0.4); treonina (-0.7); serina (-0.8); triptofano (-0.9); tirosina (-1.3); prolina (-1.6); histidina (-3.2); glutamato (-3.5); glutamina (-3.5); aspartato (-3.5); asparagina (-3.5); lisina (-3.9); y arginina (-4.5) (Kyte & Doolittle, 1982).

Los valores de hidrofiliicidad de aminoácido son: arginina (+3.0); lisina (+3.0); aspartato (+3.0. $\pm$.1); glutamato (+3.0. $\pm$.

000042

.1); serina (+0.3); asparagina (+0.2); glutamina (+0.2); glicina (0); treonina (-0.4); prolina (-0.5.+-.1); alanina (-0.5); histidina (-0.5); cisteína (-1.0); metionina (-1.3); valina (-1.5); leucina (-1.8); isoleucina (-1.8); tirosina (-2.3);
 5 fenilalanina (-2.5); triptofan (-3.4) (U.S. 4,554,101).

Además de los compuestos de peptidilo descritos en la presente, los compuestos estéricamente similares pueden formularse para imitar las porciones clave de la estructura de péptido y que tales compuestos pueden también usarse en la misma
 10 manera como los péptidos de la invención. Esto puede alcanzarse por técnica para modelar y diseño químico conocidas por aquellos de experiencia en la técnica. Por ejemplo, la esterificación y otras alquilaciones pueden emplearse para modificar la terminal amino de, por ejemplo, una columna de péptido di-arginina, para
 15 imitar una estructura de péptido tetra. Se entenderá que todos los constructos estéricamente similares caen dentro del alcance de la presente invención.

Los péptidos con alquilaciones en el N terminal y esterificaciones en el C terminal también se abarcan dentro de la
 20 presente invención. Los equivalentes funcionales también comprenden conjugados glicosilados y covalentes o agregados formados con los mismos u otros fragmentos TH o GCH-1 y/o moléculas TH o GCH-1, incluyendo dímeros o porciones químicas no relacionadas. Tales equivalentes funcionales se preparan al ligar las funcionalidades a grupos que se encuentran en fragmento incluidos en cualquiera o ambas de las terminales N y C, por medios conocidos en la técnica.

Los equivalentes funcionales pueden comprender de esta

000043

manera fragmentos conjugados a ésteres o amidas alifáticos o acilo de las terminales carboxilo, alquilaminas o residuos que contienen cadenas laterales carboxilo, por ejemplo, conjugados a alquilaminas en los residuos de ácido aspártico; derivados O-
5 acilo de residuos que contienen grupo hidroxilo y derivados de N-acilo de residuos que contienen aminoácido de terminal amino o grupo amino, por ejemplo conjugados con fMet-Leu-Phe o proteínas inmunogénicas. Los derivados de los grupos acilo se seleccionan del grupo de porciones alquilo (incluyendo alquilo normal C3 a
10 C10), formando por ello especies alcanilo, y compuestos carbocíclicos o heterocíclico, formando por ello especies aroilo. Los grupos reactivos preferiblemente son compuestos difuncionales conocidos per se para uso en reticular proteínas para matrices insolubles a través de grupos laterales reactivos.

15 Los equivalentes y derivados funcionales covalente o agregativos de los mismos son útiles como reactivos en inmunoensayos o para procedimientos de purificación por afinidad. Por ejemplo, un fragmento de TH o GCH-1 de acuerdo con la presente invención puede insolubilizarse por unión covalente a la
20 Sefarosa activada por bromuro de cianogen por métodos conocidos per se o adsorbidos a superficies de poliolefina, ya sea con o sin reticulación de glutaraldehído, para uso en un ensayo o purificación de anticuerpos anti-TH o anti-GCH-1 o receptores de superficie celular. Los fragmentos también pueden etiquetarse con un grupo detectable, por ejemplo, radioyodado por el procedimiento T de cloramina, unido covalentemente a quelatos de tierras raras o conjugados a otra porción fluorescente para uso en, por ejemplo, ensayos de diagnóstico.

000044

La mutagénesis de un fragmento predeterminado preferido de TH o GCH-1 puede conducirse al hacer inserciones de aminoácido, usualmente en el orden de alrededor desde 1 hasta 10 residuos de aminoácidos, preferiblemente desde alrededor de 1 hasta 5
5 residuos de aminoácidos, o eliminaciones desde alrededor de 1 hasta 10 residuos, tal como desde alrededor de 2 hasta 5 residuos.

En una modalidad el fragmento de TH o GCH-1 se sintetiza por síntesis automatizada. Pueden emplearse cualquiera de las
10 técnicas de fase sólida comercialmente disponibles, tal como método de síntesis de fase sólida Merrifield, en el cual los aminoácidos se agregan secuencialmente a una cadena de aminoácido en crecimiento. (ver Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963).

15 El equipo para síntesis automatizada de polipéptidos está comercialmente disponible de distribuidores tales como Applied Biosystems, Inc. de Foster City, Calif., y generalmente puede operarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La
síntesis de fase sólida permitirá la incorporación de
20 sustituciones de aminoácido deseables en cualquier fragmento de TH o GCH-1 de acuerdo con la presente invención. Se entenderá que las sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier subcombinación de los mismos puede combinarse para llevar a una secuencia final de un equivalente funcional. Las inserciones se deberá entender que incluyen fusiones de terminal amino y/o terminal carboxi, por ejemplo con una proteína hidrofóbica o inmunogénica o un portador tal como cualquier polipéptido o estructura de andamiaje capaz de servir como un portador.

. 000045

Los oligómeros que incluyen dímeros incluyen homodímeros y heterodímeros de fragmentos de TH y/o GCH-1 de acuerdo con la invención también se proporcionan y caen bajo el alcance de la invención. Los equivalentes y variante de TH o GCH-1 pueden producirse como homodímeros o heterodímeros con otras secuencias de aminoácido o con secuencias TH o GCH-1 nativas. Los heterodímeros incluyen dímeros que contienen fragmentos TH inmunoreactivos así como fragmentos GCH-1 que no necesitan tener o ejercer ninguna actividad biológica.

10 Cirugía simulada: Es también conocida como cirugía placebo y es una intervención operativa que omite la etapa que se piensa que es terapéuticamente necesaria. En estudios controlados, se realiza la cirugía simulada en la población de control para evaluar el efecto de la intervención bajo estudio al neutralizar el efecto de placebo y reducir el sesgo. Sin embargo al contrario del placebo, ejemplificado típicamente por la "píldora de azúcar" inerte, la cirugía simulada involucra una intervención quirúrgica real para compensar el efecto de la anestesia, el trauma de la incisión, y cuidados previos y posteriores a la operación y mantener la ilusión de una operación regular. En la presente solicitud, la cirugía simulada se ha realizado en animales del grupo de control referidos como el "grupo simulado Les".

La relación estequiométrica entre niveles de expresión TH y GCH1 para suministro de DOPA óptimo no ha sido bien estudiada en el cerebro. A la fecha la mayoría de los estudios que utilizan suministro de TH y GCH1 han utilizado un diseño sin tener en cuenta controlar sus niveles de expresión relativos. La enzima TH requiere el co-factor BH4 para síntesis DOPA. BH4 se sintetiza de

000046

GTP en una reacción enzimática de tres etapas donde GCH1 es la primera enzima y limitante de relación. Las siguientes dos enzimas se expresan ubicuamente. Hay un número de razones para vigilar cuidadosamente este proceso. Primero, la actividad de
5 enzima TH se regula intrincadamente y la estabilidad de la proteína TH también se regula. Un factor que afecta la actividad es la cantidad circundante de BH4. Muy poco BH4 y la enzima no trabajan eficientemente y mucho BH4 puede inhibir la función.

De forma secundaria, aunque se consume una molécula de BH4
10 para cada conversión de tirosina a DOPA, la enzima GCH1 nunca se consume. Ya que el sustrato GTP es abundante en la célula, la necesidad para expresión GCH1 puede ser mucho menor que la expresión TH. El suministro de DOPA continuo depende de varios factores que contribuyen al establecimiento de un ambiente para
15 funcionalidad de enzima TH óptima.

Los resultados obtenidos por los inventores actuales sugieren que la activación de la enzima TH sigue a una relación cinética de tres fases a las cantidades de GCH1 expresadas. En la fase inicial con una relación GCH1:TH de hasta 1:7, la función TH
20 y síntesis BH4 ambas se incrementan linealmente con GCH1 incrementado. En la segunda fase cuando GCH1 se incrementa además, hasta copias del genoma $5.5E9$ GCH1, (un nivel correspondiente a una relación 1:3 GCH1:TH), el incremento en los niveles BH4 continua linealmente pero la función TH comienza a mostrar señales de saturación. En la tercera fase, la saturación es evidente tanto en la función TH como la síntesis BH4 cuando se incrementan titulaciones rAAV5-GCH1 más allá de $5.5E9$ copias de genoma. Tomados en conjunto, estos datos muestra que el intervalo

000047

de trabajo entre 1:3 y 1:7 de relación GCH1:TH puede resultar en una síntesis DOPA eficiente donde la función TH se optimiza.

En consecuencia, en ciertas modalidades, el gen TH se expresa en alrededor de 3-7 veces los niveles más altos que GCH1.

5 Adicionalmente, usando los vectores y métodos y vectores descritos en la presente, puede mantenerse una relación bien definida estable de niveles de expresión de transgen para proporcionar niveles de expresión predecibles y optimizados in vivo.

10 Las estrategias previas han utilizado ya sea un diseño de dos vectores o vectores multi-cistronicos sencillos. El uso de vectores víricos separados que codifican cada uno a uno de los genes tiene un número de limitaciones. Primero, el "Producto" se vuelve realmente dos fármacos con cada uno que tiene su propia
15 variación de producción. Ya que es difícil evaluar in vitro, la producción de grado clínico puede ser muy problemática. Segundo, aunque a una escala global el patrón de expresión de los dos genes puede parecer similar, el número de copias de los dos vectores en una célula individual puede variar dramáticamente,
20 resultando de esta manera en niveles variados de síntesis DOPA. Además, el efecto puede agravarse con muchas células que reciben ninguno o sólo uno de los genes y por lo tanto exhiben síntesis DOPA muy limitada, si la hay.

Un enfoque más atractivo es la fusión de genes en un vector sencillo ya que los dos genes siempre se expresan en la misma célula, y habrá entonces solo un "producto". Sin embargo, este enfoque se ha obstaculizado por secuencias de genes muy grandes para ajustarse en ciertos constructos del vector, por ejemplo, un

000048

vector AAV recombinante. La capacidad de empaquetado de AAV se optimiza alrededor del tamaño del genoma AAV de tipo natural (4.7 kb). Si el genoma recombinante excede significativamente este tamaño, las concentraciones de producción y eficacia in vivo se dañan ambas severamente.

En la terapia génica, el tipo preferido de vectores víricos es el AAV. AAV es ventajoso para terapia génica debido al número de características. De importancia particular es la carencia de patogenicidad del virus de tipo natural. También puede infectar células no divididas y puede proporcionar expresión de genes estable, de larga duración. El gen deseado junto con el promotor a conducir la transcripción del gen puede insertarse entre las repeticiones de terminal invertidas (ITR) que ayudan en la formación de concatámero en los núcleos después de que el ADN de vector de hebra sencilla se convierte por complejos de polimerasa de ADN de célula hospedera en ADN de hebra doble. Los vectores de terapia génica basados en AAV forman concatámeros episomales en los núcleos de la célula hospedera. Los AAV también presentan muy baja inmunogenicidad, restringidos aparentemente a la generación de anticuerpos neutralizados, aunque inducen una respuesta citotóxica no definida claramente. Estas características hacen de AAV un candidato atractivo para la terapia génica, particularmente en el sistema nervioso central (SNC).

Aunque la trayectoria de síntesis de dopamina se considera comúnmente para incluir dos enzimas principales, TH y AADC, los inventores han mostrado en la presente que la terapia génica que usa un vector o vectores que expresan TH y GCH1, sin expresar AADC, pueden proporcionar alivio sintomático y/o terapéutico.

000049

Esto es de suma importancia, ya que limita la capacidad de empacado de ciertos vectores víricos, tales como el vector AAV, prohíbe o limita la inclusión de los tres genes, TH, GCH1, y AADC. Por otro lado, la combinación de los dos genes TH y GCH1 no es posible con construcción de genoma de vector bi-cistrónico tradicional. Aunque puede ser posible truncar la enzima TH en la terminal N para reducir el tamaño del gen, esto trae el gasto de remover el mecanismo de seguridad intrínseco de inhibición de alimentación y fosforilación. Tal enzima truncada sería continua para ser eficiente aún en momentos cuando las concentración DA citosólicas enfocarían niveles tóxicos. Esto no es el caso con el cADN TH de longitud completa como se utiliza en esta invención.

Ciertas modalidades descritas en la presente incluyen diseños de plásmido radicalmente diferentes. Por ejemplo, en lugar de permitir la expresión de genes doble a través del uso de un sitio de entrada de ribosoma interna, ciertas modalidades utilizan un casete de expresión doble con dos promotores. Con los promotores de fusión sintética usados tradicionalmente en la terapia génica tal como el promotor de b-actina de pollo sintético que contiene un intrón de gamma-globulina de conejo, precedido con un elemento potenciados del promotor de citomegalovirus (llamado la b-actina de pollo, CBA, promotor) este diseño plasmido no sería posible. El uso de un promotor endógeno fuerte, pequeño, permite este enfoque de diseño plásmido diferente.

Sistema de expresión de un vector

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a

000050

un sistema de expresión de un vector que comprende dos polinucleótidos que codifican dos polipéptidos diseñados para expresarse diferencialmente (descrito en la Figura 2). Los dos polipéptidos codificados, tirosina hidroxilasa (TH) y GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1), pueden expresarse preferiblemente a una relación entre 3:1 y 7:1.

Junto con otros polipéptidos, TH y GCH1 son enzimas esenciales en la producción de dopamina ya que regulan la producción de L-dopa a partir de tirosina. Otros factores están involucrados en la síntesis de dopamina, pero la relación estequiométrica entre TH y GCH1 puede ser un factor restrictivo en este proceso.

Por lo tanto es un objetivo principal de la presente invención proporcionar un constructo de vector que suministre proporciones optimizadas de TH y GCH1. Por otro lado, la presente invención proporciona un método para suministrar el constructo de vector localmente con objeto de limitar la producción incrementada de dopamina a las células que necesitan de la misma.

20 Vectores víricos

Ampliamente, la terapia génica busca transferir material genético nuevo a las células de un paciente con beneficio terapéutico resultante al paciente. Tales beneficios incluyen el tratamiento o profilaxis de un amplio intervalo de enfermedades, trastornos y otras afecciones.

La terapia génica puede clasificarse en dos tipos distintos: terapia génica de línea germinal, en donde el material genético se transfiere en células germinales y de esta manera es

000051

heredable, y terapia génica somática, en donde el material genético se transfiere en células somáticas y de esta manera no es heredable.

Los enfoques de terapia génica ex vivo involucran la modificación de células aisladas tal como células madre, que pueden infundirse, injertarse o transplantarse de otra manera al paciente. Ver, por ejemplo, Pat. E.U.A. Nos. 4,868,116, 5,399,346 y 5,460,959. La terapia génica in vivo por el contrario busca directamente el tejido objetivo del paciente in vivo.

Los vectores víricos son herramientas útiles para suministrar material genético en un organismo hospedero. Los virus útiles como vectores de transferencia de genes incluyen papovavirus, adenovirus, virus de vacuna, virus asociados con adeno (AAV), virus del herpes, y retrovirus, tal como VIH, SIV, FIV, EIAV, MoMLV.

Los virus preferidos para tratamiento de trastornos del sistema nervioso central son lentivirus y virus asociados con adeno. Ambos tipos de virus pueden integrarse en el genoma sin divisiones celulares, y ambos tipos se han probado en estudios animales pre-clínicos para indicaciones en el sistema nervioso, en particular en el sistema nervioso central.

Un tipo preferido de vector vírico es el AAV. El AAV es de interés en la terapia génica debido al número de características. El principal de estos es el virus de tipo natural que carece de forma aparente de patogenicidad y que también puede infectar células no divididas. El genoma AAV tipo natural se integra más frecuentemente en un sitio específico (designado AAVS1) en el cromosoma 19, mientras que las incorporaciones aleatorias en el

genoma toman lugar con frecuencia insignificante. La característica hace de alguna manera más predecible que los retrovirus, que presentan las amenazas de una inserción aleatoria y de mutagénesis. Con los AAVs como vectores de terapia génica, sin embargo, esta capacidad integradora puede eliminarse por la remoción de la repetición y tapa del ADN del vector. Ya que los genes de repetición y tapa no tiene un valor funcional en un vector vírico deficiente en replicación, pueden eliminarse del genoma del vector. En el lugar de estos genes AAV de tipo natural, los genes deseado junto con un promotor para conducir la transcripción del gen puede insertarse entre las repeticiones de terminal invertida (ITR). Las ITRs son importantes para el empaquetado de vector vírico del ADN del vector y ayudan en la formación del concatámero en los núcleos después de que el ADN de vector de hebra sencilla se convierte por complejos de polimerasa de ADN de célula sencilla en ADN de hebra doble.

Los vectores de terapia génica basados en AAV pueden formar concatámeros episomales en los núcleos de célula hospedera. En células no divididas, estos concatámeros pueden mantenerse intactos por la vida de la célula hospedera. En células divididas, el ADN de AAV puede perderse a través de la división celular, ya que el ADN episomal no se replica junto con el ADN de célula hospedera. La integración aleatoria del ADN de AAV en el genoma hospedero es bajo pero puede ser detectable. Los AAV presentan baja inmunogenicidad, aparentemente restringido a la generación de anticuerpos neutralizados, aunque inducen respuesta citotóxica definida no claramente. Estas características, junto con la capacidad para infectar células quiescentes, presentan

000053

algunas de sus ventajas sobre adenovirus como vectores para la terapia génica humanos. Estas características hacen al AAV un candidato atractivo para crear vectores víricos para terapia génica en el sistema nervioso central (SNC).

5 Los vectores víricos, incluyendo vectores AAV, tienen ciertas capacidades de clonación es decir, son capaces de transportar una cierta cantidad de polinucleótidos. De esta manera, en ciertas modalidades, la presente invención se refiere a un vector vírico con una capacidad de empaado en el intervalo
10 desde 1 hasta 40 kb, tal como desde 1 hasta 30 kb, por ejemplo desde 1 hasta 20 kb, tal como desde 1 hasta 15 kb, por ejemplo desde 1 hasta 10 kb, tal como desde 1 hasta 8 kb, por ejemplo desde 2 hasta 7 kb, tal como desde 3 hasta 6 kb, por ejemplo desde 4 hasta 5 kb. En una modalidad preferida, la presente
15 invención se refiere a un vector AAV con una capacidad de empaado de 4.8 kb.

Existen al menos 11 serotipos del AAV actualmente. El serotipo 2 se ha investigado más extensivamente, y AAV2 presenta tropismo natural hacia, por ejemplo, músculos esqueléticos,
20 células de músculo liso vasculares, hepatocitos y en particular neuronas. Sin embargo, otros serotipos han probado ser efectivos como herramientas para terapia génica; por ejemplo AAV6 parece particularmente útil en infectar células epiteliales de las vías respiratorias, AAV7 presenta alta relación de transducción de células de músculo esquelético de murino (similar a AAV1 y AAV5), AAV8 es particularmente útil para transducir hepatocitos, y AAV1 y 5 son eficientes en el suministro de genes a células endoteliales vasculares.

000054

La inmunidad humoral instigada por la infección con el AAV de tipo natural se piensa que es un evento muy común. La actividad neutralizante asociada limita la utilidad del serotipo AAV2 más comúnmente usado en ciertas aplicaciones. En consecuencia la mayoría de los ensayos clínicos actualmente en curso en el cerebro involucra el suministro de AAV2, un órgano inmunológicamente privilegiado de forma relativa.

Además de usar diferentes serotipos del AAV, es posible combinar diferentes serotipos, tal como usar el plásmido de un serotipo empacado en la cápsida de otro serotipo.

En una modalidad el vector asociado con adeno (AAV) vector de la presente invención es un vector AAV2.

En una modalidad adicional el vector AAV2 se empaca en una cápsida AAV diferente a una cápsida AAV2.

Aún en una modalidad adicional el vector AAV2 se empaca en una cápsida AAV5.

Los vectores AAV pueden prepararse usando dos principios mayores, transfección de cultivo de monocapa de línea celular humana o células de insecto de flotación libre. Los cultivos de células de monocapa se transfectan a través de precipitación de fosfato de calcio, lipofección u otros medios con una mezcla de dos o tres preparaciones de plásmido que contiene un plásmido de transferencia con el genoma vector y uno o dos plásmidos auxiliares que contienen los genes necesarios para la síntesis de cápsida de vector. Para cultivos de célula de inserto, esto proceso se reemplaza normalmente por transfección de las células usando constructos de baculovirus que contienen las mismas funciones. Las células, sobrenadante o ambas se colectan entonces

000055

por purificación y concentración del vector. Esto puede alcanzarse a través de cualquier combinación de cloruro de cesio o purificación de gradiente de yodixanol, cromatografía de intercambio de iones, filtración en gel y cromatografía de afinidad y ultracentrifugación. Los métodos para la preparación de AAV se describen en la técnica, por ejemplo US 5,677,158, US 6,309,634, y US 6,451,306 describe ejemplos de suministro de AAV al sistema nervioso central.

En consecuencia, en un aspecto principal, la presente invención se refiere a un sistema de expresión de un vector que comprende

a) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, con la condición de que dicho vector no comprende una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de aminoácido descarboxilasa aromático (AADC), o

b) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente

000056

a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde el vector es un vector asociado con adeno (AAV), o

10 c) un casete de expresión que comprende un promotor, una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido, en donde dicho promotor está ligado operablemente a dicha primera
15 secuencia de nucleótido, y en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción se liga a dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en
20 donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, o

d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción liga dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, y en donde la

000057

secuencia que comprende dicha primera secuencia de nucleótido ligada a dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción ligada a dicha segunda secuencia de nucleótido está flanqueada por repeticiones de terminal 5' y 3', y en donde dicha primera
5 secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde
10 dichas repeticiones de terminal comprenden una secuencia capaz de dirigir la expresión de un polipéptido ligado operablemente.

En una modalidad del vector descrita en la presente anteriormente, el polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado
15 por dicho primer casete de expresión, es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo,
20 expresado por dicho segundo casete de expresión es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

En otra modalidad del vector definido en la presente anteriormente, el polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo expresado por, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al

polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicho polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por dicho segundo casete de expresión es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

En otra modalidad del vector definido en la presente anteriormente, el polipéptido codificado de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido codificado de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

En otra modalidad del vector definido en la presente anteriormente, el polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido codificado de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO.

000059

8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

En ciertas modalidades, la inclusión del gen AADC en el vector puede ser desventajosa por cualquier número de razones.

5 Primero, genera un sistema nuevo que pueden sin modulación convertir la tirosina en dopamina. Ya que las células transducidas en el estriato carecen del mecanismo para secuestrar la dopamina en las vesículas, la dopamina puede acumularse rápidamente en el citosol. Si la enzima TH se queda con el
10 dominio regulador de terminal N, la dopamina producida puede inhibir directamente la síntesis DOPA a través de una retroalimentación negativa que puede limitar severamente la eficacia del tratamiento. Por otro lado, si la enzima TH se trunca, los niveles de dopamina citosólica pueden incrementarse
15 rápidamente ya que las células transducidas también carecen de mecanismos para liberar la dopamina. Tales incrementos en la dopamina citosólica se ha mostrado que llevan a la degeneración de las neuronas estriales que pudiera no sólo remover el alivio sintomático, sino también convertir el mal de Parkinson a una
20 atrofia de sistemas múltiples (MSA), un trastorno que no responde a L-DOPA para el que no hay alternativas de tratamiento.

Segundo, la inclusión del gen AADC también puede afectar la respuesta del paciente a farmacoterapia de L-DOPA oral. Se conoce que uno de los eventos adversos principales de la farmacoterapia con L-DOPA es las disquinesias. Estas se piensan que resultan, al menos en parte, debido a fluctuaciones de los niveles de dopamina en el estriato causadas por la ruta de administración en pulsos. Si la velocidad de conversión de L-DOPA a dopamina se aumenta

000060

focalmente en el estrato, esto puede agravar las fluctuaciones y también incrementar las disquinesias. Esto se ha observado, de hecho, en modelos de animal transducidos con el gen AADC.

La omisión del gen AADC por un lado puede proporcionar el
5 transportado de DOPA fuera de las neuronas estriales a través de transportadores de aminoácido grandes disponibles y por ello proporcionar un mecanismo seguro, ya que la enzima AADC puede regular la velocidad de conversión. Las neuronas con actividad de enzima AADC endógena también puede tener la capacidad de
10 almacenar y liberar la dopamina, reduciendo de esta manera el riesgo de toxicidad por dopamina.

En consecuencia, en ciertas modalidades el vector no comprende una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de aminoácido descarboxilasa aromático (AADC).

15 De esta manera en otro aspecto principal, la presente invención se refiere a un sistema de expresión de un vector que comprende

a) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que
20 comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia

000061

de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde
5 dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, con la condición de que dicho vector no comprende
10 una secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de aminoácido descarboxilasa aromático (AADC), o

b) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente
15 a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido
20 seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado

000062

del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, en donde el vector es un vector asociado con adeno (AAV), o

5 c) un casete de expresión que comprende un promotor, una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido, en donde dicho promotor está ligado operablemente a dicha primera
10 secuencia de nucleótido, y en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción se liga a dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en
15 donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y en
20 donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, o

d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia

000063

la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido en donde dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción se liga a dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, y en donde la

5 secuencia que comprende dicha primera secuencia de nucleótido ligada a dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción ligada a dicha segunda secuencia de nucleótido está flanqueada por repeticiones de terminal 5' y 3', y en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-

10 ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID

15 NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado

20 del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, en donde dichas repeticiones de terminal comprenden una secuencia capaz de dirigir la expresión de un polipéptido ligado operablemente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de expresión de un vector que comprende

a) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que

000064

comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, 5 en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 75% idéntico, tal como al menos 80% idéntico, por ejemplo al menos 90% idéntico, tal como al menos 92% idéntico, por ejemplo al menos 95% idéntico, tal como al menos 97% idéntico, por ejemplo, al menos 98% idéntico, tal 10 como al menos 99% idéntico, por ejemplo al menos 99.5% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia 15 de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 75% idéntico, tal como al menos 20 80% idéntico, por ejemplo al menos 90% idéntico, tal como al menos 92% idéntico, por ejemplo al menos 95% idéntico, tal como al menos 97% idéntico, por ejemplo al menos 98% idéntico, tal como al menos 99% idéntico, por ejemplo al menos 99.5% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, con la condición de que dicho vector no comprende una secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de aminoácido descarboxilasa aromático

000065

(AADC), o

b) un primero y un segundo casete de expresión, dicho primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia de promotor ligada operablemente a una primera secuencia de nucleótido, dicha primera secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia de promotor ligada operablemente a una segunda secuencia de nucleótido que codifican un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 75% idéntico, tal como al menos 80% idéntico, por ejemplo al menos 90% idéntico, tal como al menos 92% idéntico, por ejemplo al menos 95% idéntico, tal como al menos 97% idéntico, por ejemplo al menos 98% idéntico, tal como al menos 99% idéntico, por ejemplo al menos 99.5% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, en donde el vector es un vector asociado con adeno (AAV), o

c) un casete de expresión que comprende un promotor, una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que

000066

inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido, en donde dicho promotor está ligado operablemente a dicha primera secuencia de nucleótido, y en donde dicha secuencia de nucleótido

5 que inicia la traducción se liga a dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o

10 variante del mismo es al menos 75% idéntico, tal como al menos 80% idéntico, por ejemplo al menos 90% idéntico, tal como al menos 92% idéntico, por ejemplo al menos 95% idéntico, tal como al menos 97% idéntico, por ejemplo al menos 98% idéntico, tal como al menos 99% idéntico, por ejemplo al menos 99.5% idéntico

15 al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho

20 polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, o

d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de nucleótido, una secuencia de nucleótido que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido en donde dicha

000067

secuencia de nucleótido que inicia la traducción se liga a dicha primera y dicha segunda secuencia de nucleótido, y en donde la secuencia que comprende dicha primera secuencia de nucleótido ligada a dicha secuencia de nucleótido que inicia la traducción
5 ligada a dicha segunda secuencia de nucleótido está flanqueada por repeticiones de terminal 5' y 3', y en donde dicha primera secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento
10 biológicamente activo o variante del mismo es al menos 75% idéntico, tal como al menos 80% idéntico, por ejemplo al menos 90% idéntico, tal como al menos 92% idéntico, por ejemplo al menos 95% idéntico, tal como al menos 97% idéntico, por ejemplo, al menos 98% idéntico, tal como al menos 99% idéntico, por
15 ejemplo, al menos 99.5% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde dicha segunda secuencia de nucleótido codifica un polipéptido de tirscina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o
20 variante del mismo, en donde dicho polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico al polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, en donde dichas repeticiones de terminal comprende una secuencia capaz de dirigir la expresión de un polipéptido ligado operablemente.

En una modalidad el vector de la presente invención es un vector mínimamente integrado.

000068

En una modalidad el vector de la presente invención es el vector descrito en la Figura 6.

En una modalidad el vector como se define en la presente anteriormente tiene una capacidad de empaado desde 1 hasta 40 kb, por ejemplo desde 1 hasta 30 kb, tal como desde 1 hasta 20 kb, por ejemplo desde 1 hasta 15 kb, tal como desde 1 hasta 10, por ejemplo desde 1 hasta 8 kb, tal como desde 2 hasta 7 kb, por ejemplo desde 3 hasta 6 kb, tal como desde 4 hasta 5 kb.

En una modalidad preferida, el vector como se define en la presente anteriormente tiene una capacidad de empaado desde 4.5 hasta 4.8 kb.

En una modalidad el vector de la presente invención es un vector vírico, en donde dicho vector es seleccionado del grupo que consiste de un vector asociado con adeno (AAV), vector lentivírico, vector adenovírico y vector retrovírico.

En una modalidad preferida el vector es un vector asociado con adeno (AAV).

Aunque se prefieren vectores AAV, pueden usarse otros vectores para la presente invención. De esta manera, en otra modalidad el vector de la presente invención es un vector plásmido.

Aún en otra modalidad el vector de la presente invención es un vector sintético.

En una modalidad el vector es funcional en células de mamífero. En una modalidad el vector sólo es funcional in células de mamífero.

En una modalidad la presente invención se refiere a un vector basado en cualquier serotipo AAV identificado en humanos,

000069

primates no humano, otras especies de mamíferos, o versiones quiméricas de los mismos.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a un vector basado en vectores AAV de cualquier serotipo modificado para expresar proteínas de cubierta alteradas o
5 novedosas. En una modalidad más preferida, la presente invención se refiere a un vector AAV, más preferiblemente un vector serotipo AAV 2, más preferiblemente a vector serotipo AAV 2 empacado en una cápsida AAV serotipo 5. Para la selección de
10 cápsida, dos factores pueden contribuir a la elección del serotipo preferido. El primero es la presencia de anticuerpos neutralizantes para los equivalentes de tipo natural. Se ha mostrado que el serotipo más prevalente en varias poblaciones es el serotipo 2. De esta manera, hay una valor para usar un
15 serotipo que comparte la última homología de cápsida al serotipo 2 y otros serotipos. El serotipo 5 se destaca en que comparte sólo 53-57% de homología de secuencia de cápsida con los otros serotipo AAV 1 hasta 9 (Daya and Berns. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. ClinMicrobiol Rev (2008) vol. 21 (4)
20 pp. 583-93). Un segundo factor que puede contribuir a extender la transducción en los cerebros humanos es los residuos de superficie celular a los que la cápsida del vector exhibe afinidad. Aunque el serotipo AAV 2 tiene una fuerte afinidad a proteoglicano de sulfato de heparina (HSPG), el serotipo AAV5 no. esto puede ayudar a extender ya que el HSPG es abundante en el cerebro.

La expresión de un gen se controla en los niveles de transcripción, traducción o post-traducción. El inicio de la

000070

transcripción es un evento temprano y crítico en la expresión de genes. Este depende de las secuencias de promotor y potenciador y está influenciada por factores celulares específicos que interactúan con estas secuencias. El AAV puede diseñarse para
5 contener uno o más polinucleótidos de origen diferente. Un constructo de vector puede comprender uno o más promotores. En una modalidad de la presente invención, dichos promotores son específicos para células de mamífero, seleccionadas pero no limitadas al grupo que consiste de células neurales humanas
10 incluyendo neuronas humanas, células de ovario de hámster chino, CHO-K1, células de riñón de hámster bebe, células de fibroblasto 3T3 de ratón, líneas de células de mono verde del África, feocromocitoma adrenal de rata, células AT3, células de tumor glial de rata, células neuronales de rata y células del hipocampo
15 de rata.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a un vector que contiene una secuencia genómica donde la expresión de las enzimas se controla por uno o más promotores que permiten la alta expresión en neuronas, tal como por ejemplo
20 neuronas de estrato. En una modalidad más preferida, dichos promotores son específicos de neurona. En una modalidad aún más preferida, dichos promotores son promotores de sinapsis humanos.

En una modalidad, el primero y/o segundo promotores del constructo de expresión de la presente invención, como se define en la presente anteriormente, es un promotor específico para células de mamífero. En una modalidad adicional, dicha célula de mamífero es una célula neural. Aún en una modalidad adicional, dicha célula neural es una neurona.

000071

En una modalidad, tanto dicho primero como dicho segundo promotor son promotores de Sinapsina 1.

En otra modalidad, cualquiera de dicho primero o dicho segundo promotores es un promotor de Sinapsina 1.

5 En una modalidad el promotor usado en la presente invención es un promotor constitutivo, en donde dicho promotor constitutivamente activo se selecciona del grupo que consiste de CAG, CMV, UbiC humano, RSV, EF-1alfa, SV40, Mtl.

10 En otra modalidad el promotor es un promotor inducible, en donde dicho promotor inducible es seleccionado del grupo que consiste de Tet-On, Tet-Off, Mo-MLV-LTR, Mx1, progesterona, RU486 y promotor inducible pro Rapamicina.

El promotor de la presente invención puede ser un promotor constitutivo, que incluye pero no se limita al grupo que consiste
15 de promotor CAG, promotor CMV, promotor UbiC humano, promotor RSV, promotor EF-1alfa, promotor SV40 y promotor Mtl.

Además de los promotores, un vector de expresión también puee comprender una o más secuencias de poliadenilación. Una
20 secuencia de poliadenilación es necesaria para la producción de mARN maduro para la traducción del producto transcrito en un polipéptido. En una modalidad de la presente invención, la secuencia de poliadenilación es ligada operablemente con la secuencia que codifica TH o GCH-1, de la presente invención. En una modalidad más preferida, el extremo 5' de una secuencia de poliadenilación es ligado operablemente al extremo 3' de la secuencia que codifica TH o GCH-1 de la presente invención. En una modalidad más preferida, dicha secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación SV40.

000072

En una modalidad de la presente invención, ya sea dicho primer casete de expresión o dicho segundo casete de expresión comprende una secuencia de poliadenilación.

En otra modalidad de la presente invención, tanto dicho
5 primer casete de expresión como dicho segundo casete de expresión comprende secuencias de poliadenilación.

En una modalidad, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación SV40 en donde el extremo 5' de dicha secuencia de poliadenilación está ligado operablemente al extremo
10 3' de la primera y/o dicha segunda secuencia de nucleótido definida en la presente anteriormente.

En una modalidad de la presente invención, dicha primera secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o
15 variante del mismo comprende la secuencia de SEQ ID NO. 18.

En otra modalidad de la presente invención dicha segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo comprende la secuencia de SEQ ID NO. 21.

20 IRES es la abreviatura para sitio de entrada de ribosoma interna y es una secuencia de nucleótido que permite el inicio de traducción a la mitad de una secuencia de mRNA como parte del proceso más grande de síntesis de proteína. En una modalidad un sitio de entrada de ribosoma interna (IRES) también puede incluirse en el constructo de expresión del vector de la presente invención.

Para insertar secuencias genéticas en el ADN hospedero, los virus a menudo usan secuencias de ADN que repiten hasta mil

veces, llamadas repeticiones, o repeticiones terminales que incluyen repeticiones de terminal larga (LTR) y repeticiones de terminal invertida (ITR), en donde dichas secuencias de repetición pueden ser repeticiones de terminal tanto 5' como 3'.

5 Las ITRs ayudan en la formación de concatámero en los núcleos después de que el ADN del vector de hebra sencilla se convierte por complejos de polimerasa de ADN de célula hospedera en ADN de hebra doble. Las secuencias de ITR pueden derivarse de vectores víricos, preferiblemente AAV, más preferiblemente AAV2.

10 En una modalidad, los casetes de expresión del vector de acuerdo con la presente invención comprenden una repetición de terminal 5' y una repetición de terminal 3'.

En una modalidad dichas repeticiones de terminal 5' y 3' se seleccionan de Repeticiones de terminal invertida [ITR] y
15 Repeticiones de Terminal Larga [LTR].

En una modalidad de dichas repeticiones de terminal 5' y 3' son Repeticiones de terminal invertida AAV [ITR].

En una modalidad adicional dichas Repeticiones de terminal invertida comprenden las secuencias de SEQ ID NO. 15 y SEQ ID NO.
20 16.

Un vector de expresión también puede comprender uno o más potenciadores o elementos reguladores, tal como elementos reguladores post-transcripcionales, para incrementar o regular el nivel de expresión del transgen. Esto significa que la expresión de una o más secuencias de polinucleótido comprendidas en un vector vírico pueden incrementarse o reducirse en comparación con la eficacia de expresión en un vector sin potenciadores y/o reguladores. Al usar dichos potenciadores y/o reguladores,

000074

también es posible expresar diferencialmente dos o más genes incluidos en un vector. De esta manera es posible dirigir un potenciador o regulador a una secuencia de polinucleótido distinta dentro de un vector con dos o más secuencias de polinucleótido distintas dentro de un vector con dos o más secuencias de polinucleótido. Los potenciadores y reguladores incluyen, pero no se limitan a, SP163, intrón de InsulinaII de rata u otros intrones, potenciador de CMV, y aislador de [beta]-globina de pollo u otros aisladores.

En una modalidad preferida, las secuencias de polinucleótido de la presente invención se regulan por un elemento regulador post-transcripcional incrustado dentro del vector. En una modalidad más preferida, dicho elemento regulador es un elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota. En una modalidad más preferida (WPRE), dicho WPRE regula la relación de expresión entre los dos polinucleótidos de la invención, preferiblemente al incrementar la expresión de TH.

En una modalidad de la presente invención, dicha segunda secuencia de nucleótido está ligada operablemente a un elemento regulador post-transcripcional, en donde dicho elemento regulador post-transcripcional puede ser un elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota (WPRE), en donde dicho elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota puede comprender la secuencia de SEQ ID NO. 22.

En una modalidad particular, la expresión de los dos polipéptidos de la invención se presenta a una relación en donde la expresión TH es mayor que la expresión GCH 1. En una modalidad

000075

preferida, la relación TH:GCH 1 está entre 1:1 y 50:1, tal como entre 1:1 y 45:1, por ejemplo entre 1:1 y 40:1, tal como entre 1:1 y 35:1, por ejemplo entre 1:1 y 30:1, tal como entre 1:1 y 29:1, por ejemplo entre 1:1 y 28:1, tal como entre 1:1 y 27:1, por ejemplo entre 1:1 y 26:1, tal como entre 1:1 y 25:1, por ejemplo entre 1:1 y 24:1, tal como entre 1:1 y 23:1, por ejemplo entre 1:1 y 22:1, tal como entre 1:1 y 21:1, por ejemplo entre 1:1 y 20:1, tal como entre 1:1 y 19:1, por ejemplo entre 1:1 y 18:1, tal como entre 1:1 y 17:1, por ejemplo entre 1:1 y 16:1, tal como entre 1:1 y 15:1, por ejemplo entre 1:1 y 14:1, tal como entre 1:1 y 13:1, por ejemplo entre 1:1 y 12:1, tal como entre 1:1 y 11:1, por ejemplo entre 1:1 y 10:1, tal como entre 1:1 y 9:1, tal como entre 1:1 y 8:1, por ejemplo entre 1:1 y 7:1, tal como 7:1, por ejemplo 6:1, tal como 5:1, por ejemplo 4:1, tal como 3:1, por ejemplo entre 2:1 y 8:1, tal como entre 3:1 y 7:1.

Con objeto de controlar que la relación de expresión esté en el intervalo deseado, existen varias posibilidades. El nivel de mARN presente en una muestra puede medirse por RT PCR. La RT-PCR utiliza un par de cebadores, que son complementarios para una secuencia definida en cada una de las dos hebras del cADN. Estos cebadores se extienden entonces por una polimerasa de ADN y se hace una copia de la hebra después de cada ciclo, lo que lleva a la amplificación logarítmica. La RT-PCR incluye tres etapas principales. La primera etapa es la transcripción inversa donde el ARN se transcribe inversamente al cADN usando una transcriptasa inversa y cebadores. La siguiente etapa involucra la desnaturalización del dsADN, para hacer las dos hebras separadas y los cebadores pueden unirse de nuevo a temperaturas

000076

inferiores e inicia una nueva reacción en cadena.

La etapa final de la amplificación PCR es la extensión de ADN de los cebadores que se da por polimerasa Taq ADN termoestable. Los amplicones pueden visualizarse conforme
5 progresa la amplificación usando una molécula reportero fluorescente.

La cantidad de proteína puede medirse en varias formas.

Los niveles del polinucleótido pueden detectarse por radioinmunoensayo (RIA). RIA es una técnica muy sensible usada
10 para medir concentraciones de antígenos sin la necesidad de usar un bioensayo. Para realizar un radioinmunoensayo, una cantidad conocida de un antígeno se hace radioactiva, frecuentemente al etiquetarse con isotopos gamma-radioactivos de yodo enlazados a tirosina. Este antígeno etiquetado radio luego se mezcla con una
15 cantidad conocida de anticuerpo para tal antígeno, y como un resultado, los dos químicamente enlazados uno al otro. Luego, una muestra de suero de un paciente que contiene una cantidad desconocida de tal mismo antígeno se agrega. Esto provoca el antígeno no etiquetado (o "frió") del suero para competir con el
20 antígeno etiquetado radio para los sitios enlazados al anticuerpo. Ya que la concentración de antígeno "frió" se incrementa, más de este enlaza al anticuerpo, desplaza la variante etiquetada radio, y reduce la relación de antígeno etiquetada radio enlazada al anticuerpo hasta antígeno etiquetada radio libre. Los antígenos de enlace luego se separan de los no enlazados, y se mide la radioactividad del antígeno libre que permanece en el sobrenadante. Usando estándares conocidos, una curva de enlace luego puede generarse lo que permite la cantidad

000077

de antígeno en el suero del paciente hasta derivarse.

También puede emplearse el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). ELISA es una técnica cuantitativa usada para detectar la presencia de proteína, o
5 cualquiera otro antígeno, en una muestra. En ELISA una cantidad desconocida de antígeno se fija a una superficie, y luego un anticuerpo específico se lava sobre la superficie de manera que puede enlazar al antígeno. Este anticuerpo se liga a una enzima, y en la etapa final una sustancia se agrega que la enzima puede
10 convertir a alguna señal detectable.

Existen varios tipos de ELISA, incluyendo ELISA Indirecta, ELISA Intercalada, ELISA Competitiva y ELISA Inversa. También pueden usarse otros ensayos inmuno-basados, tal como ensayos inmunométricos quimioluminiscentes e inmunoensayos de Lantínida
15 Aumentados por Disociación. También se aplicable nefelometría y turbidimetría para determinación de proteína.

Otra forma para determinar la cantidad de proteína es por métodos basados en cromatografía, más específicamente cromatografía líquida. La cromatografía por afinidad está basada
20 en interacción no covalente selectiva entre un analito y moléculas específicas.

La cromatografía por intercambio de iones usa mecanismos por intercambio de iones para separar analitos. La cromatografía por intercambio de iones usa una fase estacionaria cargada para separar compuestos cargados. En métodos convencionales la fase estacionaria es una resina por intercambio de iones que porta grupos funcionales cargados que interactúan con grupos en sentido opuesto cargados del compuesto para retenerse. La cromatografía

000078

por exclusión de tamaño (SEC) también es conocida como cromatografía de permeación de gel (GPC) o cromatografía de filtración de gel. SEC se usa para separar moléculas de acuerdo con su tamaño (o más exactamente de acuerdo con su diámetro hidrodinámico o volumen hidrodinámico). Las moléculas más pequeñas son capaces de entrar en los poros del medio y, por lo tanto, toman más tiempo eluirse, mientras que las moléculas más grandes se excluyen de los poros y se eluyen más rápido.

La cromatografía de fase inversa es un procedimiento de elución en el cual la fase móvil es significativamente más polar que la fase estacionaria. Por lo tanto, los compuestos polares se eluyen primero mientras que los compuestos no polares se retienen.

Los métodos alternativos incluyen electroforesis. La electroforesis utiliza el movimiento de partículas dispersas relativas a un fluido bajo la influencia de un campo electrónico. Las partículas luego se mueven con una velocidad de acuerdo con su carga relativa. Más específicamente, los siguientes métodos electroforéticos pueden usarse para detección de CD163:

La electroforesis de gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), inmunolectroforesis Rocket, inmunolectroforesis de afinidad y enfoque isoeléctrico.

También puede usarse citometría de flujo para determinar la cantidad de la proteína. En citometría de flujo un haz de luz de una longitud de onda sencilla se dirige en una corriente enfocada hidrodinámicamente de fluido. Un número de detectores (algunos fluorescentes) se dirigen al punto donde la corriente pasa a través del haz de luz: una en línea con el haz de luz y varios

000079

detectores perpendiculares para este. Cada partícula suspendida desde 0.2 hasta 150 micrómetros que pasa a través del haz dispersa la luz de alguna forma, y los químicos fluorescentes encontrados en la partícula o unidos a la partícula pueden
5 excitarse en luz emitida en una longitud de onda más tiempo que la fuente de luz. Esta combinación de luz fluorescente y dispersa se escoge por los detectores, y, al analizar las fluctuaciones en la luminosidad en cada detector, luego es posible derivar varios tipos de información alrededor de la estructura física y química
10 de cada partícula individual.

La tecnología Luminex, está basado en una técnica donde las microesferas se recubren con reactivos específicos para capturar un antígeno específico de una muestra.

MS es una técnica analítica para la determinación de la
15 composición elemental de una muestra o molécula. También se usa para esclarecer las estructuras químicas de moléculas, tal como proteínas y otros compuestos químicos. El principio de la MS consiste de ionizar compuestos químicos para generar moléculas cargadas o fragmentos de molécula y medición de sus relaciones de
20 nada a carga.

La actividad de enzima se puede medir por una variedad de métodos. Todos los ensayos de enzima miden ya sea el consumo de sustrato o producción de producto con el paso del tiempo. En general, cuatro tipos de experimentos son generalmente usados: experimentos de velocidad inicial, experimentos de la curva de progreso, experimentos cinéticos transitorios o experimentos de relajación. Estos ensayos incluyen ensayos espectrofotométricos, fluorométricos, calorimétricos, quimioluminiscentes, dispersión

000080

de luz, radiométricos, cromatográficos y colorimétricos, tal como un ensayo MTT.

Por lo tanto, en una modalidad, la relación de expresión se determina al medir la cantidad de TH que codifica el polinucleótido contra la cantidad de GCH 1 que codifica el polinucleótido presente, más preferiblemente la cantidad de TH mRNA contra la cantidad de GCH 1 mRNA. En otra modalidad, la expresión de los polipéptidos TH y GCH 1 se mide por la cantidad de proteína expresada. En aún otra modalidad preferida, la relación de expresión se determina al medir la actividad enzimática de los polipéptidos TH y CGH 1.

En una modalidad de la presente invención la relación TH:GCH1 es al menos 3:1, tal como al menos 4:1, por ejemplo al menos 5:1, tal como al menos 6:1, por ejemplo al menos 7:1, tal como al menos 10:1, por ejemplo 15:1, tal como 20:1, por ejemplo 25:1, tal como 30:1, por ejemplo 35:1, tal como 40:1, por ejemplo 45:1, tal como 50:1.

En una modalidad preferida de la presente invención la relación TH:GCH1 es 7:1.

En una modalidad la relación entre los niveles de expresión del TH y GCH1 de la presente invención, se determina al medir la actividad de las enzimas TH expresada y GCH1.

En otra modalidad la relación entre los niveles de expresión del TH y GCH1 de la presente invención, se determina al medir la cantidad de Tetrahidrobiopterina (BH_4), un producto intermediario en la biosíntesis de catecolamina/dopamina.

En otra modalidad la relación entre los niveles de expresión del TH y GCH1 de la presente invención, se determina al medir la

000081

cantidad de mRNA transcrito.

En otra modalidad la relación entre los niveles de expresión del TH y GCH1 de la presente invención, se determina al medir la cantidad de proteína expresada.

5

Tirosina hidroxilasa

10 Tirosina hidroxilasa, abreviada TH, es una monooxigenasa que cataliza la conversión de tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), un precursor de dopamina. Se modula la actividad TH por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales en respuesta a cambios en el ambiente y a estímulo neuronal y hormonal. La regulación más aguda de actividad TH ocurre a través de modificación post-traducciona1 de la proteína por medio de fosforilación.

15 Como se menciona, la función principal de tirosina hidroxilasa es la conversión de tirosina a dopamina. TH se encuentra principalmente en neuronas dopaminérgicas, pero no se restringe a estas. El gen de TH es esencial en el desarrollo embriónico ya que el genotipo con genes inactivados TH es letal
20 dentro del día 14 embriónico en ratones, mientras que los ratones heterocigotos para la mutación TH se desarrollan normalmente con únicamente una disminución ligera en niveles de catecolamina.

La enzima TH es altamente específica, no acepta derivados indol, que es inusual como muchas otras enzimas involucradas en la producción de catecolaminas. Ya que la enzima que limita la velocidad en la síntesis de catecolaminas, TH tiene un papel clave en la fisiología de neuronas adrenérgicas. Las catecolaminas, tales como dopamina, son jugadores principales en

000082

la señalización de las neuronas adrenérgicas. El malfuncionamiento de neuronas adrenérgicas da lugar a diversos trastornos neurodegenerativos en general, tales como neuropatía periférica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de
5 Alzheimer, mal de Parkinson, enfermedad de Huntington, apoplejía isquémica, lesión cerebral aguda, lesión de la médula espinal aguda, tumores del sistema nervioso, esclerosis múltiple, lesión o trauma del nervio periférico, exposición a neurotoxinas, enfermedades metabólicas tales como diabetes o disfunciones
10 renales y daño provocado por agentes infecciosos, o para trastornos del humor tales como depresión. La TH administrada con los constructos y métodos de la presente invención se puede usar al tratar el mal de Parkinson.

La secuencia de polinucleótidos que codifica TH en la
15 presente invención se establece en SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14. En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 y SEQ ID NO. 12 y
20 variantes de secuencia del polinucleótido que codifican el polipéptido TH que comprende una identidad de secuencia de al menos 70% para las SEQ ID NOs., más preferiblemente 75% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 80% de identidad de secuencia, tal como al menos 85% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 90% de identidad de secuencia, tal como al menos 95% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 96% de identidad de secuencia, tal como al menos 97% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 98% de identidad de secuencia,

000083

tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11 y SEQ ID NO. 12.

El polinucleótido, que codifica TH, comprendido en el
5 constructo de vector de la presente invención también puede codificar fragmentos biológicamente activos o variantes del polipéptido TH.

En una modalidad preferida, tales fragmentos o variantes del polinucleótido TH codificados por la presente invención
10 comprenden al menos 50 aminoácidos contiguos, tales como 75 aminoácidos contiguos, por ejemplo 100 aminoácidos contiguos, tales como 150 aminoácidos contiguos, por ejemplo 200 aminoácidos contiguos, tales como 250 aminoácidos contiguos, por ejemplo 300 aminoácidos contiguos, tales como 350 aminoácidos contiguos, por
15 ejemplo 400 aminoácidos contiguos, tales como 450 aminoácidos contiguos, en donde cualquiera aminoácido especificado en la secuencia en cuestión se altera para un aminoácido diferente, con la condición de que no más de 15 de los aminoácidos en el fragmento o variante se alteran.

20 Las versiones mutadas y sustituidas de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14 y el polipéptido TH codificado de la presente invención también se cubren. En una modalidad, las sustituciones en la secuencia de aminoácidos son conservadoras, en donde el aminoácido está sustituido con otro aminoácido con características físicas y/o químicas similares. Pueden ocurrir mutaciones en uno o más sitios dentro de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ

000084

ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14 y/o en el polipéptido TH codificado. En una modalidad preferida, la presente invención se refiere a cualquier mutación que hace al TH biológicamente activo, tal como por ejemplo mutaciones neutras o mutaciones silenciosas. En una
5 modalidad más preferida, la presente invención se refiere a mutaciones, en donde se han alterado uno o más de los residuos de serina S8, S19, S31, S40 o S404.

En una modalidad, el fragmento biológicamente activo expresado por el constructo de vector de acuerdo con la presente
10 invención comprende al menos 50 aminoácidos contiguos, en donde cualquier aminoácido especificado en la secuencia seleccionada se altera a un aminoácido diferente, con la condición de que no más de 15 de los residuos de aminoácido en la secuencia se alteran.

En una modalidad, el polipéptido de tirosina hidroxilasa
15 (TH) expresado por el constructo de vector de acuerdo con la presente invención es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 75%
20 idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 80% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 85% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID

000085

NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 90% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 95% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 96% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 97% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 98% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 99% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente 100% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

En una modalidad, el fragmento biológicamente activo expresado por el constructo de vector de acuerdo con la presente

000086

invención es el dominio catalítico de tirosina hidroxilasa.

En una modalidad, el fragmento biológicamente activo expresado por el constructo de vector de acuerdo con la presente invención es un polipéptido de tirosina hidroxilasa mutado, en
5 donde uno o más de los residuos S19, S31, S40 o S404 se han alterado a otro residuo de aminoácido.

GTP-ciclohidrolasa 1

La GTP-ciclohidrolasa I (GCH 1) es un miembro de la familia
10 de GTP ciclohidrolasa de enzimas. GCH 1 es parte de las trayectorias de biosíntesis de folato y biopterina. GCH 1 es la enzima que limita la velocidad y primera en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina (BH₄), que cataliza la conversión de GTP en 7,8-DHNP-3'-TP. BH₄ es un cofactor esencial requerido por la
15 hidroxilasa de aminoácido aromático (AAAH, por sus siglas en inglés) en la biosíntesis de los neurotransmisores de monoamina serotonina (5-hidroxitriptamina (5-HT), melatonina, dopamina, noradrenalina, y adrenalina. Las mutaciones en este gen se
20 asocian con fenilquetonuria maligna e hiperfenilalaninemia, así como distonía L-DOPA-responsiva. Diversas variantes de transcripto alternativamente empalmados que codifican diferentes isoformas se han descrito; sin embargo, no todas de las variantes dan lugar a una enzima funcional.

GCH 1 tiene un número de implicaciones clínicas, que involucran diversos trastornos. Los defectos en GCH1 son la causa de la deficiencia de GTP ciclohidrolasa 1 (GCH1D; también conocida como fenilcetonuria severa atípica debido a deficiencia de GTP ciclohidrolasa I. GCH1D es una de las causas de

000087

hiperfenilalaninemia maligna debido a deficiencia de tetrahidrobiopterina. También es responsable para neurotransmisión defectiva debido a eliminación de los neurotransmisores de dopamina y serotonina, que resultan en enfermedades tales como mal de Parkinson. Los síntomas principales incluyen: retraso psicomotor, trastornos de tonicidad, convulsiones, somnolencia, irritabilidad, movimientos anormales, hipertermia, hipersalivación, y dificultad para tragar. Algunos pacientes pueden presentar un fenotipo de severidad intermedia entre hiperfenilalaninemia severa y distonía suave tipo 5 (distonía-parkinsonismo con fluctuación diurna). En este fenotipo intermediario, existe retraso motor marcado, pero sin retraso mental y únicamente mínimo, si hubiera, hiperfenilalaninemia. Los defectos en GCH1 son la causa de distonía tipo 5 (DYT5); también conocida como distonía progresiva con fluctuación diurna, síndrome Segawa dominante autosomal o distonía-parkinsonismo con fluctuación diurna. DYT5 es una distonía DOPA-responsiva. La distonía se define por la presencia de contracciones del músculo involuntarias sostenidas, a menudo llevan a posturas anormales. DYT5 típicamente se presenta en la infancia con problemas para caminar debido a distonía de las extremidades inferiores y empeoramiento de la distonía hacia la noche. Se caracteriza por alteraciones posturales y motores que muestran fluctuación diurna marcada. La torsión del tronco es inusual. Los síntomas se alivian después de dormir y se agravan por fatiga o ejercicio. Existe una respuesta favorable para L-DOPA sin efectos colaterales.

GCH 1 administrado con los constructos y métodos de la

000088

presente invención se puede usar para tratar el mal de Parkinson.

La secuencia de polinucleótidos que codifica GCH 1 en la presente invención se establece en SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6. En una
5 modalidad preferida, la presente invención se refiere a SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4 y variantes de secuencia del polinucleótido que codifican el polipéptido GCH 1 que comprende una identidad de secuencia de al menos 70% hasta
10 SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4, más preferiblemente 75% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 80% de identidad de secuencia, tal como al menos 85% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 90% de identidad de secuencia, tal como al menos 95% de identidad de secuencia, por
15 ejemplo al menos 96% de identidad de secuencia, tal como al menos 97% de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 98% de identidad de secuencia, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4.

El polinucleótido, que codifica GCH 1, comprendido en el
20 constructo de vector de la presente invención también puede codificar fragmentos biológicamente activos o variantes del polipéptido GCH 1.

En una modalidad preferida, tales fragmentos o variantes del polinucleótido GCH 1 codificado por la presente invención comprende al menos 50 aminoácidos contiguos, tales como 75 aminoácidos contiguos, por ejemplo 100 aminoácidos contiguos, tales como 150 aminoácidos contiguos, por ejemplo 200 aminoácidos contiguos, tales como 250 aminoácidos contiguos, en donde

. 000089

cualquier aminoácido especificado en la secuencia en cuestión se altera a un aminoácido diferente, con la condición de que no más de 15 de los aminoácidos en el fragmento o variante se alteran.

Las versiones mutadas y sustituidas de SEQ ID NO. 1, SEQ ID
5 NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6 y
el polipéptido GCH 1 codificado de la presente invención también
se cubren. En una modalidad, las sustituciones en la secuencia de
aminoácidos son conservadoras, en donde el aminoácido está
sustituido con otro aminoácido con características físicas y/o
10 químicas similares. Las mutaciones pueden ocurrir en uno o más
sitios dentro de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID
NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6 y/o en el polipéptido GCH 1
codificado. En una modalidad preferida, la presente invención se
refiere a cualquier mutación que hace al GCH 1 biológicamente
15 activo, tal como por ejemplo mutaciones neutras o mutaciones
silenciosas.

En una modalidad, el fragmento biológicamente activo
expresado por el constructo de vector de acuerdo con la presente
invención comprende al menos 50 aminoácidos contiguos, en donde
20 cualquier aminoácido especificado en la secuencia seleccionada se
altera a un aminoácido diferente, con la condición de que no más
de 15 de los residuos de aminoácido en la secuencia se alteran.

En una modalidad, el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1)
expresado por el constructo de vector de acuerdo con la presente
invención es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado
del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO.
3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente
al menos 75% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que

000090

consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 80% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 85% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 90% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 95% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 96% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 97% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 98% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 99% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente 100% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6.

000091

Tejidos Objetivo para Tratamiento de Trastornos
Neurodegenerativos

5 Un desafío en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas es aplicar el medicamento localmente para evitar abundantes efectos colaterales. Actualmente, la mayoría de los medicamentos para tratar trastornos del cerebro se administran en una forma, la mayoría a menudo oralmente, de
 10 manera que alcanzan el cerebro completamente. Por lo tanto, cuando se administran oralmente los medicamentos alcanzarán las áreas objetivo en una forma pulsátil donde los niveles de fluctuación pueden poseer un problema para el paciente.

Un parámetro importante para terapia de gen *in vivo* es la
 15 selección de un tejido objetivo adecuado. Para el tratamiento del mal de Parkinson, el putamen y núcleo caudato es de interés particular. Más específicamente, el tratamiento debe centrarse en las neuronas dopaminérgicas de la región compacta en pares en la sustancia negra.

20 En el mal de Parkinson, se cree que la disquenesia que a menudo sigue el tratamiento prolongado con el fármaco de elección actual, L-dopa, es un resultado de los niveles de fluctuación del fármaco en el cerebro.

Un enfoque que se ha probado en modelos de animal preclínicos del mal de Parkinson es para refinar la estrategia del reemplazo de dopamina al usar un enfoque de terapia de gen donde el reemplazo de dopamina se puede conducir localmente en el putamen y núcleo caudato donde la deficiencia de dopamina está

000092

más avanzada. Este enfoque se refiere como la "estrategia de reemplazo de enzimas". El raciocinio para este tratamiento viene de observaciones clínicas en pacientes PD, que sugieren que las disquinesias severas, inducidas por medicamento L-DOPA oral, puede aliviarse por L-DOPA infundido ya sea por medio de la ruta intravenosa o duodenal. De esta manera, la hipótesis actual es que el desarrollo de disquinesias, al menos en parte, debido al suministro pulsátil, intermitente de DA que da lugar al paradigma de suministro L-DOPA oral.

En lugar de suministrar dopamina o L-dopa, la terapia de gen permite la regulación de las enzimas que producen dopamina.

De esta manera, en una modalidad particular de la presente invención los polinucleótidos que codifican las enzimas TH y GCH 1 se suministran en el cerebro de un individuo para ser tratado para mal de Parkinson. En una modalidad preferida, los polinucleótidos se suministran en un vector AAV sencillo. En una modalidad más preferida, el vector que comprende los polinucleótidos se suministra en el cerebro del individuo, preferiblemente en el núcleo de caudato y/o el putamen. En una modalidad aún más preferida, el vector se suministra de manera que es efectivo en las neuronas dopaminérgicas de la región compacta en partes en la sustancia negra.

Protocolo de Suministro y Dosificación

Un parámetro importante es la dosificación de TH y GCH 1 para ser suministrado en el tejido objetivo. En este sentido, "dosificación unitaria" se refiere generalmente a la concentración de TH y GCH 1/ml de la composición TH y GCH 1. Para

000093

vectores víricos, la concentración TH y GCH 1 se puede definir por el número de partículas víricas/ml de la composición neurotrófica. De forma óptima, para suministro de TH y GCH 1 usando un vector de expresión vírico, cada dosificación unitaria
5 de TH y GCH 1 comprenderá 2.5 hasta 25 μ L de una composición TH y GCH 1, en donde la composición incluye un vector de expresión vírico en un fluido farmacéuticamente aceptable y proporciona desde 10^{10} hasta 10^{15} TH y GCH 1 que expresa partículas víricas por ml de composición TH y GCH 1 (ejemplificado en la Figura 7).
10 Tales titulaciones altas son particularmente útiles para virus asociado por adeno, tal como el vector AAV descrito en la presente invención. El ejemplo 2 describe un régimen de dosis del vector de la presente invención.

En una modalidad la dosificación del vector administrado a
15 un paciente que necesita del mismo está entre $1.5E+10$ y $2.2E+12$ copias de genoma del vector por mililitro de materia gris putaminal.

En otra modalidad la dosificación del vector para uso en la
preparación de un medicamento para el tratamiento de una
20 disfunción de catecolamina está entre $1.5E+10$ y $2.2E+12$ copias de genoma del vector por mililitro de materia gris putaminal del individuo para quien el vector se pretende para administración.

En una modalidad preferida, el sitio de administración es el estriado del cerebro, en particular el núcleo de caudato y/o el putamen. La inyección en el putamen puede etiquetar sitios objetivo ubicados en varias regiones distantes del cerebro, por ejemplo, el globo pálido, amígdalas, núcleo subtalámico o la sustancia negra. En una modalidad preferida los (o uno de los)

000094

sitios objetivo es la sustancia negra, más preferiblemente la región compacta emparejada en la sustancia negra. La inyección también puede estar en tanto el estriado como en la sustancia negra.

5 Dentro de un sitio objetivo dado, el sistema de vector puede transducir una célula objetivo. La célula objetivo puede ser una célula encontrada en el tejido nervioso, tal como una neurona, astrocito, oligodendrocito, microglia o célula endoteliales. En una modalidad preferida, la célula objetivo es una neurona, en particular una neurona dopaminérgica de la región compacta emparejada en la sustancia negra.

El sistema de vector preferiblemente se administra por inyección directa. Los métodos para inyección en el cerebro (en particular el estriado) se conocen bien en la técnica (Bilang-Bleuel et al (1997) Proc. Acad. Natl. Sci. EUA 94:8818-8823; Choi-Lundberg et al (1998) Exp. Neurol. 154:261-275; Choi-Lundberg et al (1997) Science 275:838-841; y Mandel et al (1997)) Proc. Acad. Natl. Sci. EUA 94:14083-14088). Se pueden dar inyecciones estereotáxicas.

20 Aquellos de experiencia en la técnica apreciarán que el método de suministro directo empleado por la invención hace obvio un factor de riesgo limitado asociado con terapia de gen *in vivo*. En la invención, el suministro es directo y los sitios de suministro se eligen para difusión de Th y GCH 1 secretado que toma lugar sobre una región controlada y pre-determinada del cerebro para optimizar el contacto con neuronas dirigidas, aunque minimiza el contacto con células no dirigidas.

Las modificaciones de las propiedades de la cápsida de

000095

vector pueden permitir dirigirse del vector a la región estriatal también después de inyección intratecal (IT) o inyección en los ventrículos cerebrales (ICV). Esto puede lograrse por modificación de dominios específicos de la cápsida. Por ejemplo, 5 la mutación del aminoácido en la posición 587 puede remover la afinidad de enlace HSPG del serotipo 2 AAV y abrirse para enlace a otros residuos de la superficie celular que pueden ser de tipo celular específico. Otro enfoque alternativo es generar serotipos AAV quiméricos que heredarán propiedades de enlace diferentes de 10 los dos serotipos mezclados.

Preparaciones farmacéuticas

Para formar una composición TH y GCH 1 para uso en la invención, los vectores víricos de expresión que codifican TH y 15 GCH 1 se pueden colocar en una suspensión, solución o emulsión farmacéuticamente aceptable. Los medios adecuados incluyen preparaciones liposomales y de solución salina.

Más específicamente, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir acuosos estériles de soluciones, 20 suspensiones, y emulsiones no acuosas. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio de solución amortiguadora. Los vehículos precursores incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites fijos o de Ringer lactados.

000096

Los vehículos intravenosos incluyen fluidos y refuerzos de nutriente, refuerzos de electrolito (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer), y similares.

Los conservadores y otros aditivos también se pueden
5 presentar tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Además, una composición de transgenes TH y GCH 1 se puede liofilizar usando medios bien conocidos en la técnica, para reconstitución posterior y uso de acuerdo con la invención. Un
10 sistema de dispersión coloidal también se puede usar para suministro de gen dirigido.

Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromolécula, microesferas, perlas, y sistemas basados en lípido que incluyen emulsiones aceite en agua, micelas, micelas
15 mezcladas, y liposomas. Las liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de suministro in vitro e in vivo. Se ha mostrado que las vesículas unilamelares grandes (LUV), que están en el intervalo en tamaño desde 0.2-4.0 μ m pueden encapsular un porcentaje sustancial de una solución
20 amortiguadora acuosa que contiene macro moléculas grandes. El ARN, ADN y viriones intactos se pueden encapsular dentro del interior acuoso y suministrarse a células en una forma biológicamente activa (Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 6: 77,1981). Además de células mamíferas, las liposomas se han usado para suministro de transgenes operativamente codificados en células de planta, levadura y bacterianas. Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia de gen eficiente, las siguientes características deben presentarse: (1) encapsulación de los genes

000097

que codifican el TH y GCH 1 en eficiencia alta mientras que no comprometa su actividad biológica; (2) enlace preferencial y sustancial a una célula objetivo en comparación con células no objetivo; (3) suministro de los contenidos acuosos de la vesícula
5 al citoplasma de célula objetivo en alta eficiencia; y (4) expresión exacta y efectiva de información genética (Mannino, et al., Biotechniques, 6: 682,1988).

Los ejemplos de lípidos útiles en producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como
10 fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos, y gangliósidos. Son particularmente útiles diacilfosfatidilglicerol, donde la porción de lípido contiene desde 14-18 átomos de carbono, particularmente desde 16-18 átomos
15 de carbono, y se satura. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina.

El direccionamiento de liposomas se puede clasificar basado en factores anatómicos y funcionales. La clasificación anatómica
20 está basada en el nivel de selectividad, por ejemplo, específico de órgano, específico de célula, y específico de organelo. El direccionamiento funcional se puede distinguir basado en si es pasivo o activo. El direccionamiento pasivo utiliza la tendencia natural de liposomas para distribuir a células del sistema reticulo-endotelial (RES) en órganos que contienen capilares sinusoidales.

El direccionamiento activo, por otro lado, involucra alteración del liposoma al acoplar el liposoma a un ligando

específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido, o proteína, o al cambiar la composición o tamaño del liposoma con objeto de alcanzar el direccionamiento a órganos y tipos celulares diferentes de los sitios que se presentan naturalmente de localización.

La superficie del sistema de suministro del gen dirigido se puede modificar en una variedad de formas. En el caso de un sistema de suministro dirigido liposomal, los grupos de lípido se pueden incorporar en la bicapa de lípido del liposoma con objeto de mantener el ligando dirigido en asociación estable con la bicapa liposomal. Varios grupos ligados se pueden usar para unir las cadenas de lípido al ligando dirigido.

De esta manera en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método de tratamiento de mal de Parkinson, la composición que comprende un sistema de expresión de un vector y una formulación para suministrar el vector a los ganglios basales, en donde el sistema de expresión de un vector comprende:

a) un primer y un segundo casete de expresión, el primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una primera secuencia promotora operablemente ligada a una primera secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde el segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia promotora operablemente ligada a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un

000099

fragmento biológicamente activo o variante del mismo, con la condición de que el vector no comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido aromático de aminoácido descarboxilasa (AADC), o

- 5 b) un primer y un segundo casete de expresión, el primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia promotora operablemente ligada a una primera secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o
- 10 un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde el segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una segunda secuencia promotora operablemente ligada a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un
- 15 fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde el vector es un vector asociado a adeno (AAV), o

- c) un casete de expresión que comprende un promotor, una primera secuencia de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma
- 20 interno (IRES) y una segunda secuencia de nucleótidos, en donde el promotor se liga operablemente a la primera secuencia de nucleótido, y en donde la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción se liga a la primera y la segunda secuencia de nucleótido, en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante

del mismo, o

d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido en donde la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción se liga a la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, y en donde la secuencia que comprende la primera secuencia de nucleótidos ligada a la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción ligada a la segunda secuencia de nucleótidos se flanquea por repeticiones de terminal 5' y 3', y en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde las repeticiones de terminal comprenden una secuencia capaz de dirigir la expresión de un polipéptido operablemente ligado.

En una modalidad de la presente invención el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el primer casete de expresión, es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el segundo casete de expresión es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7,

000101

SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

En una modalidad de la presente invención el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo
5 o variante del mismo expresado por, en donde el polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido de tirosina
10 hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el segundo casete de expresión es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

15 En una modalidad de la presente invención el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y en
20 donde el polipéptido codificado de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

En una modalidad de la presente invención el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.

2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido codificado de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste
5 de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

En una modalidad de la presente invención la composición farmacéutica como se define en la presente arriba comprende manitol, heparina o gadolinio basado en agentes de contraste MRI.

10 En otra modalidad la composición farmacéutica como se define en la presente arriba comprende factores tróficos o inhibidores de proteasoma reversibles.

Uso médico y métodos de tratamiento

15 En un aspecto el vector de la presente invención, se usa como un medicamento.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso del vector como se define en la presente arriba, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada
20 con disfunción de catecolamina.

En un aspecto, la presente invención se refiere al vector como se define en la presente arriba, para uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con disfunción de catecolamina.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada con disfunción de catecolamina, en un paciente que necesita del mismo, el método comprende administrar al individuo el vector como se define en la

presente arriba.

En una modalidad de la presente invención, la disfunción de catecolamina es deficiencia de catecolamina.

En una modalidad adicional de la presente invención, la
5 disfunción de catecolamina es exceso de catecolamina.

En una modalidad preferida, la deficiencia de catecolamina es deficiencia de dopamina.

En otra modalidad el exceso de catecolamina es exceso de dopamina.

10 En una modalidad la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso central y/o periférico.

En una modalidad adicional, la enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso central y/o periférico es un trastorno
15 neurodegenerativo.

En otra modalidad, la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad de los ganglios basales.

En una modalidad la enfermedad tratable al usar el vector de la presente invención es seleccionada del grupo que consiste de
20 mal de Parkinson (PD), distonía con respuesta a DOPA, ADHD, esquizofrenia, depresión, parkinsonismo vascular, temblor esencial, tensión crónica, anormalidades del receptor genético de dopamina, uso crónico de opioides, cocaína, alcohol o marihuana, insuficiencia adrenal, hipertensión, deficiencia de noradrenalina, trastorno de tensión post-traumática, trastorno de ludomanía, demencia, demencia de cuerpo de Lewy.

En una modalidad preferida el trastorno neurodegenerativo tratable al usar el vector de la presente invención es mal de

000104

Parkinson (PD).

En un aspecto la invención se refiere al uso del vector de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso. El
5 trastorno del sistema nervioso puede ser un trastorno del sistema nervioso periférico o el sistema nervioso central.

Por tratamiento no sólo se pretende tratamiento curativo sino también preventivo (no prevención absoluta) o tratamiento profiláctico. El tratamiento también puede aliviarse (no alivio
10 absoluto) o sintomático.

Preferiblemente el trastorno del CNS es una enfermedad neurodegenerativa o neurológica, en una modalidad preferida de la invención la enfermedad neurodegenerativa es mal de Parkinson.

Las enfermedades del sistema nervioso se pueden tratar al
15 administrar a un individuo que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva del vector de virus de la invención; o una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención.

20

Composición farmacéutica

En consecuencia, en un aspecto la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el vector como se define en la presente arriba, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad de la presente invención el pH de la composición farmacéutica como se define en la presente arriba está entre pH 4 y pH 9.

000105

En otra modalidad la inyección de la composición farmacéutica es intracraneal, intracerebral, intravenosa, intravítrea, intranasal, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea, un bolo o una administración
5 continua.

En una modalidad la composición farmacéutica se formula para administración por inyección, comprimido o rocío sublingual, administración cutánea o inhalación.

En una modalidad la composición farmacéutica como se define
10 en la presente arriba se formula para administración por inyección, supositorio, administración oral, comprimido o rocío sublingual, administración cutánea, inhalación o para administración local usando una cápsula biocompatible implantable.

15 En una modalidad adicional la inyección es intravenosa, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea, un bolo o una administración continua.

En una modalidad la composición farmacéutica se administra en intervalos de 30 minutos hasta 24 horas.

20 En otra modalidad la composición farmacéutica se administra en intervalos de 1 hasta 6 horas.

En una modalidad de la presente invención, en donde la duración del tratamiento es desde 6 hasta 72 horas.

En un aspecto importante de la presente invención la duración del tratamiento es de larga vida.

En una modalidad adicional la composición farmacéutica como se define en la presente arriba se formula para administración por inyección, supositorio, administración oral, comprimido o

rocío sublingual, administración cutánea, inhalación o para administración local usando una cápsula biocompatible implantable.

En una modalidad la dosificación del ingrediente activo, esto es el vector, en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención está entre 10 μ g y 500 mg por kg masa corporal, tal como entre 20 μ g y 400 mg, por ejemplo entre 30 μ g y 300 mg, tal como entre 40 μ g y 200 mg, por ejemplo entre 50 μ g y 100 mg, tal como entre 60 μ g y 90 μ g, por ejemplo entre 70 μ g y 80 μ g.

En una modalidad adicional la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administra en intervalos de 72 horas hasta al menos 7 días, tal como 80 horas, por ejemplo 96h, tal como 5 días, por ejemplo 6 días, tal como una vez a la semana.

En una modalidad adicional la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administra en intervalos de 7 días hasta 1 mes, tal como una vez cada dos semanas, por ejemplo cada 3 semanas.

20

Células hospederas implantables

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula hospedera aislada que comprende el vector como se define en la presente arriba.

En un aspecto la invención se refiere a células hospederas aisladas transducidas con el vector de acuerdo con la invención. Estas células preferiblemente son células hospederas mamíferas debido a que estas son capaces de secretar y procesar el TH y GCH

000107

1 codificado correctamente.

Las especies preferidas incluyen el grupo que consiste de roedores (ratón, rata), conejo, perro, gato, cerdo, mono, ser humano.

5 Los ejemplos de cultivos primarios y líneas celulares que son buenos candidatos para transducción con los vectores de la presente invención incluyen el grupo que consiste de CHO, HEK293, COS, PC12, HiB5, RN33b, células neuronales, células fetales, ARPE-19, MDX12, C2C12, HeLa, HepG2, células estriatales,
10 neuronas, astrocitos, interneuronas.

En una modalidad la célula hospedera de la presente invención es seleccionada del grupo que consiste de células eucarióticas, preferiblemente células mamíferas, más preferiblemente células de primate, más preferiblemente células
15 humanas.

En otra modalidad, la célula hospedera de la presente invención es seleccionada del grupo que consiste de células de ovario de hámster Chino, CHO-K1, células de riñón de hámster bebé, células de fibroblasto-3T3 de ratón, líneas células de mono
20 verde Africano, feocromocitoma adrenal de rata, células AT3, células de tumor gliales de rata, células neuronales de rata y células de hipocampo de rata.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: El efecto de un vector rAAV sencillo para suministro DOPA continuo en un modelo animal del mal de Parkinson

000108

Materiales y métodos**Diseño experimental**

Todas las ratas en el experimento enseguida (con la excepción de animales en los grupos de control intactos) reciben una inyección unilateral de 6-OHDA en el haz prosencefálico medio (MFB) para lograr una lesión completa de la trayectoria nigroestriatal. En cuatro hasta cinco semanas después de la lección, todos los animales lesionados se seleccionaron en una prueba de rotación después de una prueba de rotación inducida de anfetamina [Ungerstedt and Arbuthnott: Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hidroxi-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system; Brain Res 1970 24 485-93]. Únicamente animales que muestra > 6.0 vueltas de cuerpo completo/min hacia el lado eliminado DA se incluyeron en el estudio (n=54).

Veinte ratas con una lesión 6-OHDA confirmada se balancearon en dos grupos (Les-Sham y TH-GCH1) basados en su desempeño en las pruebas cilíndricas y en rotaciones inducidas por anfetamina y apomorfina (Fig. 3). En 6 semanas después de la lesión, los animales en el grupo TH-GCH1 reciben una inyección estereotáctica de vector 3.5E10 gc rAAV5-TH:GCH1 y el grupo de control recibe cirugía fingida, que implica la abertura del cuero cabelludo y perforación de un agujero en el sitio correcto pero la dura no se penetró. Los animales se volvieron a probar usando las mismas pruebas de rotación inducidas por fármaco en 5 y 10 semanas después de la inyección rAAV. En 5, 9 y 13 semanas después de rAAV, los animales se registraron en el mismo equipo de rotómetro sin prueba de estimulación farmacológica precedente (rotación

espontanea). La prueba de cilindro también se repitió en 5, 12 y 14 semanas después de la inyección. Para estudiar el efecto del tratamiento en el aprendizaje motor, la integración sensorial-motora así como función motora, formación por pasos, pruebas de escalera y corredor se inició una vez que el efecto terapéutico del tratamiento se manifestó bien. La prueba por pasos se realizó en 5, 10 y 12 semanas después de la inyección rAAV. La prueba de escalera se realizó como una sesión de prueba sencilla durante 21 días entre 22-24 semanas después de la transducción. Los animales luego se sometieron a la prueba de corredor y se mataron en 28 semanas.

Cuarenta ratas con una lesión 6-OHDA confirmada se equilibraron en cuatro grupos basados en su desempeño en la prueba de cilindro, prueba por pasos y prueba de corredor. En 6 semanas después de la lesión, los animales reciben una inyección estereotáctica con volumen igual de vector rAAV5-TH:GCH1 [5µl]. Los cuatro grupos reciben preparaciones de vector para incrementar la concentración que resulta en los siguientes cuatro grupos de dosis; 0.7% [9.1E8gc] de GCH1-TH (n=10), 3.4% [4.6E9gc] de GCH1-TH (n=10), 9.8% [1.3E10gc] de GCH1-TH (n=10), 100% [1.3E11gc] de GCH1-TH (n=10). Un grupo de control, emparejado en edad, intacto de tamaño igual se incluyó como referencia (n=10). Los animales se registraron en la prueba de corredor tanto en cinco semanas después de la lesión 6-OHDA (antes de la inyección AAV) como 12 semanas después de AAV.

Ocho animales con una lesión 6-OHDA confirmada se dividieron en dos grupos (Les-Sham y TH-GCH1) basados en su desempeño en el corredor y en rotación inducida por anfetamina. Los animales en

el grupo TH-GCH1 reciben la inyección estereotáctica de la titulación completa de vector AAV5-TH:GCH1 como se describe a continuación y evalúa usando microdiálisis en línea en un mínimo de 6 meses después de la inyección AAV. Todos los animales se decapitaron y los cerebros se removieron rápidamente y el tejido estriatal se disecó y luego se congeló rápidamente para análisis bioquímico. El mesencéfalo se fijó después en paraformaldehído (PFA) al 4% para validación de la lesión 6-OHDA.

10 **Construcción de vector**

Los vectores víricos utilizados en este estudio fueron vectores rAAV2/5 de pseudotipo, donde el transgen de interés se flanquea por repeticiones terminales invertidos del AAV2 empaquetado en una cápsida AAV5 (referida en la presente como simplemente rAAV). En esta invención, se construyó un plásmido novedoso que expresa tanto los transgenes TH como GCH1. Aquí, dos casetes de expresión se fusionaron en un plásmido AAV2 sencillo. El TH y GCH1 se expresaron bajo el promotor de Sinapsina 1 (Syn-1) humano. El gen GCH1 se siguió por una secuencia SV40 poli-A tardía que luego precede el segundo promotor Syn-1 que controla la expresión del gen TH. Para lograr una expresión superior del gen de TH sobre GCH1, el tráfico del TH mRNA se mejoró por la adición de un elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis Woodchuck (WPRE). La secuencia completa se terminó por una secuencia SV40 poli-A temprana (Fig 1). Los vectores rAAV se produjeron usando un método de transfección doble con el plásmido de transferencia apropiado y el plásmido auxiliar que contiene los genes empaquetados adenovíricos

000111

esenciales como se describe previamente [Grimm et al: Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors; Hum Gene Ther 1998 **18** 2745-60; Hauswirth et al: Production and purification of recombinant adeno-associated virus; Meth Enzymol 2000 **316** 743-61]. Se purificaron posteriormente por gradiente en etapa de iodixanol y cromatografía de columna de Sefarosa Q, como se describe en detalle en cualquier lugar [Ulusoy et al: Dose Optimization for Long-term rAAV-mediated RNA Interference in the Nigrostriatal Projection Neurons; Mol Ther 2009 **17** 1574-84]. La suspensión del vector vírico purificado se tituló usando PCR cuantitativa TaqMan como se describe en cualquier lugar [Ulusoy et al: Dose Optimization for Long-term rAAV-mediated RNA Interference in the Nigrostriatal Projection Neurons; Mol Ther 2009 **17** 1574-84]], pero con cebadores y sonda dirigidos hacia la secuencia WPRE. La titulación final de la suspensión del vector inyectada fue 1.0E13 gc/m.

Procedimientos quirúrgicos

Todos los procedimientos quirúrgicos se condujeron bajo anestesia inducida por una mezcla 20:1 de Fentanil y Dormitor (Apoteksbolaget, Suecia) inyectada i.p. en un volumen total de aprox. 6 ml/kg. Las inyecciones se condujeron usando una jeringa Hamilton de 10 µl con el animal montado en un cuadro estereotáctico (Stoelting, Wood Dale, IL). Los coordinados anteroposterior (AP) y mediolateral (ML) se calcularon de bregma y los coordinados dorsoventrales (DV) de la superficie dural [Watson y Paxinos: The rat brain in stereotaxic coordinates;

. 000112

Academic Press San Diego 1986].

Lesiones 6-OHDA. Los animales reciben inyecciones 6-OHDA (Sigma-Aldrich AB, Suecia) en el MFB derecho (14 µg de base libre en ascorbato-solución salina (0.02%) inyectada a una concentración de 3.5 µg/µl) con objeto de lograr una lesión completa de la trayectoria nigrostriatal [Ungerstedt and Arbuthnott: Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hidroxi-dopamina lesions of the nigrostriatal dopamine system; Brain Res 1970 **24** 485-93]. La inyección se condujo en el siguiente coordinado: AP: - 4.4 mm; ML: - 1.2 mm y DV: - 7.8 mm con la barra de diente ajustada a - 2.4 mm [Carlsson et al: Serotonin neuron transplants exacerbate L-DOPA-induced dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease; J Neurosci 2007 **27** 8011-22]. La inyección se realizó con una aguja de calibre 26 unida a la jeringa Hamilton a una velocidad de inyección de 1 µl/min y la aguja mantenida en el lugar durante unos 3 min adicionales antes de retirarse lentamente.

Inyecciones del vector rAAV. Los animales en el grupo de tratamiento de vector reciben una inyección estereotáctica de vectores rAAV5 de 5 µl en suspensión de lactato de Ringer. Las inyecciones se realizaron como un depósito de 1.5 µl y uno de 1 µl a lo largo de cada uno de los dos tractos de aguja en las siguientes coordinadas: (1) AP: + 1.0 mm; ML: - 2.6 mm y DV: - 4.5, - 3.5 mm y (2) AP: 0 mm; ML: - 3.2 mm y DV: - 5.0, - 4.0 mm con la barra de diente ajustada a - 2.4 mm. La inyección se realizó usando un vidrio capilar tirado (diámetro exterior 60-80

000113

um de diámetro) montado en una aguja de calibre 22s unida a la jeringa Hamilton. La velocidad de inyección fue 0.4 µl/min y la aguja se mantiene en el lugar durante 1 min después del primer depósito y 3 min después de que el segundo depósito se suministró y luego antes de retirarse lentamente del parénquima cerebral.

Pruebas de comportamiento

Se evaluó la rotación inducida por fármaco midiendo las vueltas corporales completas de derecha e izquierda usando cuencas de rotometro automático (AccuScan Instruments Inc., Columbus, Ohio) después de cualquier inyección de sulfato D-anfetamina (2.5 mg/kg, ip; Apoteksbolaget, Suecia) o apomorfina-HCl (0.05 mg/kg, sc; Sigma-Aldrich AB, Suecia) y monitoreó durante 90 y 40 min, respectivamente. Los registros de asimetría rotacional se expresan como vueltas a 360° puras/min y rotaciones ipsilaterales (esto es hacia el lado inyectado) se les asignaron un valor positivo.

Se condujo la prueba de cilindro para evaluar la asimetría usando extremidad superior esencialmente como se describe por [Kirik et al: Growth and functional efficacy of intrastriatal nigral transplants depend on the extent of nigrostriatal degeneration; J Neurosci 2001 **21** 2889-96] con modificaciones menores de [Schallert and Tillerson: Innovative models of cns disease: from molecule to therapy. Intervention strategies for degeneration of dopamine neurons in parkinsonism: optimising behavioral assessment of outcome; 1999 131-51]. Las ratas de colocaron individualmente en un cilindro de vidrio de 20 cm y se

permitieron mover libremente mientras se graban con un videocámara digital. Dos espejos perpendiculares se colocaron detrás del cilindro de vidrio que permiten que la superficie completa del cilindro sea claramente visible en la pantalla. Los animales se dejaron en el cilindro hasta que se observaron al menos 20 toques en la pared del cilindro. La colocación de la extremidad superior y uso en la pared del cilindro durante esta fase exploratoria luego se registro fuera de línea usando análisis cuadro por cuadro por un observador ciego para la identidad de grupo de los animales. La pata usada durante 20 contactos con las paredes del cilindro durante la crianza se registró y presentó como toques de pata izquierda como un porcentaje del número total de toques. En esta prueba, los animales normales registrarán en promedio 50%.

Prueba por pasos (aquinesia de la extremidad superior). La aquinesia de la extremidad superior se evaluó por un investigador ciego para la identidad de grupo de las ratas individuales usando la prueba por pasos inicialmente descrita por [Schallert et al: Excessive bracing reactions and their control by atropine y L-DOPA in an animal analog of Parkinsonism; Exp Neurol 1979 **64** 33-43], modificada para una prueba por pasos lateral por [Olsson et al: Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test; J Neurosci 1995 **15** 3863-75] y utilizada como se describe previamente [Winkler et al: L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hidroxidopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of

nigrostriatal function; Neurobiol Dis 2002 **10** 165-86].

Brevemente, el investigador firmemente sujeta la rata usando ambas manos levantando las patas traseras y una pata fuera de la mesa pero permitiendo que la pata incontrolada contacte la superficie de la mesa. El animal luego se movió sobre una distancia definida de 90 cm a través de la superficie de la mesa en un paso constante lento sobre 5 s. El investigador registra los números para ajustar los pasos laterales en tanto dirección hacia atrás como hacia adelante dos veces, y se calculó el promedio. Los animales se entrenaron por 4 días durante la tercera semana después de la lesión 6-OHDA. El registro promedio de los días 5-7, cuando los animales han alcanzado un desempeño de línea base estable, forma la variable dependiente final. Los datos de este punto de tiempo constituyen el registro de línea base del pre-tratamiento. De esta manera, el promedio de los últimos tres días se usó como un registro de desempeño de pre-tratamiento. En las tres siguientes sesiones de prueba, 6, 9 y 12 semanas después de la inyección rAAV, los animales primero se habituaron a la prueba durante uno o dos días y luego se evaluaron durante tres días consecutivos.

Se usó prueba de escalera para evaluar la extremidad superior experimentada alcanzada y capacidades de presión al emplear una versión modificada del diseño de prueba original descrito por [Montoya et al: The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats; J Neurosci Methods 1991 **36** 219-28] como se describe previamente [Winkler et al: Intranigral transplants of GABA-rich striatal tissue induce behavioral recovery in the rat Parkinson model and

promote the effects obtained by intrastriatal dopaminergic transplants; Exp Neurol 1999 **155** 165-86]. Se reemplazaron peletizados de azúcar (TestDiet, Richmond, VA) en etapas de una escalera doble dividida por una plataforma central amplia (35 mm),
5 todos encerrados en una caja Plexiglas (285 x 60 x 90 mm). Los animales se privaron de alimento 48 horas antes de la primera prueba del día y se mantuvieron en un consumo alimenticio restringido (6-8 g/día) a lo largo del periodo de prueba con alimento únicamente administrado después de la sesión de prueba
10 diaria. La prueba de escalera se realizó como una sesión sencilla 21 semanas después de las inyecciones rAAV. Los animales se entrenaron en la prueba de escalera durante 21 días consecutivos (15 min/día) con 10 peletizados de azúcar colocados en cada una de la etapa 2-5 en ambos lados (total 40 peletizados/lado) donde
15 el día 1 se definió como el primer día en que las ratas comenzaron a recuperar los peletizados de azúcar. Los datos del día 11-15 se usaron como un registro de desempeño estable. En el día 16-18 y 19-21, los peletizados de azúcar únicamente se colocaron en el anaquel izquierdo y derecho, respectivamente,
20 desafiando a las ratas con una elección forzada. El desempeño de la extremidad superior experimentada se expresa como el número de peletizados comidos (tomados - goteados) en el lado parkinsoniano (izquierdo). Se definió la tasa de error como porcentaje goteado ((tomado - comido/ tomado) x 100).

Se realizó la *prueba de corredor* en 5 semanas después de la lesión 6-OHDA MFB, pre inyección AAV (definida como línea base de la lesión) semana 12 o semana 25 después de las inyecciones AAV, como se describe previamente [Dowd et al: The Corridor Task: a

simple test of lateralised response selection sensitive to unilateral dopamine deafferentation and graft-derived dopamine replacement in the striatum; Brain Res Bull 2005 **68** 24-30] para estudiar la selección de respuesta sensorial-motora lateralizada.

5 Brevemente, las ratas se colocaron en el final de un corredor (150 cm x 7 cm x 23 cm) con 10 pares adyacentes de tapas, uniformemente distribuidos a lo largo del piso. Cada tapa se rellenoó con 5-10 peletizados de azúcar. Se definió la recuperación como cada vez que la rata metió su nariz en una tasa
10 única, independientemente de si se comió cualquiera de los peletizados. No se registraron nuevas visitas sin intercalar otras recuperaciones. Cada rata se probó hasta que 20 recuperaciones se hicieron o un tiempo máximo de 5 minutos transcurrido. Las ratas se restringieron al alimento antes y a lo
15 largo de la prueba, como se describe arriba en la prueba de escalera, y se habituaron durante 10 minutos durante 2 días en el corredor, con peletizados de azúcar aislados a lo largo del piso. Para reducir el comportamiento exploratorio las ratas se colocaron en un corredor vacío antes del registro. Las ratas
20 luego se registraron durante 4 días y los resultados se presentan como un promedio de los últimos 2 días. Los datos se expresan como el número de recuperaciones contralaterales como un porcentaje de recuperaciones totales hechas.

Análisis bioquímicos

Doce ratas se mataron por decapitación, de lo cual el cerebro se removió y cortó en el eje coronal en dos partes usando un molde de cerebro. El tejido estriatal de cada hemisferio de la

parte anterior luego se disecó rápidamente y congeló individualmente en hielo seco y almacenó a -80°C hasta análisis adicional. La parte caudal que contiene las regiones mesencéfalo-rombencéfalo se fijó después en paraformaldehído al 4% (PFA) durante 24 horas a 4°C y luego se mantuvo en sacarosa al 25% durante al menos 24 horas. El tejido de cerebro disecado se homogenizó y preparó usando una versión modificada de un protocolo descrito previamente, que permite detección de monoaminas y BH4 por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), actividad TH *in vitro* y análisis western blot de la misma muestra [Romero-Ramos et al: Low selenium diet induces tirosina hidroxilasa enzyme in nigrostriatal system of the rat; Brain Res Mol Brain Res 2000 **84** 7-16]. Brevemente, el tejido se homogenizó en hielo en solución amortiguadora Tris-acetato (5 $\mu\text{l}/\text{mg}$, 20 mM, pH 6.1) usando un desintegrador ultrasónico. Cien μl del homogeneizado luego se pipeteó en cantidad igual de ácido perclórico 0.8 mM enfriado con hielo para mediciones HPLC. El homogeneizado restante se centrifugó durante 10 min en $17,000 \times g$ a 4°C . Cuarenta μl del sobrenadante se diluyó además en 10 μl de solución amortiguadora de Tris-acetato (20 mM, pH 6.1) que contiene Triton X-100 al 0.6% y almacenó a -20°C para ensayo de actividad TH *in vitro*.

Microdiálisis

Se realizó el experimento de microdiálisis (fig. 8) bajo anestesia de isoflurano. Una sonda de microdiálisis con una membrana semi-permeable grande de 3 mm (membrana PES de recorte 35 kD, Microbiotech AB) se insertó en el estriado derecho

(lesionado y cortado en cubos) en las coordenadas AP: + 0.5 mm; ML: - 2.9 mm y DV: - 4.25, - 3.5 mm y (2) AP: 0 mm; ML: - 3.2 mm y DV: - 5.5 con la barra de diente ajustada a -2.4 mm. La sonda se enjuagó usando aCSF a una velocidad de flujo de 0.67 µl/min que carga los circuitos de inyección de un equipo HPLC-EC directamente conectado que permite el análisis con una resolución en tiempo de 15 min. DA y los metabolitos se detectaron y cuantificaron como se describe previamente (Ulusoy et al. Presynaptic dopaminergic compartment determines the susceptibility to L-DOPA-induced dyskinesia in rats. ProcNatlAcadSci EUA (2010) vol. 107 (29) pp. 13159-64). Los datos se presentan como un promedio de tres mediciones consecutivas recolectadas después de un mínimo de una hora de equilibrio después del implante de sonda.

15 **Análisis HPLC de monoaminas y BH4**

El homogeneizado de tejido en ácido perclórico se incubó en hielo durante al menos 20 min antes de la centrifugación (15 min en 9,000 x g a 4°C). El sobrenadante se filtró a través de los filtros de la placa de filtro Whatman durante 2 min adicionales en 9,000 x g. A partir de entonces la muestra se diluyó 1:4 en agua desionizada filtrada Mili-Q y analizó en -80°C hasta el análisis. Los extractos de tejido luego se analizaron HPLC-EC en tres mediciones separadas para (1) DA y serotonina (5-HT); (2) DOPA; y (3) BH4. Para cada medición, 25 µl de cada muestra se inyectó por un automuestreador enfriado (Spark Holland Midas) en un detector electroquímico (ESA Coulochem III) acoplado a una célula guardia (ESA 5020) y una célula analítica de electrodo de vidrio de carbono (ESA 5011). Para detección DA/5-HT y DOPA una

000120

columna C18 de fase inversa (3 μ m ReproSil-pur, 4.6 mm $\varnothing$, 150 mm de longitud, Chrompack) se usó para separación de compuesto, mientras que para detección BH₄, esto se reemplazó con otra columna C18 de fase inversa (5 μ m ReproSil-pur, 4.6 mm $\varnothing$, 250 mm de longitud, Chrompack) precedida por una columna C8 (5 μ m de ReproSil 80, 4.6 mm $\varnothing$, 33 mm de longitud, Chrompack).

La fase móvil para detección DA/5-HT contiene acetato de sodio 60 mM, Na₂-EDTA 90 μ M, ácido 1-octansulfónico 460 μ M en metanol al 9%, donde el pH se ajustó hasta 4.2. Para detección DOPA que contiene NaH₂PO₄ 100 mM ajustada hasta pH 3.0 con H₃PO₄, 90 μ M Na₂-EDTA, sulfato octil de sodio 1 mM en metanol al 10%. La fase móvil usada para detección BH₄, por otro lado, se modificó de un protocolo de detección EC BH₄ previamente descrito [Howells y Hyland: Direct analysis of tetrahydrobiopterin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with redox electrochemistry: prevention of autoxidation during storage y analysis; Clin Chim Acta 1987 **167** 23-30] y compuesto de acetato de sodio 50 mM, ácido cítrico 5 mM, EDTA 48 μ M, DTE 160 μ M en metanol al 5%, pH 5.2. Las fase móviles se suministraron a una velocidad de flujo de 500 μ l/min para catecolaminas y 1 ml/min para BH₄. Se condujo la cuantificación e identificación pico usando el paquete de software Clarity Chromatographic (DataApex, Prague, Republica Checa).

Análisis histológico

Ocho de los animales se anestesiaron profundamente por sobredosis de pentobarbital de sodio (Apoteksbolaget, Suecia) y perfusionaron transcardinalmente con solución salina fisiológica

50 ml seguido por 250 ml de PFA al 4%, enfriado con hielo, preparado frescamente en solución amortiguadora de fosfato 0.1 M ajustada hasta pH=7.4. Los cerebros se removieron y fijaron después durante 2 horas en la misma solución antes de
5 crioprotección en sacarosa al 25% durante 24-48 horas antes del seccionamiento. Los cerebros fijados y las regiones del mesencéfalo fijadas después se cortaron en 40 μ m de secciones coronales en un micrótomó congelado semi-automático (Microm HM 450) y recolectaron en 6 series y almacenaron en solución anti-
10 congelada (solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.5M, glicerol al 30% y etilenglicol al 30%) a -20°C hasta procesamiento adicional. Se realizó inmunohistoquímica usando anticuerpos elevados contra TH (IgG de conejo 1:10,000 Pel-Freez, Rogers, AR), y GCH1 (IgG de conejo hecho a la medida, 1:5,000).
15 La tinción se visualizó usando anticuerpos secundarios biotinilados (BA1000 anti-conejo de cabra, Vector Laboratories, Burlingame, CA) seguido por una incubación de 1 hora con solución de peroxidasa de avidina-biotina (ABC Elite, Vector Laboratories) desarrollada por 3,3'-diaminobenzidina en solución de color H₂O₂
20 al 0.01%.

Ejemplo 2: Cálculos de dosificación

Los hallazgos en los estudios de roedores que utilizan el suministro DOPA mediado por AAV de vector sencillo en el modelo de rata de denervación de dopamina completa no ha permitido determinar precisamente el intervalo de dosis requerido para recuperación funcional. A través de la evaluación cuidadosa, hemos encontrado que una dosis de 9.1E8 gc GCH1-TH (definida como

0.7%, Tabla 1A) resulta en una recuperación importante en 2 de 10 animales en la prueba de corredor. La siguiente dosis $4.6E9$ gc GCH1-TH (3.4%) resulta en recuperación en 8 de 10 animales mientras que las dos dosis más altas probadas, $1.3E10$ gc GCH1-TH (9.8%) y $1.3E11$ gc GCH1-TH (100%) permiten recuperación total en 10 de 10 animales en esta prueba. La dosis al 100% sin embargo resulta en una recuperación más rápida, completa ya en tres semanas después de la cirugía.

Para los cálculos en equivalentes de dosificación en primates no humanos y humanos, se calculó un factor de escala para la región putaminal basado en los datos de literatura en MR y evaluación histológica (Tabla 1B). Estos datos proporcionan un factor de escala entre roedores y humanos de 1:60. Esta figura permite el cálculo de dosis total equivalente entre especies (Tabla 1C) y también confirma que tales dosis son realistas con base en las titulaciones de producción vírica actualmente alcanzables. Basadas en una titulación de producción asumida de $3E13$ gc/ml, la dosis inyectada por putamen humano caerá entre $1.82 \mu\text{l}$ y $260 \mu\text{l}$ (Tabla 1D).

Para definiciones que se ajustan a las diferencias de los pacientes individuales en volumen putaminal y peso corporal, la dosis se volvió a definir como gc/cm^3 de materia gris putaminal o kg de peso corporal (Tabla 1E). Además de los equivalentes para μg de ADN de hebra sencilla (ssDNA) de la preparación del vector se generó basado en el peso molecular del genoma del vector ($1.4 \text{ g}/\mu\text{mol}$).

000123

Tabla 1, Definición de intervalo de dosis terapéutica

Tabla 1A, Definición de dosis

Dosis	Titulaciones por lote del vector [gc/ml]
0.7%	1.8E+11
3.4%	9.2E+11
9.8%	2.6E+12
100%	2.6E+13

Tabla 1B, Factor de escala de volumen putaminal entre especies

Especies	Volumen putamen [cm ³]	de Factor de escala
Rata	0.06 (1)	1
Macaco cynomolgus	0.54 (2)	9
Macaco Rhesus	0.81 (2)	13.5
Humano	3.6 (2)	60

Tabla 1C, Cálculo de dosis total

Especies	Dosis total [gc@0.7%]	Dosis total [gc@3.4%]	Dosis total [gc@9.8%]	Dosis total [gc@100%]
Rata	9.1E+08	4.6E+09	1.3E+10	1.3E+11
Macaco cynomolgus	8.2E+09	4.1E+10	1.2E+11	1.2E+12
Macaco Rhesus	1.2E+10	6.2E+10	1.8E+11	1.8E+12
Humano	5.5E+10	2.8E+11	7.8E+11	7.8E+12

Tabla 1D, Cálculo de volumen requerido

	Vol req.* [µl@0.7%]	Vol req.* [µl@3.4%]	Vol req.* [µl@9.8%]	Vol req.* [µl@100%]
Rata	0.03	0.15	0.43	4.3
Macaco	0.273	1.38	3.9	39
Cynomolgus				
Macaco Rhesus	0.41	2.1	5.85	58.5
Humano	1.82	9.2	26	260

*Calculado de una titulación de producción asumida de 3E13 gc/ml

Tabla 1E, Cálculo de cálculos de dosis específica para terapia humana

Nivel	Dosis	Dosis	Dosis	Dosis
de	[gc/cm ³	de	[gc/kg de peso	[µg ssADN/cm ³
dosis	sustancia gris]	corporal]	sustancia gris]	de [µg ssADN /kg de peso corporal]
0.7%	1.5E+10	1.5E+09	0.04	0.004
3.4%	7.7E+10	7.5E+09	0.2	0.02
9.8%	2.2E+11	2.1E+10	0.5	0.05
100%	2.2E+12	2.1E+11	5.2	0.50

Peso promedio del paciente 74 kg calculado de las referencias (3, 4, 5)

El peso molecular del genoma de vector vírico calculado para 1.4 g/µmol

Las siguientes referencias se han dependientes cuando se determina la dosis de la presente invención.

(1) Chakos et al. Striatal enlargement in rats chronically treated with neuroleptic. Biol Psychiatry (1998) vol. 44 (8) pp. 675-84.

(2) Yin et al. Striatal volume differences between non-human

and human primates. J Neurosci Métodos (2009) vol. 176 (2) pp. 200-5.

(3) Beyer et al. Weight change and body composition in patients with Parkinson's disease. J Am Diet Assoc (1995) vol. 95
5 (9) pp. 979-83.

(4) Uc et al. Predictors of weight loss in Parkinson's disease. MovDisord (2006) vol. 21 (7) pp. 930-6.

(5) Delikanaki-Skaribas et al. Daily energy expenditure, physical activity, and weight loss in Parkinson's disease
10 patients. MovDisord (2009) vol. 24 (5) pp. 667-71

Todos los procedimientos experimentales realizados y presentados en la presente se han aprobado por el Comité Ético para uso de Animales de Laboratorio en la región Lund-Malmö. Números de permisos éticos: M59-06 y M267-08.

15

Ejemplo 3: Secuencias incluidas en la invención

SEQ ID NO 1: GTP ciclohidrolasa 1 (humano)

SEQ ID NO 2: Isoforma GCH-2 de GTP ciclohidrolasa 1 (humano)

SEQ ID NO 3: Isoforma GCH-3 de GTP ciclohidrolasa 1 (humano)

20 SEQ ID NO 4: Isoforma GCH-4 de GTP ciclohidrolasa 1 (humano)

SEQ ID NO 5: GTP ciclohidrolasa 1 (rata)

SEQ ID NO 6: GTP ciclohidrolasa 1 (ratón)

SEQ ID NO 7: Tirosina 3-hidroxilasa (humano)

SEQ ID NO 8: Tirosina 3-monooxigenasa (humano)

SEQ ID NO 9: Tirosina hidroxilasa (humano)

SEQ ID NO 10: Tirosina hidroxilasa (humano)

SEQ ID NO 11: Tirosina 3-monooxigenasa (humano)

SEQ ID NO 12: Tirosina 3-monooxigenasa (humano)

SEQ ID NO 13: Tirosina 3-hidroxilasa (rata)

SEQ ID NO 14: Tirosina 3-hidroxilasa (ratón)

SEQ ID NO 15: Secuencia de terminal izquierda del virus 2 asociado con adeno

5 SEQ ID NO 16: secuencia de terminal derecha del virus 2 asociado con adeno

SEQ ID NO 17: Secuencia promotora de Homo sapiens sinapsina 1 (SYN1)

10 SEQ ID NO 18: Homo sapiens GTP ciclohidrolasa 1 (GCH1), variante de transcripto 1

SEQ ID NO 19: secuencia de poli-adenilación temprana del virus de simio 40

SEQ ID NO 20: secuencia de poli-adenilación tardía del virus de simio 40

15 SEQ ID NO 21: Homo sapiens tirosina hidroxilasa (TH), variante del transcripto 2

SEQ ID NO 22: secuencia de elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis B Woodchuck (WHV8)

20 **SEQ ID NO 1: GTP ciclohidrolasa 1 (humano)**

>sp|P30793|GCH1_HUMANO GTP ciclohidrolasa 1 OS=Homo sapiens
GN=GCH1 PE=1 SV=1

EC=3.5.4.16

Nombres alternativos:

GTP ciclohidrolasa I

Nombres cortos=GTP-CH-I o GCH-1 o GCH1 o GCH 1

Organismo: Homo sapiens (humano)

<http://www.uniprot.org/uniprot/P30793>

000127

MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKSAQPADGWKGERPRS
 EEDNELNLPNLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLKTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDA
 5 IFDEHDDEMVIIVKDIDMFSMCEHHLVPFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQ
 VQERLTKQIAVAITEALRPAGVGVVVEATHMCMVMRGVQKMNSKTVTSTMLGVFREDPKT
 REEFLTLIRS

SEQ ID NO 2: GTP ciclohidrolasa 1 Isoforma GCH-2 (humano)

10 >sp|P30793-2|GCH1_HUMANO Isoforma GCH-2 de GTP ciclohidrolasa 1
 OS=Homo sapiens GN=GCH1

MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKSAQPADGWKGERPRSEEDNE
 LNLPNLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLKTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEHDDEMVI
 15 IVKDIDMFSMCEHHLVPFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQIAVAITE
 ALRPAGVGVVVEATSAEP

SEQ ID NO 3: GTP ciclohidrolasa 1 Isoforma GCH-3 (humano)

>sp|P30793-3|GCH1_HUMANO Isoforma GCH-3 de GTP ciclohidrolasa 1
 20 OS=Homo sapiens GN=GCH1

MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKSAQPADGWKGERPRSEEDNE
 LNLPNLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLKTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEHDDEMVI
 IVKDIDMFSMCEHHLVPFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQIAVAITE
 ALRPAGVGVVVEAT

SEQ ID NO 4: GTP ciclohidrolasa 1 Isoforma GCH-4 (humano)

>sp|P30793-4|GCH1_HUMANO Isoforma GCH-4 de GTP ciclohidrolasa 1

OS=Homo sapiens GN=GCH1

MEKGPVRAPAEKPRGARCSNGFPERDPPRPGPSRPAEKPPRPEAKSAQPADGWKGERPRS

EEDNELNLPNLAAAYSSILSSLGENPQRQGLLKTPWRAASAMQFFTKGYQETISDVLNDA

IFDEDHDEMIVKIDIDMFSMCEHHLVPFVGKVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQ

5 VQERLTKQIAVAITEALRPAGVGVVVEATKSNKYNGLSPLLSSCHLFVAILK

SEQ ID NO 5: GTP ciclohidrolasa 1 (rata)

>sp|P22288|GCH1_RATA GTP ciclohidrolasa 1 OS=Rattus norvegicus

GN=Gch1 PE=1 SV=1

10 MEKPRGVRCTNGFPERELPRPGASRPAEKSRPPEAKGAQPADAWKAGRPRSEEDNELNLP

NLAAAYSSILRSLGEDPQRQGLLKTPWRAATAMQFFTKGYQETISDVLNDAIFDEDHDEM

VIVKDIDMFSMCEHHLVPFVGRVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQI

AVAITEALQPAGVGVVIEATHMCMVMRGVQKMNSKTVTSTMLGVFREDPKTREEFLLIR

S

15 **SEQ ID NO 6: GTP ciclohidrolasa 1 (ratón)**

>sp|Q05915|GCH1_RATÓN GTP ciclohidrolasa 1 OS=Mus musculus

GN=Gch1 PE=2 SV=1

MEKPRGVRCTNGFSERELPRPGASPPAEKSRPPEAKGAQPADAWKAGRHRSEEENQVNLP

KLAAAYSSILLSLGEDPQRQGLLKTPWRAATAMQYFTKGYQETISDVLNDAIFDEDHDEM

20 VIVKDIDMFSMCEHHLVPFVGRVHIGYLPNKQVLGLSKLARIVEIYSRRLQVQERLTKQI

AVAITEALQPAGVGVVIEATHMCMVMRGVQKMNSKTVTSTMLGVFREDPKTREEFLLIR

S

SEQ ID NO 7: Tirosina 3-hidroxilasa (humano)

EC=1.14.16.2

Nombres alternativos: Tirosina 3-monooxigenasa o Tirosina 3-hidroxilasa o Tirosina hidroxilasa

Nombre corto =TH

Organismo: Homo sapiens (humano)

MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMSPRFIGRRQSLIEDARKEREAAVAAAAAAMPSEPG
 DPLEAVAFEEKEGKAVLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEY
 FVRLEVRRGDLAALLSGVRQVSEDVRSAPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLDPGFS
 5 DQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLER
 FSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPE
 PDCCHELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYGA
 GLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRPF
 SVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAI

10

SEQ ID NO 8: Tirosina 3-monooxigenasa (humano)

>sp|P07101|TY3H_HUMANO Tirosina 3-monooxigenasa OS=Homo sapiens
 GN=TH PE=1 SV=5

MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMVRGQGAPGPSLTGSPWPGTAAAPAASYTPTP
 15 RSPRFIGRRQSLIEDARKEREAAVAAAAAAMPSEPGDPLEAVAFEEKEGKAVLNLLFSPR
 ATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLSGVR
 QVSEDVRSAPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLDPGFS DQVYRQRRKLIAEI
 AFQYRHGDPIPRVEYTAEEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNI
 PQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDC
 20 HELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYG
 AGLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYAS
 RIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

SEQ ID NO 9: Tirosina hidroxilasa (humano)

>tr|Q2M3B4|Q2M3B4_HUMANO Tirosina hidroxilasa OS=Homo sapiens
 GN=TH PE=2 SV=1

MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMSPRFIGRRQSLIEDARKEREAAVAAAAAAMPSEPG

000130

PSEPGDPLEAVAFEEKEGKAMLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQR
PRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLSGVRQVSEDVRS PAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLV
TKFDPDLDL DHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEEIATWKEVYTTLK
GLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFL
5 ASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASD
EEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQ
PYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLE
GVQDELDTLAHALSAIG

10 **SEQ ID NO 10: Tirosina hidroxilasa (humano)**

>tr|B7ZL73|B7ZL73_HUMANO TH proteína OS=Homo sapiens GN=TH PE=2
SV=1

MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMVRGQSPRFIGRRQSLIEDARKEREA AVAAA
15 AA AVPSEPGDPLEAVAFEEKEGKAMLNLLFSPRATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETR
PAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLSGVRQVSEDVRS PAGPKVPWFPRKVSELDKC
HHLVTKFDPDLDL DHPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYRHGDPIPRVEYTAEEIATWKEVY
TTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSA
RDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADHTFAQFSQDIGLASL
20 GASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYGAGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEA
AAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVR
RSLEGVQDELDTLAHALSAIG

SEQ ID NO 11: Tirosina 3-monooxigenasa (humano)

>sp|P07101|TY3H_HUMANO Tirosina 3-monooxigenasa OS=Homo sapiens
GN=TH PE=1 SV=5

MPTPDATTPQAKGFRRVSELDAKQAEAIMVRGQGAPGPSLTGSPWPGTAAPAASYTPTP
RSPRFIGRRQSLIEDARKEREA AVAAAAAAVPSEPGDPLEAVAFEEKEGKAVLNLLFSPR

ATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLSGVR
 QVSEDVRSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLDPGFSDQVYRQRRKLIAEI
 AFQYRHGDPIPRVEYTAEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNI
 PQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCC
 5 HELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYG
 AGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYAS
 RIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

10 **SEQ ID NO 12: Tirosina 3-monooxygenasa (humano)**

>sp|P07101|TY3H_HUMANO Tirosina 3-monooxygenasa OS=Homo sapiens
 GN=TH PE=1 SV=5

MPTPDATTPQAKGFRRRAVSELDKQAEAIMVRGQGAPGPSLTGSPWPGTAAAPAASYTPTP
 RSPRFIGRRQSLIEDARKEREAAVAAAAAAMPSEPGDPLEAVAFEEKEGKAVLNLLFSPR
 15 ATKPSALSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQRPRAGGPHLEYFVRLEVRRGDLAALLSGVR
 QVSEDVRSPAGPKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDLDPGFSDQVYRQRRKLIAEI
 AFQYRHGDPIPRVEYTAEIATWKEVYTTLKGLYATHACGEHLEAFALLERFSGYREDNI
 PQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDFLASLAFRVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCC
 HELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGASDEEIEKLSTLYWFTVEFGLCKQNGEVKAYG
 20 AGLLSSYGELLHCLSEEPEIRAFDPEAAAVQPYQDQTYQSVYFVSESFSDAKDKLRSYAS
 RIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPQAVRRSLEGVQDELDTLAHALSAIG

SEQ ID NO 13: Tirosina 3-hidroxilasa (rata)

>sp|P04177|TY3H_RATA Tirosina 3-monooxygenasa OS=Rattus
 norvegicus GN=Th PE=1 SV=3

MPTPSAPSPQPKGFRRRAVSEQDAKQAEAVTSPRFIGRRQSLIEDARKEREAAAAAAMP
 ASSEPGNPLEAVVFEERDGNVNLNLLFSLRGTKPSSLSRAVKVFETFEAKIHHLETRPAQ
 RPLAGSPHLEYFVRFEVPSGDLAALLSSVRRVSDDVRSAREDKVPWFPRKVSELDKCHHL

VTKFDPDLDDLHDPGFSDQVYRQRRKLIAEIAFQYKHGEPIPHVEYTAEEIATWKEVYVTL
 KGLYATHACREHLEGFQLLERYCGYREDSIPQLEDVSRFLKERTGFQLRPVAGLLSARDF
 LASLAFRVVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGAS
 DEEIEKLSTVYWFTVEFGLCKQNGELKAYGAGLLSSYGELLHSLSEEPEVRAFDPDAAV
 5 QPYQDQTYQPVYFVSESFNDAKDKLRNYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPHTIQRSL
 EGVQDELHTLAHALSAIS

SEQ ID NO 14: Tirosina 3-hidroxilasa (ratón)

>sp|P24529|TY3H_RATÓN Tirosina 3-monooxigenasa OS=Mus musculus
 10 GN=Th PE=1 SV=3
 MPTPSASSPQPKGFRRVSEQDTKQAEAVTSPRFIGRRQSLIEDARKEREAAAAAAAAAAV
 ASAEPGNPLEAVVFEERDGNVNLNLLFSLRGTKPSSLSRALKVFETFEAKIHHLETRPAQ
 RPLAGSPHLEYFVRFEVPSGDLAALLSSVRRVSDDVRSAREDKVPWFPRKVSELDKCHHL
 VTKFDPDLDDLHDPGFSDQAYRQRRKLIAEIAFQYKQGEPIPHVEYTKEEIATWKEVYATL
 15 KGLYATHACREHLEAFQLLERYCGYREDSIPQLEDVSHFLKERTGFQLRPVAGLLSARDF
 LASLAFRVVFQCTQYIRHASSPMHSPEPDCCHELLGHVPMLADRTFAQFSQDIGLASLGAS
 DEEIEKLSTVYWFTVEFGLCKQNGELKAYGAGLLSSYGELLHSLSEEPEVRAFDPDAAV
 QPYQDQTYQPVYFVSESFSDAKDKLRNYASRIQRPFSVKFDPYTLAIDVLDSPHTIRRSL
 EGVQDELHTLTQALSAIS

20

SEQ ID NO 15: Secuencia de terminal izquierda del virus 2 asociado con adeno

ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacg
 cccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtggccaactcca
 tcactaggggttcct

SEQ ID NO 16: Secuencia de terminal derecha del virus 2 asociado con adeno

000133

aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcc
cgggcaaagccccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgag
agagggagtgggcaa

5 **SEQ ID NO 17: Secuencia promotora de Homo sapiens sinapsina 1
(SYN1)**

CTAGACTCTAGCTGCAGAGGGACCTGCGTATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCG
GGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCC
AAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTG
10 CCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAG
CACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTC
GCGTCCGCGCCGCGCCGGCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGG
CGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGG
AGTCGTGTGCTGCCTGAGAGCGCAGTCGA

15

**SEQ ID NO 18: Homo sapiens GTP ciclohidrolasa 1 (GCH1), variante
de transcripto 1**

ATGGAGAAGGGCCCTGTGCGGGCACCGGCGGAGAAGCCGCGGGGCGCCAGGTGCAGCAATGGGTT
CCCCGAGCGGGATCCGCCGCGGGCCCGGGCCCAGCAGGCCGGCGGAGAAGCCCCCGCGGGCCCGAGG
20 CCAAGAGCGCGCAGCCCGCGGACGGCTGGAAGGGCGAGCGGCCCCGCGAGCGAGGAGGATAACGAG
CTGAACCTCCCTAACCTGGCAGCCGCCTACTCGTCCATCCTGAGCTCGCTGGGCGAGAACCCCCA
GCGGCAAGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCCTCGGCCATGCAGTTCTTCACCAAGGGCT
ACCAGGAGACCATCTCAGATGTCCTAAACGATGCTATATTTGATGAAGATCATGATGAGATGGTG
ATTGTGAAGGACATAGACATGTTTTCCATGTGTGAGCATCACTTGGTTCCATTTGTTGGAAAGGT
CCATATTGGTTATCTTCCTAACAAGCAAGTCCTTGGCCTCAGCAAACCTTGCGAGGATTGTAGAAA
TCTATAGTAGAAGACTACAAGTTCAGGAGCGCCTTACAAAACAAATTGCTGTAGCAATCACGGAA
GCCTTGCGGCCTGCTGGAGTCGGGGTAGTGGTTGAAGCAACACACATGTGTATGGTAATGCGAGG
TGTACAGAAAATGAACAGCAAACTGTGACCAGCACAAATGTTGGGTGTGTTCCGGGAGGATCCAA

000134

AGACTCGGGAAGAGTTCCTGACTCTCATTAGGA

SEQ ID NO 19: Secuencia de poli-adenilación temprana del virus de simio 40

5 TTCGAGCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCA
CAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAT
CATGTCTGGATCGTCTAGCATCGAA

SEQ ID NO 20: Secuencia de poli-adenilación posterior del virus de simio 40

10 CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGC
TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGT
TAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTT

SEQ ID NO 21: Homo sapiens tirosina hidroxilasa (TH), variante de transcripto 2

15 ATGCCCCACCCCGACGCCACCACGCCACAGGCCAAGGGCTTCCGCAGGGCCGTGTCTGAGCTGGA
CGCCAAGCAGGCAGAGGCCATCATGTCCCCGCGGTTCATTGGGCGCAGGCAGAGCCTCATCGAGG
ACGCCCCGCAAGGAGCGGGAGGCGGCGGTGGCAGCAGCGGCCGCTGCAGTCCCCTCGGAGCCCCGGG
20 GACCCCCTGGAGGCTGTGGCCTTTGAGGAGAAGGAGGGGAAGGCCGTGCTAAACCTGCTCTTCTC
CCCGAGGGCCACCAAGCCCTCGGCGCTGTCCCGAGCTGTGAAGGTGTTTGAGACGTTTGAAGCCA
AAATCCACCATCTAGAGACCCGGCCCCGCCAGAGGCCGCGAGCTGGGGGCCCCCACCTGGAGTAC
TTCGTGCGCCTCGAGGTGCGCCGAGGGGACCTGGCCGCCCTGCTCAGTGGTGTGCGCCAGGTGTC
AGAGGACGTGCGCAGCCCCGCGGGGGCCCAAGGTCCCCTGGTTCCCAAGAAAAGTGTGAGAGCTGG
ACAAGTGTGATCACCTGGTCACCAAGTTCGACCCTGACCTGGACTTGGACCACCCGGGCTTCTCG
GACCAGGTGTACCGCCAGCGCAGGAAGCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGA
CCCGATTCCCCGTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGATTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACCACGC
TGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCCTGCGGGGAGCACCTGGAGGCCTTTGCTTTGCTGGAGCGC

TTCAGCGGCTACCGGGAAGACAATATCCCCCAGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAAGGAGCG
CACGGGCTTCCAGCTGCGGCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCCGCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGG
CCTTCCGCGTGTTCCAGTGACCCAGTATATCCGCCACGCGTCCTCGCCCATGCACTCCCCTGAG
CCGGACTGCTGCCACGAGCTGCTGGGGCACGTGCCCATGCTGGCCGACCGCACCTTCGCGCAGTT
5 CTCGCAGGACATTGGCCTGGCGTCCCTGGGGGCCTCGGATGAGGAAATTGAGAAGCTGTCCACGC
TGTA CTGGTTACGGTGGAGTTCGGGCTGTGTAAGCAGAACGGGGAGGTGAAGGCCTATGGTGCC
GGGCTGCTGTCCTCCTACGGGGAGCTCCTGCACTGCCTGTCTGAGGAGCCTGAGATTCGGGCCTT
CGACCTTGAGGCTGCGGCCGTGCAGCCCTACCAAGACCAGACGTACCAGTCAGTCTACTTCGTGT
CTGAGAGCTTCAGTGACGCCAAGGACAAGCTCAGGAGCTATGCCTCACGCATCCAGCGCCCCCTTC
10 TCCGTGAAGTTCGACCCGTACACGCTGGCCATCGACGTGCTGGACAGCCCCCAGGCCGTGCGGCG
CTCCCTGGAGGGTGTCCAGGATGAGCTGGACACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGG

SEQ ID NO 22: Secuencia de elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis B Woodchuck (WHV8)

15 CGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTG
CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATG
GCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGT
TGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTG
CCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC
20 ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGTGGT
GTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCG
GGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTG
CCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGC
CGCCTCCCCGCCTGGAATTCGAGCT

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de expresión de un vector caracterizado porque comprende

10 a) un primer y un segundo casete de expresión, el primer casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia promotora operablemente ligada a una primera secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en
15 donde el segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia promotora operablemente ligada a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, con la
20 condición de que el vector no comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido aromático de aminoácido descarboxilasa (AADC), o

b) un primer y un segundo casete de expresión, el primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una primera secuencia promotora operablemente ligada a una primera secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o

. 000137

variante del mismo, y en donde el segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia promotora operablemente ligada a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde el vector es un vector asociado a adeno (AAV), o

c) un casete de expresión que comprende un promotor, una primera secuencia de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y una segunda secuencia de nucleótidos, en donde el promotor se liga operablemente a la primera secuencia de nucleótido, y en donde la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción liga la primera y la segunda secuencias de nucleótidos, en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, o

d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido en donde la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción liga la primera y la segunda secuencias de nucleótidos, y en donde la secuencia comprende la primera secuencia de nucleótidos ligada a la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción ligada a la segunda secuencia de nucleótidos está flanqueada por repeticiones

de la terminal 5' y 3', y en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, en donde al menos una de las repeticiones de terminal comprende una secuencia capaz de dirigir la expresión de un polipéptido operablemente ligado.

2. El vector de conformidad con la reivindicación 1 a), caracterizado porque el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el primer casete de expresión, es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el segundo casete de expresión es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

3. El vector de conformidad con la reivindicación 1 b) caracterizado porque el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo expresado por, en donde el polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento

biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el segundo casete de expresión es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

4. El vector de conformidad con la reivindicación 1 c) caracterizado porque el polipéptido codificado GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido codificado de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

5. El vector de conformidad con la reivindicación 1 d) caracterizado porque el polipéptido codificado GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido codificado de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

6. El vector de conformidad con cualquiera de las

000140

reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizado porque el vector no comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido aromático de aminoácido descarboxilasa (AADC).

5 7. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el vector tiene una capacidad de empaquetado desde 1 hasta 40 kb, por ejemplo desde 1 hasta 30 kb, tal como desde 1 hasta 20 kb, por ejemplo desde 1 hasta 15 kb, tal como desde 1 hasta 10, por ejemplo desde 1 hasta 8 kb, tal como desde 2 hasta 7 kb, por ejemplo desde 3 hasta 6 kb, tal como desde 4
10 hasta 5 kb.

8. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el vector tiene una capacidad de empaquetado desde 4.5 hasta 4.8 kb.

15 9. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 8, caracterizado porque el vector es un vector vírico.

10. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 8, caracterizado porque el vector es un vector de plásmido.

20 11. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 8, en donde el vector es un vector sintético.

12. El vector de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el vector vírico es seleccionado del grupo que consiste de un vector asociado con adeno (AAV), vector lentivírico, vector adenovírico y vector retrovírico.

13. El vector de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el vector vírico es un vector asociado a

adeno (AAV).

14. El vector de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el vector asociado a adeno (AAV) es un vector AAV2.

5 15. El vector de conformidad con la reivindicación 14 caracterizado porque la cápsida del vector AAV2 se empaqueta en una cápsida AAV diferente de una cápsida AAV2.

16. El vector de conformidad con la reivindicación 15 caracterizado porque el vector AAV2 se empaqueta en una cápsida
10 AAV5.

17. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 0 hasta 16, caracterizado porque el vector es funcional en células mamíferas.

18. El vector de conformidad con cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 hasta 5, caracterizado porque el fragmento biológicamente activo comprende al menos 50 aminoácidos contiguos, en donde cualquier aminoácido especificado en la secuencia seleccionada se altera a un aminoácido diferente, con la condición de que no más de 15 de los residuos de aminoácido en
20 la secuencia se alteran.

19. El vector de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el fragmento biológicamente activo es el dominio catalítico de tirosina hidroxilasa.

20. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la variante biológicamente activa es un polipéptido de tirosina hidroxilasa mutado, en donde uno o más de los residuos S19, S31, S40 o S404 se han alterado a otro residuo de aminoácido.

5 SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID
NO. 6, más preferiblemente al menos 75% idéntico a un polipéptido
seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más
preferiblemente al menos 80% idéntico a un polipéptido
10 seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más
preferiblemente al menos 85% idéntico a un polipéptido
seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más
15 preferiblemente al menos 90% idéntico a un polipéptido
seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más
preferiblemente al menos 95% idéntico a un polipéptido
seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
20 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más
preferiblemente al menos 96% idéntico a un polipéptido
seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más
preferiblemente al menos 97% idéntico a un polipéptido
seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.
2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más
preferiblemente al menos 98% idéntico a un polipéptido
seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO.

000143

2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 99% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más
5 preferiblemente 100% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6.

22. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 0 hasta 20, caracterizado porque el polipéptido
10 de tirosina hidroxilasa (TH) es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 75% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que
15 consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 80% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ
20 ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 85% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 90% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 95% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de

SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 96% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 97% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 98% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 99% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

23. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el primer y/o el segundo promotor es un promotor específico para células mamíferas.

24. El vector de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque la célula mamífera es una célula neuronal.

25. El vector de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque la célula neuronal es una neurona.

26. El vector de conformidad con la reivindicación 1,

000145

caracterizado porque el primer y segundo promotor son promotores Sinapsina 1.

27. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el primer o el segundo promotores es un
5 promotor Sinapsina 1.

28. El vector de conformidad con la reivindicación 1 caracterizado porque el promotor es un promotor constitutivo.

29. El vector de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el promotor constitutivamente activo es
10 seleccionado del grupo que consiste de CAG, CMV, UbiC humano, RSV, EF-1alfa, SV40, Mt1.

30. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el promotor es un promotor inducible.

31. El vector de conformidad con la reivindicación 30,
15 caracterizado porque el promotor inducible es seleccionado del grupo que consiste de Tet-On, Tet-Off, Mo-MLV-LTR, Mx1, progesterona, RU486 y promotor inducible de Rapamicina.

32. El vector de conformidad con la reivindicación 0,
20 caracterizado porque el primer casete de expresión o el segundo casete de expresión comprende además secuencia de una poliadenilación.

33. El vector de conformidad con la reivindicación 0, caracterizado porque el primer casete de expresión y el segundo casete de expresión comprende además secuencias de poliadenilación.

34. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 o 33, caracterizado porque la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación SV40.

35. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 hasta 34, caracterizado porque la 5' de la secuencia de poliadenilación se liga operablemente a la 3' de la primera y/o la segunda secuencia de nucleótidos.

5 36. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo comprende la secuencia de SEQ ID NO. 18.

10 37. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo comprende la secuencia de SEQ ID NO. 21.

15 38. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 0 hasta 37, caracterizado porque la segunda secuencia de nucleótidos se liga operablemente a un elemento regulador post-transcripcional.

20 39. El vector de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el elemento regulador post-transcripcional es un elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota (WPRE).

40. El vector de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis Woodchuck comprende la secuencia de SEQ ID NO. 22.

41. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 40 caracterizado porque los casetes de

expresión del vector comprende una repetición de terminal 5' y una repetición de terminal 3'.

42. El vector de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque las repeticiones de terminal 5' y 3' se
5 seleccionan de Repeticiones de Terminal Invertidas [ITR] y Repeticiones de Terminal Largas [LTR].

43. El vector de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque las repeticiones de terminal 5' y 3' son Repeticiones de Terminal Invertidas AAV [ITR].

10 44. El vector de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque las Repeticiones de Terminal Invertidas comprenden las secuencias de SEQ ID NO. 15 y SEQ ID NO. 16.

45. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 44 caracterizado porque la relación
15 TH:GCH1 es al menos 3:1, tal como al menos 4:1, por ejemplo al menos 5:1, tal como al menos 6:1, por ejemplo al menos 7:1, tal como al menos 10:1, por ejemplo 15:1, tal como 20:1, por ejemplo 25:1, tal como 30:1, por ejemplo 35:1, tal como 40:1, por ejemplo 45:1, tal como 50:1.

20 46. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 0 hasta 44 caracterizado porque la relación TH:GCH1 es 7:1.

47. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 hasta 46 caracterizado porque la relación se determina al medir la actividad de las enzimas TH y GCH1 expresadas.

48. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 hasta 46 caracterizado porque la relación se

000148

determina al medir la cantidad de Tetrahydrobiopterina (BH₄).

49. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 hasta 46 caracterizado porque la relación se determina por la cantidad de mRNA transcrito.

5 50. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 hasta 46 caracterizado porque la relación se determina por la cantidad de proteína expresada.

10 51. El vector de acuerdo con de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque el vector es el vector definido en la figura 6.

52. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 51 caracterizado porque el vector es un vector mínimamente integrado.

15 53. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 52, caracterizado porque es para uso como un medicamento.

54. La célula hospedera aislada caracterizado porque comprende el vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 53.

20 55. La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 54, caracterizada porque la célula es seleccionada del grupo que consiste de células eucarióticas, preferiblemente células mamíferas, más preferiblemente células de primate, más preferiblemente células humanas.

56. La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 55, caracterizada porque la célula es seleccionada del grupo que consiste de células de ovario de hámster Chino, CHO-K1, células de riñón de hámster bebé, células de fibroblasto-3T3 de ratón,

líneas celulares de mono verde Africano, feocromocitoma adrenal de rata, células AT3, células de tumor glial de rata, células neuronales de rata y células hipocampo de rata.

57. El uso del vector de conformidad con cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 hasta 56, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con disfunción de catecolamina.

58. El uso de conformidad con la reivindicación 57, en donde la disfunción de catecolamina es deficiencia de catecolamina.

10 59. El uso de conformidad con la reivindicación 57 en donde la disfunción de catecolamina es exceso de catecolamina.

60. El uso de conformidad con la reivindicación 58, en donde la deficiencia de catecolamina es deficiencia de dopamina.

15 61. El uso de conformidad con la reivindicación 59, en donde el exceso de catecolamina es exceso de dopamina.

62. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 57 hasta 61 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso central y/o periférico.

20 63. El uso de conformidad con la reivindicación 62, en donde la enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso central y/o periférico es un trastorno neurodegenerativo.

64. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 57 hasta 63 en donde la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad de los ganglios basales.

65. El uso de conformidad con la reivindicación 64, en donde la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de mal de

Parkinson (PD), distonía con respuesta a DOPA, ADHD, esquizofrenia, depresión, parquinsonismo vascular, temblor esencial, tensión crónica, anormalidades del receptor genético de dopamina, uso crónico de opioides, cocaína, alcohol o marihuana, 5 insuficiencia adrenal, hipertensión, deficiencia de noradrenalina, trastorno de tensión post-traumático, trastorno patológico del juego, demencia, demencia del cuerpo de Lewy.

66. El uso de conformidad con la reivindicación 65, caracterizado porque el trastorno neurodegenerativo es mal de 10 Parkinson (PD).

67. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 53, para uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con disfunción de catecolamina.

68. El vector de conformidad con la reivindicación 67, 15 caracterizado porque la disfunción de catecolamina es deficiencia de catecolamina.

69. El vector de conformidad con la reivindicación 67 caracterizado porque la disfunción de catecolamina es exceso de catecolamina.

20 70. El vector de conformidad con la reivindicación 68, caracterizado porque la deficiencia de catecolamina es deficiencia de dopamina.

71. El vector de conformidad con la reivindicación 69, caracterizado porque el exceso de catecolamina es exceso de dopamina.

72. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 67 hasta 71 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad,

trastorno o daño del sistema nervioso central y/o periférico.

73. El vector de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque la enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso central y/o periférico es un trastorno
5 neurodegenerativo.

74. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 67 hasta 73 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad de los ganglios basales.

10 75. El vector de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de mal de Parkinson (PD), distonía con respuesta a DOPA, ADHD, esquizofrenia, depresión, parquinsonismo vascular, temblor esencial, tensión crónica, anormalidades del receptor genético de
15 dopamina, uso crónico de opioides, cocaína, alcohol o marihuana, insuficiencia adrenal, hipertensión, deficiencia de noradrenalina, trastorno de tensión post-traumático, trastorno patológico del juego, demencia, demencia del cuerpo de Lewy.

20 76. El vector de conformidad con la reivindicación 75, caracterizado porque el trastorno neurodegenerativo es mal de Parkinson (PD).

77. El método para tratar una enfermedad asociada con disfunción de catecolamina, caracterizado porque un paciente que necesita del mismo, el método comprende administrar al individuo el vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 53.

78. El método de conformidad con la reivindicación 77, caracterizado porque la disfunción de catecolamina es deficiencia

de catecolamina.

79. El método de conformidad con la reivindicación 77 caracterizado porque la disfunción de catecolamina es exceso de catecolamina.

5 80. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque la deficiencia de catecolamina es deficiencia de dopamina.

10 81. El método de conformidad con la reivindicación 79, caracterizado porque el exceso de catecolamina es exceso de dopamina.

82. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 77 hasta 81 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso central y/o periférico.

15 83. El método de conformidad con la reivindicación 82, caracterizado porque la enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso central y/o periférico es un trastorno neurodegenerativo.

20 84. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 77 hasta 83 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad de los ganglios basales.

85. El método de conformidad con la reivindicación 84, caracterizado porque la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de mal de Parkinson (PD), distonía con respuesta a DOPA, ADHD, esquizofrenia, depresión, parquinsonismo vascular, temblor esencial, tensión crónica, anormalidades del receptor genético de dopamina, uso crónico de opioides, cocaína, alcohol o marihuana,

insuficiencia adrenal, hipertensión, deficiencia de noradrenalina, trastorno de tensión post-traumático, trastorno patológico del juego, demencia, demencia del cuerpo de Lewy.

86. El método de conformidad con la reivindicación 84, 5 caracterizado porque el trastorno neurodegenerativo es mal de Parkinson (PD).

87. Una composición farmacéutica para uso en un método de tratamiento de mal de Parkinson, caracterizada porque la composición que comprende un sistema de expresión de un vector y 10 una formulación para suministrar el vector a los ganglios basales, en donde el sistema de expresión de un vector comprende

a) un primer y un segundo casete de expresión, el primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia promotora operablemente ligada a 15 una primera secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde el segundo casete de expresión comprende una secuencia de nucleótido que comprende una segunda secuencia promotora 20 operablemente ligada a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, con la condición de que el vector no comprende a secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido aromático de aminoácido descarboxilasa (AADC), o

b) un primer y un segundo casete de expresión, el primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que comprende una primera secuencia promotora operablemente ligada a

una primera secuencia de nucleótidos, la primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde el segundo casete de expresión comprende una secuencia
5 de nucleótido que comprende una segunda secuencia promotora operablemente ligada a una segunda secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, caracterizado porque el vector es un vector asociado a adeno
10 (AAV), o

c) un casete de expresión que comprende un promotor, una primera secuencia de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y una segunda secuencia de nucleótidos, en donde
15 el promotor se liga operablemente a la primera secuencia de nucleótido, y en donde la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción liga la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento
20 biológicamente activo o variante del mismo, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, o

d) un casete de expresión que comprende una primera secuencia de nucleótidos, una secuencia de nucleótidos que inicia la traducción tal como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y una segunda secuencia de nucleótido en donde la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción liga la primera

y la segunda secuencia de nucleótidos, y en donde la secuencia comprende la primera secuencia de nucleótidos ligada a la secuencia de nucleótidos que inicia la traducción ligada a la segunda secuencia de nucleótidos está flanqueada por repeticiones
5 de terminal 5' y 3', y en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo
10 o variante del mismo, en donde las repeticiones de terminal comprende una secuencia capaz de dirigir la expresión de polipéptido operablemente ligado.

88. La composición de conformidad con la reivindicación 87 a), caracterizada porque el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1
15 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el primer casete de expresión, es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y caracterizado porque el polipéptido de
20 tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el segundo casete de expresión es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

89. La composición de conformidad con la reivindicación 87 b) caracterizada porque el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo

expresado por, en donde el polipéptido o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, expresado por el segundo casete de expresión es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

90. La composición de conformidad con la reivindicación 87 c) caracterizada porque el polipéptido codificado GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido codificado de tirosina hidroxilasa (TH) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

91. La composición de conformidad con la reivindicación 87 d) caracterizada porque el polipéptido codificado GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido codificado de tirosina hidroxilasa (TH) o el

fragmento biológicamente activo o variante del mismo, es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

5 92. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 91, caracterizada porque la formulación comprende agentes de contraste MRI basados en manitol, heparina o gadolinio.

10 93. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 91 hasta 92 caracterizado porque comprende además factores tróficos o inhibidores de proteasoma reversibles.

15 94. La composición farmacéutica caracterizada porque comprende el vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 53, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 95. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 94, caracterizado porque se formula para administración por inyección, rocío o comprimido sublingual, administración cutánea o inhalación.

96. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 95, caracterizada porque la inyección es intracranial, intracerebral, intravenosa, intravítrea, intranasal, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea, una administración por bolo o una continua.

97. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 91 hasta 96, caracterizada porque el pH de la composición está entre pH 4 y pH 10.

98. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 91 hasta 97, caracterizada porque la dosificación del vector está entre $1.5E+10$ y $2.2E+12$ de copias de genoma del vector por mililitro de materia gris putaminal.

99. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 91 hasta 98, caracterizada porque la administración ocurre en intervalos de 30 minutos hasta 24 horas.

100. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 91 hasta 98, caracterizada porque la administración ocurre en intervalos de 1 hasta 6 horas.

101. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 91 hasta 98, caracterizada porque la duración del tratamiento es desde 6 hasta 72 horas.

102. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 91 hasta 98, caracterizada porque la duración del tratamiento es de larga vida.

103. El método para determinar la relación de expresión del polipéptido GTP ciclohidroxilasal (SEQ ID NOS. 1, 2, 3, 4, 5 y 6) y polipéptido tirosina hidroxilasa (SEQ ID NOS. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14), respectivamente, o variantes de los mismos, el polipéptido codificado por el vector como se define de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 53, caracterizado porque comprende medir la:

- a. actividad enzimática de los polipéptidos, o
- b. cantidad de BH_4 producido, o
- c. cantidad expresada de los polipéptidos, o

000159

d. nivel de mRNA transcrito correspondiente a los polipéptidos del polipéptido GTP ciclohidroxilasal y tirosina hidroxilasa, respectivamente.

104. El método de conformidad con la reivindicación 103,
5 caracterizado porque la relación se determina por una combinación de la actividad de los polipéptidos y la cantidad presente de los polipéptidos.

105. El kit en partes, el kit caracterizado porque comprende la composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las
10 reivindicaciones 91 hasta 102, e instrucciones para administración.

15

20

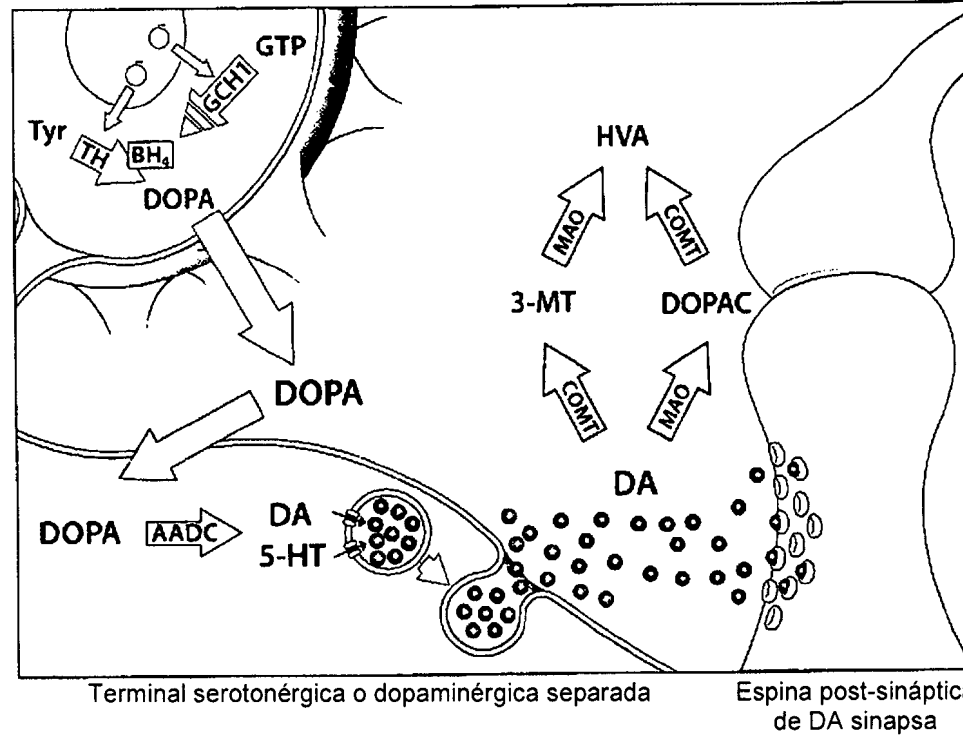
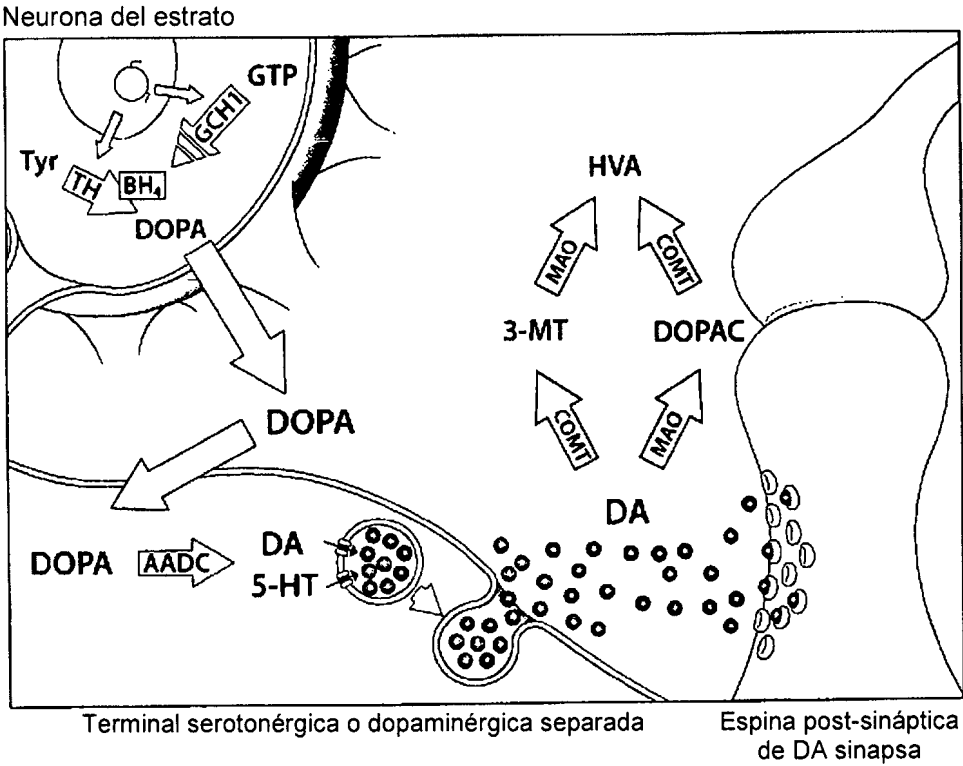


Fig. 1

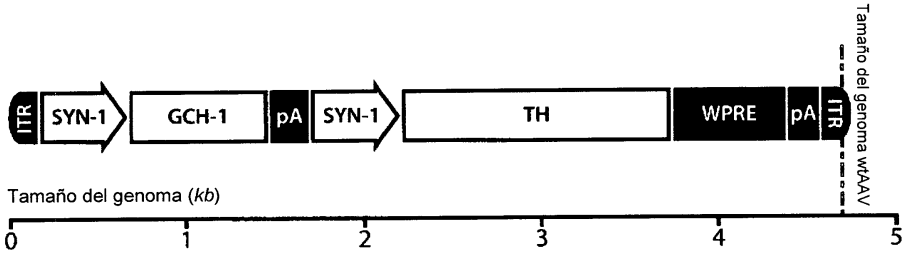


Fig. 2

Figura 3A

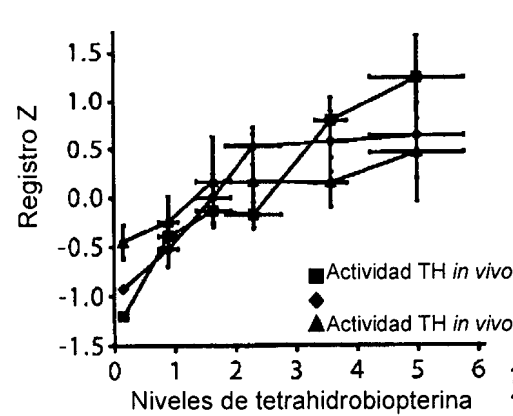


Figura 3B

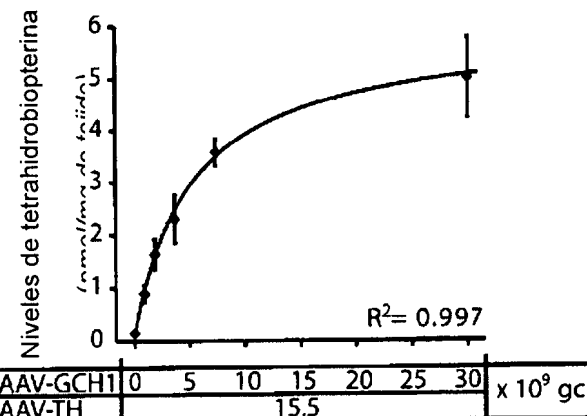


Figura 3C

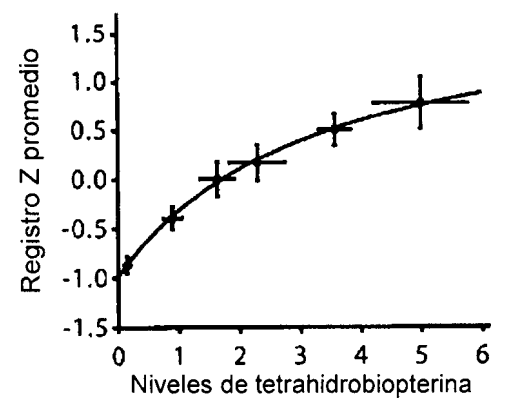


Figura 3D

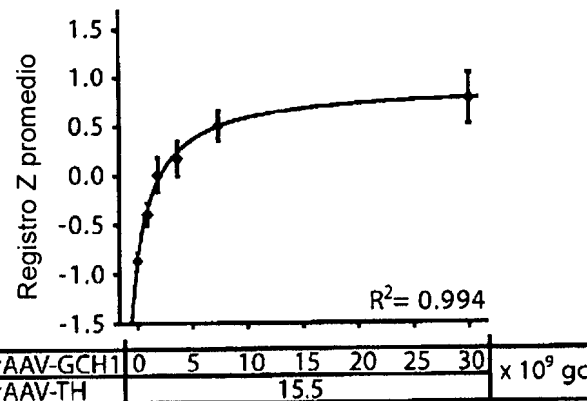


Figura 4A

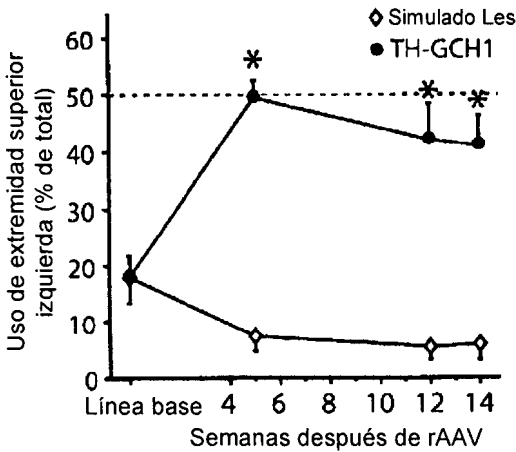


Figura 4B

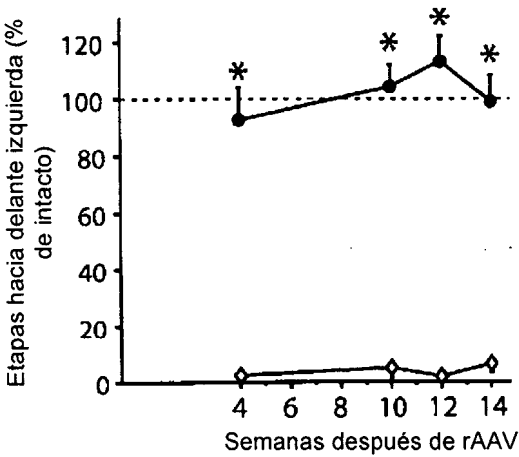


Figura 4D

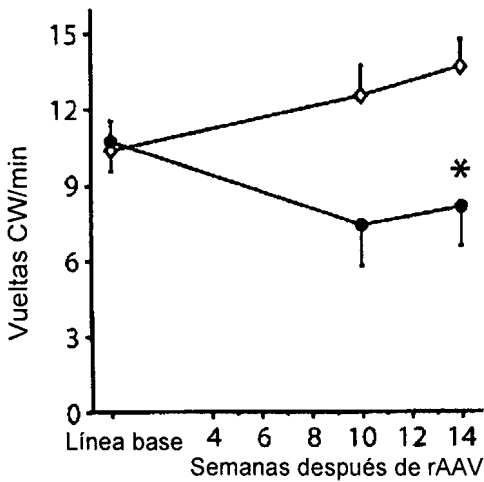


Figura 4E

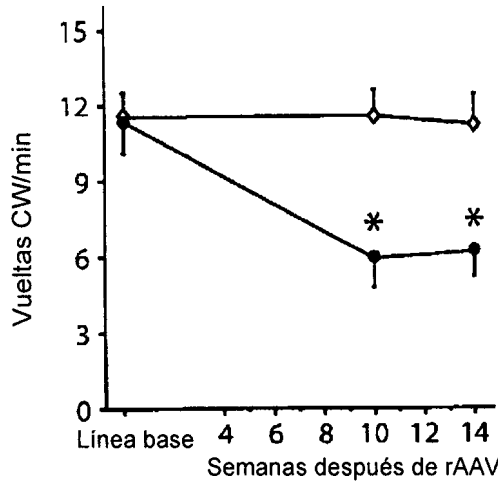


Figura 4C

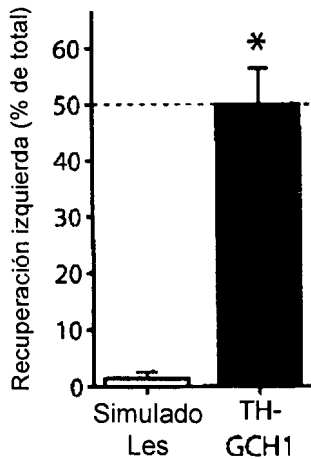
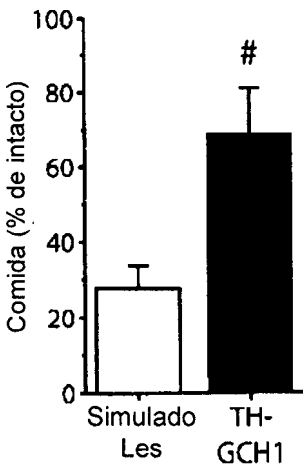


Figura 4F



000164

Figura 5A

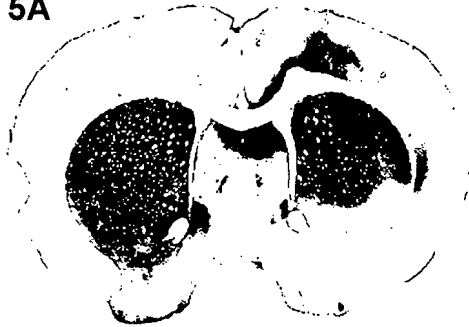


Figura 5B



Figura 5C

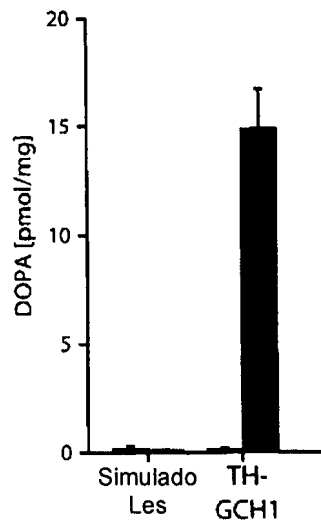


Figura 5D

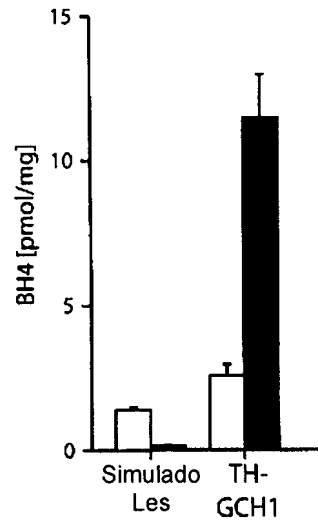


Figura 5E

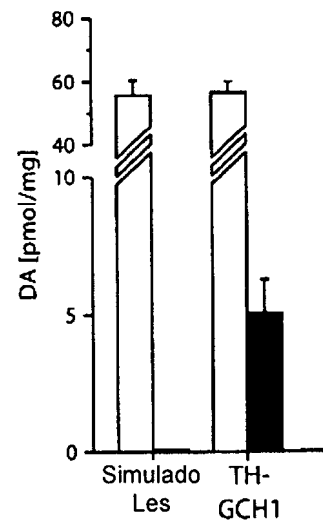


Figura 5F

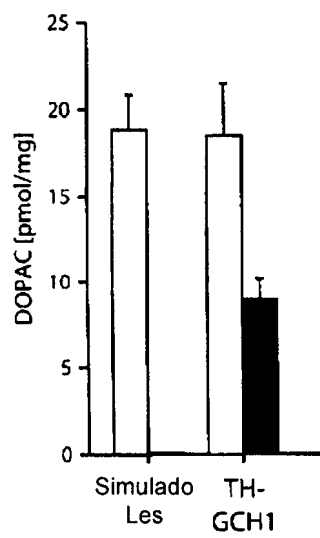
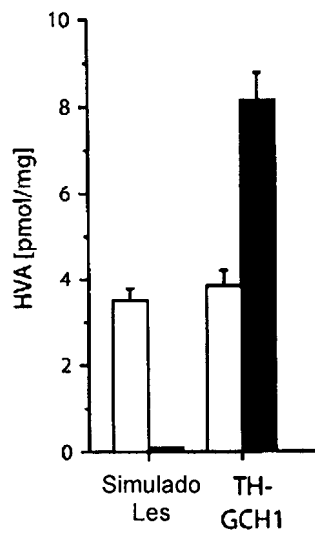


Figura 5G



000165

```

      *        10          *         20           *          30            *          40             *          50
1  [REDACTED]
   >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
AAV ITR

      *        60          *         70           *          80            *          90             *          100
51 [REDACTED]
   >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
AAV ITR

      *       110         *       120          *       130           *       140            *       150
101 [REDACTED] cagat 150
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
AAV ITR

      *       160         *       170          *       180           *       190            *       200
151 cgggcTGCAGGAATTGGCCGCT[REDACTED]
                                >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
                                  Promotor de sinapsina humana

      *       210         *       220          *       230           *       240            *       250
201 [REDACTED]
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

      *       260         *       270          *       280           *       290            *       300
251 [REDACTED]
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

      *       310         *       320          *       330           *       340            *       350
301 [REDACTED]
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

      *       360         *       370          *       380           *       390            *       400

```

Fig. 6

000166

```

351 >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

        410          420          430          440          450
      *    *     *       *         *         *           *            *
401 [REDACTED]
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

        460          470          480          490          500
      *    *     *       *         *         *           *            *
451 [REDACTED]
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

        510          520          530          540          550
      *    *     *       *         *         *           *            *
501 [REDACTED]
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

        560          570          580          590          600
      *    *     *       *         *         *           *            *
551 [REDACTED]
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

        610          620          630          640          650
      *    *     *       *         *         *           *            *
601 [REDACTED]
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

        660          670          680          690          700
      *    *     *       *         *         *           *            *
651 [REDACTED] ATTC AAGCTG CTAGCA AGGATC CACCGT AACATG GAGAAGGGC 700
                                     M E K G
                                     >>>>>>>>>>
                                           GTP ciclohidrolasa 1

>>>>>>
Promotor de sinapsina humana

        710          720          730          740          750
      *    *     *       *         *         *           *            *
701 CCTGTG CGGGCACCGG CGGAGA AGCCGC GGGGCC GCCAGGT GCAGCA ATGG 750
      P V R A P A E K P R G A R C S N G

```

Fig. 6, cont

[illegible]

760 770 780 790 800
 * * * * * * * *
 GTTCCCCGAGCGGGATCCGCCGCGGCCCCGGGCCAGCAGGCCGGCGGAGA 800
 F P E R D P P R P G P S R P A E K

[illegible]

810 820 830 840 850
 * * * * * * *
 801 AGCCCCGCGGCCCGAGGCCAAGAGCGCGCAGCCCGCGGACGGCTGGAAG 850
 P P R P E A K S A Q P A D G W K

GTP ciclohidrolasa 1 isoforma 1

860 870 880 890 900
 * * * * * * *
 851 GGCGAGCGGCCCCGCAGCGAGGAGGATAACGAGCTGAACCTCCCTAACCT 900
 G E R P R S E E D N E L N L P N L

GTP ciclohidrolasa 1 isoforma 1

910 920 930 940 950
 * * * * * * * *
 901 GGCAGCCGCCTACTCGTCCATCCTGAGCTCGCTGGGCGAGAACCCCCAGC 950
 A A A Y S S I L S S L G E N P Q R

GTP ciclohidrolasa 1 isoforma 1

960 970 980 990 1000
 * * * * * * * *
 951 GGCAAGGGCTGCTCAAGACGCCCTGGAGGGCGGCCCTCGGCCATGCAGTTC 1000
 O G L L K T P W R A A S A M Q F

[illegible]

1010 1020 1030 1040 1050
 * * * * * * * *
 1001 TTCACCAAGGGCTACCAGGAGACCATCTCAGATGTCCTAAACGATGCTAT 1050
 F T K G Y Q E T I S D V L N D A I

[illegible]

1060	1070	1080	1090	1100
*	*	*	*	*

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

Fig. 6, cont

000169

10/20

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

```

          1660      1670      1680      1690      1700
          *        *        *        *        *        *        *
1651 TTAGTCGACCGAATTGGCCGCT [REDACTED]
                                >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
                                Promotor de sinapsina

```

```
>>
polyA tardío SV40
```

[illegible]

1760	1770	1780	1790	1800
*	*	*	*	*

Fig. 6, cont.

000170

000171

[illegible]

Fig. 6, cont

000172

[illegible]

Tirosina hidroxilasa isoforma a

[illegible]

Tirosina hidroxilasa isoforma a

[illegible]

Tirosina hidroxilasa isoforma a

[illegible]

Tirosina hidroxilasa isoforma a

[illegible]

Tirosina hidroxilasa isoforma a

[illegible]

Tirosina hidroxilasa isoforma a

2810 2820 2830 2840 2850
 * * * * * * *
 2801 GCTGATTGCTGAGATCGCCTTCCAGTACAGGCACGGCGACCCGATTCCCC 2850
 L I A E I A F O Y R H G D P I P R

Fig. 6, cont

000173

Tirosina hidroxilasa isoforma a

2851 GTGTGGAGTACACCGCCGAGGAGATTGCCACCTGGAAGGAGGTCTACACC 2900
V E Y T A E E I A T W K E V Y T

Tirosina hidroxilasa isoforma a

2901 ACGCTGAAGGGCCTCTACGCCACGCACGCCTGCGGGGAGCACCTGGAGGC 2950
T L K G L Y A T H A C G E H L E A

Tirosina hidroxilasa isoforma a

2951 CTTTGCTTTGCTGGAGCGCTTCAGCGGCTACCGGGAAGACAATATCCCCC 3000
F A L L E R F S G Y R E D N I P Q

Tirosina hidroxilasa isoforma a

3001 AGCTGGAGGACGTCTCCCGCTTCCTGAAGGAGCGCACGGGCTTCCAGCTG 3050
L E D V S R F L K E R T G F Q L

Tirosina hidroxilasa isoforma a

3051 CGGCCTGTGGCCGGCCTGCTGTCCGCCCGGGACTTCCTGGCCAGCCTGGC 3100
R P V A G L L S A R D F L A S L A

Tirosina hidroxilasa isoforma a

3101 CTTCCGCGTGTTCCAGTGCACCCAGTATATCCGCCACGCGTCCTCGCCCA 3150
F R V F Q C T Q Y I R H A S S P M

Tirosina hidroxilasa isoforma a

* * * * *

Fig. 6, cont

000174

Tirosina hidroxilasa isoforma a

Tirosina hidroxilasa isoforma a

Tirosina hidroxilasa isoforma a

Tirosina hidroxilasa isoforma a

Tirosina hidroxilasa isoforma a

Tirosina hidroxilasa isoforma a

Tirosina hidroxilasa isoforma a

Fig. 6, cont

000175

[illegible]

Tirosina hidroxilasa isoforma a

Tirosina hidroxilasa isoforma a

```

          3660      3670      3680      3690      3700
            *        *        *        *        *        *        *        *        *
3651 ACCCTTGCCCATGCGCTGAGTGCCATTGGCTAACTAGTGGATCCGTCGAC 3700
    T L A H A L S A I
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>                >>>>>>
    Tirosina hidroxilasa isoforma a                             WPRE

```

[illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

4210 4220 4230 4240 4250

* * * * * * * *

4201 CCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCC 4250
>>>

WPRE

Fig. 6 cont.

Fig. 6, cont

000177

[illegible][illegible][illegible][illegible]

```

      4460          4470          4480          4490          4500
      *            *            *            *            *            *
4451 GTATCTTATCATGTCTGGATCGTCTAGCATCGAAGATCCCCGATCTG [REDACTED]
                                     <<
                                     AAV ITR

```

SV40 pA

[illegible][illegible]

4601

AAV ITR

Fig. 6, cont

Fig. 6, cont

000178

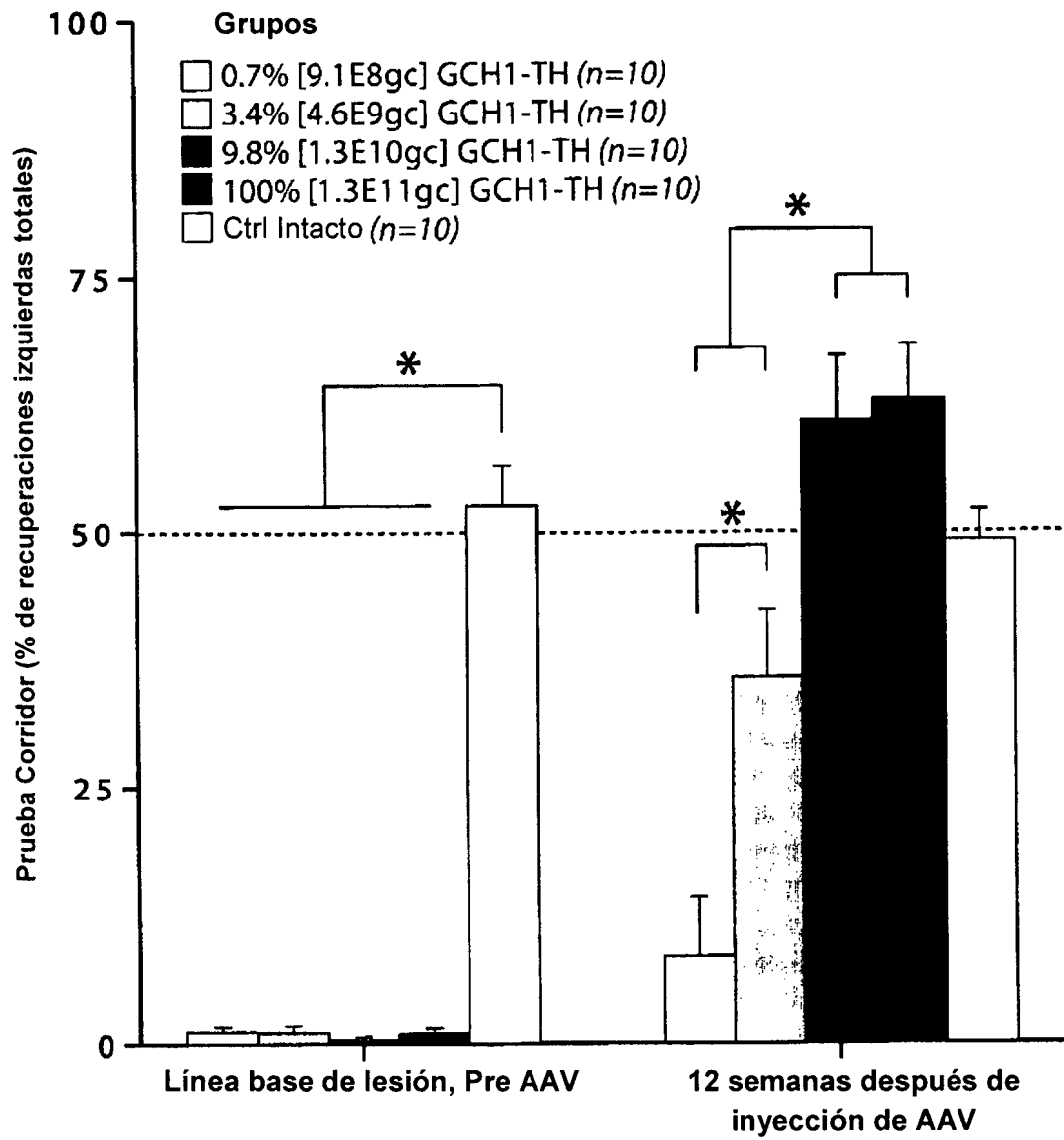


Fig. 7

000179

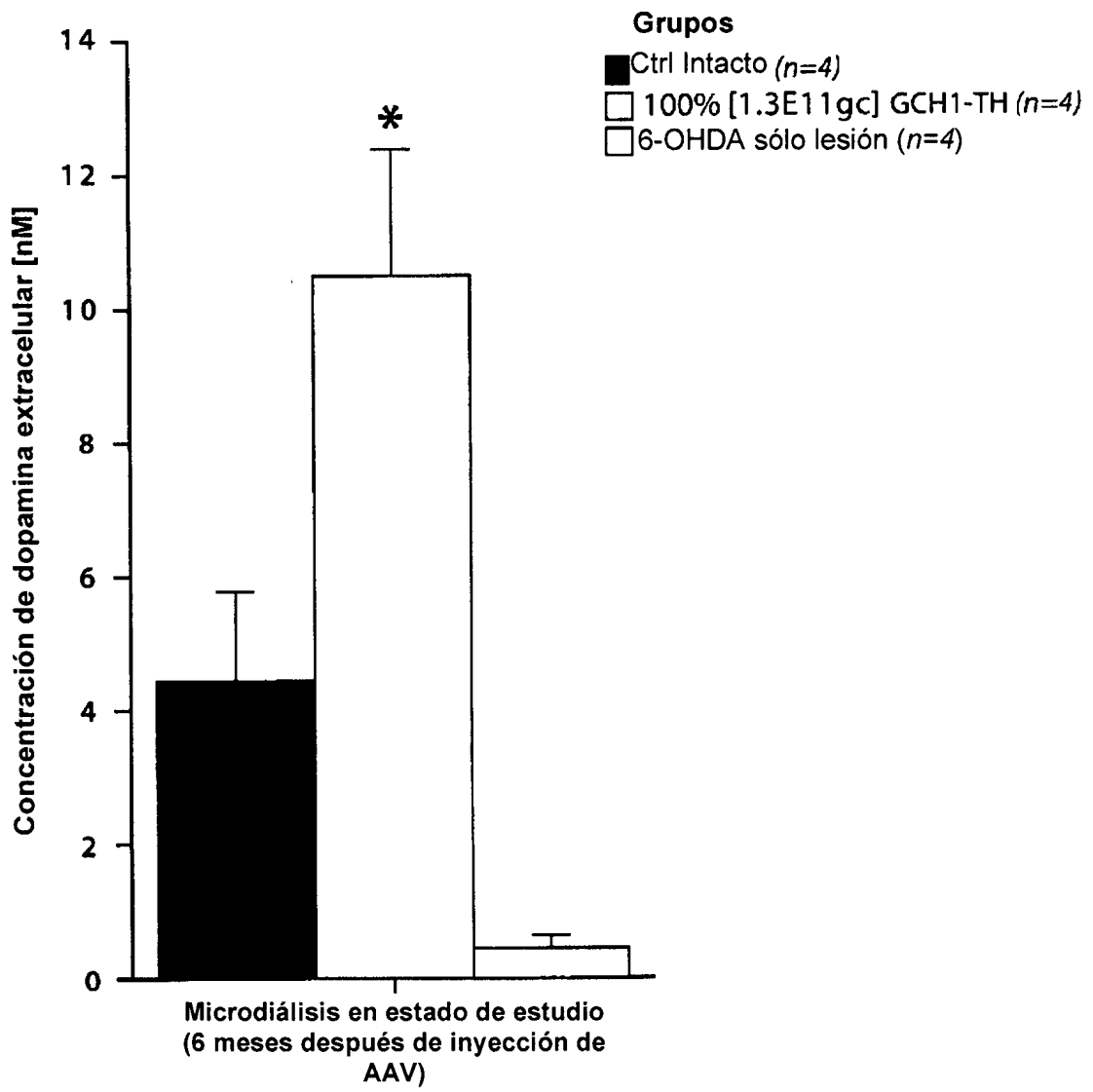


Fig. 8

000180

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un sistema de expresión de un vector que comprende una secuencia que codifica dos polipéptidos, tales como tirosina hidroxilasa (TH) y GTP-
5 ciclohidrolasa 1 (GCH1). Los dos polipéptidos deberían ser preferencialmente expresados en una relación entre 3:1 y 15:1, tal como entre 3:1 y 7:1. La invención es útil en el tratamiento de trastornos deficientes de catecolamina, tales como trastornos deficientes de dopamina incluyendo pero no limitados a mal de
10 Parkinson. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para suministrar el constructo de vector con objeto de limitar la producción incrementada de la catecolamina a las células que necesitan del mismo.

15

20

000181

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genepod Therapeutics AB

<120> Constructo de Vector rAAV Novedoso

<130> P2220PC00

<150> 61/259,502

<151> 2009-11-09

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 25C

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS

<222> (1)..(250)

<223> GTP ciclohidrolasa 1

<400> 1

Met Glu Lys Gly Pro Val Arg Ala Pro Ala Glu Lys Pro Arg Gly Ala
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asn Gly Phe Pro Glu Arg Asp Pro Pro Arg Pro Gly Pro
20 25 30

Ser Arg Pro Ala Glu Lys Pro Pro Arg Pro Glu Ala Lys Ser Ala Gln
35 40 45

Pro Ala Asp Gly Trp Lys Gly Glu Arg Pro Arg Ser Glu Glu Asp Asn
50 55 60

Glu Leu Asn Leu Pro Asn Leu Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Gly Leu Leu Lys Thr Pro Trp
85 90 95

Arg Ala Ala Ser Ala Met Gln Phe Phe Thr Lys Gly Tyr Gln Glu Thr
100 105 110

Ile Ser Asp Val Leu Asn Asp Ala Ile Phe Asp Glu Asp His Asp Glu
115 120 125

Met Val Ile Val Lys Asp Ile Asp Met Phe Ser Met Cys Glu His His
130 135 140

Leu Val Pro Phe Val Gly Lys Val His Ile Gly Tyr Leu Pro Asn Lys
145 150 155 160

Gln Val Leu Gly Leu Ser Lys Leu Ala Arg Ile Val Glu Ile Tyr Ser
165 170 175

000182

Arg Arg Leu Gln Val Gln Glu Arg Leu Thr Lys Gln Ile Ala Val Ala
 180 185 190

Ile Thr Glu Ala Leu Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Val Val Glu Ala
 195 200 205

Thr His Met Cys Met Val Met Arg Gly Val Gln Lys Met Asn Ser Lys
 210 215 220

Thr Val Thr Ser Thr Met Leu Gly Val Phe Arg Glu Asp Pro Lys Thr
 225 230 235 240

Arg Glu Glu Phe Leu Thr Leu Ile Arg Ser
 245 250

<210> 2
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
 <222> (1)..(213)
 <223> GTP ciclohidrolasa 1 Isoforma GCH-2

<400> 2

Met Glu Lys Gly Pro Val Arg Ala Pro Ala Glu Lys Pro Arg Gly Ala
 1 5 10 15

Arg Cys Ser Asn Gly Phe Pro Glu Arg Asp Pro Pro Arg Pro Gly Pro
 20 25 30

Ser Arg Pro Ala Glu Lys Pro Pro Arg Pro Glu Ala Lys Ser Ala Gln
 35 40 45

Pro Ala Asp Gly Trp Lys Gly Glu Arg Pro Arg Ser Glu Glu Asp Asn
 50 55 60

Glu Leu Asn Leu Pro Asn Leu Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Gly Leu Leu Lys Thr Pro Trp
 85 90 95

Arg Ala Ala Ser Ala Met Gln Phe Phe Thr Lys Gly Tyr Gln Glu Thr
 100 105 110

Ile Ser Asp Val Leu Asn Asp Ala Ile Phe Asp Glu Asp His Asp Glu
 115 120 125

Met Val Ile Val Lys Asp Ile Asp Met Phe Ser Met Cys Glu His His
 130 135 140

Leu Val Pro Phe Val Gly Lys Val His Ile Gly Tyr Leu Pro Asn Lys

000183

000184

Gln Val Leu Gly Leu Ser Lys Leu Ala Arg Ile Val Glu Ile Tyr Ser
165 170 175

Arg Arg Leu Gln Val Gln Glu Arg Leu Thr Lys Gln Ile Ala Val Ala
180 185 190

Ile Thr Glu Ala Leu Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Val Val Glu Ala
195 200 205

Thr

<210> 4
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(233)
<223> GTP ciclohidrolasa 1 Isoforma GCH-4

<400> 4
Met Glu Lys Gly Pro Val Arg Ala Pro Ala Glu Lys Pro Arg Gly Ala
1 5 10 15

Arg Cys Ser Asn Gly Phe Pro Glu Arg Asp Pro Pro Arg Pro Gly Pro
20 25 30

Ser Arg Pro Ala Glu Lys Pro Pro Arg Pro Glu Ala Lys Ser Ala Gln
35 40 45

Pro Ala Asp Gly Trp Lys Gly Glu Arg Pro Arg Ser Glu Glu Asp Asn
50 55 60

Glu Leu Asn Leu Pro Asn Leu Ala Ala Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gly Glu Asn Pro Gln Arg Gln Gly Leu Leu Lys Thr Pro Trp
85 90 95

Arg Ala Ala Ser Ala Met Gln Phe Phe Thr Lys Gly Tyr Gln Glu Thr
100 105 110

Ile Ser Asp Val Leu Asn Asp Ala Ile Phe Asp Glu Asp His Asp Glu
115 120 125

Met Val Ile Val Lys Asp Ile Asp Met Phe Ser Met Cys Glu His His
130 135 140

Leu Val Pro Phe Val Gly Lys Val His Ile Gly Tyr Leu Pro Asn Lys
145 150 155 160

Gln Val Leu Gly Leu Ser Lys Leu Ala Arg Ile Val Glu Ile Tyr Ser
165 170 175

000185

Arg Arg Leu Gln Val Gln Glu Arg Leu Thr Lys Gln Ile Ala Val Ala
180 185 190

Ile Thr Glu Ala Leu Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Val Val Glu Ala
195 200 205

Thr Lys Ser Asn Lys Tyr Asn Lys Gly Leu Ser Pro Leu Leu Ser Ser
210 215 220

Cys His Leu Phe Val Ala Ile Leu Lys
225 230

<210> 5
<211> 241
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(241)
<223> GTP ciclohidrolasa 1

<400> 5

Met Glu Lys Pro Arg Gly Val Arg Cys Thr Asn Gly Phe Pro Glu Arg
1 5 10 15

Glu Leu Pro Arg Pro Gly Ala Ser Arg Pro Ala Glu Lys Ser Arg Pro
20 25 30

Pro Glu Ala Lys Gly Ala Gln Pro Ala Asp Ala Trp Lys Ala Gly Arg
35 40 45

Pro Arg Ser Glu Glu Asp Asn Glu Leu Asn Leu Pro Asn Leu Ala Ala
50 55 60

Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Arg Ser Leu Gly Glu Asp Pro Gln Arg Gln
65 70 75 80

Gly Leu Leu Lys Thr Pro Trp Arg Ala Ala Thr Ala Met Gln Phe Phe
85 90 95

Thr Lys Gly Tyr Gln Glu Thr Ile Ser Asp Val Leu Asn Asp Ala Ile
100 105 110

Phe Asp Glu Asp His Asp Glu Met Val Ile Val Lys Asp Ile Asp Met
115 120 125

Phe Ser Met Cys Glu His His Leu Val Pro Phe Val Gly Arg Val His
130 135 140

Ile Gly Tyr Leu Pro Asn Lys Gln Val Leu Gly Leu Ser Lys Leu Ala
145 150 155 160

Arg Ile Val Glu Ile Tyr Ser Arg Arg Leu Gln Val Gln Glu Arg Leu

000186

165

170

175

Thr Lys Gln Ile Ala Val Ala Ile Thr Glu Ala Leu Gln Pro Ala Gly
180 185 190

Val Gly Val Val Ile Glu Ala Thr His Met Cys Met Val Met Arg Gly
195 200 205

Val Gln Lys Met Asn Ser Lys Thr Val Thr Ser Thr Met Leu Gly Val
210 215 220

Phe Arg Glu Asp Pro Lys Thr Arg Glu Glu Phe Leu Thr Leu Ile Arg
225 230 235 240

Ser

<210> 6
<211> 241
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(241)
<223> GTP ciclohidrolasa 1

<400> 6

Met Glu Lys Pro Arg Gly Val Arg Cys Thr Asn Gly Phe Ser Glu Arg
1 5 10 15

Glu Leu Pro Arg Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Glu Lys Ser Arg Pro
20 25 30

Pro Glu Ala Lys Gly Ala Gln Pro Ala Asp Ala Trp Lys Ala Gly Arg
35 40 45

His Arg Ser Glu Glu Glu Asn Gln Val Asn Leu Pro Lys Leu Ala Ala
50 55 60

Ala Tyr Ser Ser Ile Leu Leu Ser Leu Gly Glu Asp Pro Gln Arg Gln
65 70 75 80

Gly Leu Leu Lys Thr Pro Trp Arg Ala Ala Thr Ala Met Gln Tyr Phe
85 90 95

Thr Lys Gly Tyr Gln Glu Thr Ile Ser Asp Val Leu Asn Asp Ala Ile
100 105 110

Phe Asp Glu Asp His Asp Glu Met Val Ile Val Lys Asp Ile Asp Met
115 120 125

Phe Ser Met Cys Glu His His Leu Val Pro Phe Val Gly Arg Val His
130 135 140

Ile Gly Tyr Leu Pro Asn Lys Gln Val Leu Gly Leu Ser Lys Leu Ala

000187

Ser

```
<210> 7
<211> 496
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<221>  CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222>  (1)..(496)
<223>  Tirosina 3-hidroxilasa
```

<400> 7

Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Ser Pro
20 25 30

Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu
35 40 45

Arg Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro
50 55 60

Gly Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala
65 70 75 80

Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys Pro Ser Ala Leu
85 90 95

Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His His
100 105 110

Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly Gly Pro His Leu
115 120 125

000188

Glu Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ala Leu
 130 135 140

Leu Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg Ser Pro Ala Gly
 145 150 155 160

Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys Cys
 165 170 175

His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His Pro
 180 185 190

Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala Glu
 195 200 205

Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu Tyr
 210 215 220

Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu Lys
 225 230 235 240

Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe Ala
 245 250 255

Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn Ile Pro Gln Leu
 260 265 270

Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu Arg
 275 280 285

Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu Ala
 290 295 300

Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser Pro
 305 310 315 320

Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His Val
 325 330 335

Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile Gly
 340 345 350

Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser Thr
 355 360 365

Leu Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly Glu
 370 375 380

Val Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu Leu
 385 390 395 400

His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala
 405 410 415

000189

Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe
420 425 430

Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala
435 440 445

Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu
450 455 460

Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu
465 470 475 480

Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile
485 490 495

<210> 8
<211> 528
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(528)
<223> Tirosina 3-monooxigenasa

<400> 8
Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Val Arg
20 25 30

Gly Gln Gly Ala Pro Gly Pro Ser Leu Thr Gly Ser Pro Trp Pro Gly
35 40 45

Thr Ala Ala Pro Ala Ala Ser Tyr Thr Pro Thr Pro Arg Ser Pro Arg
50 55 60

Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu Arg
65 70 75 80

Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro Gly
85 90 95

Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala Val
100 105 110

Leu Asn Ieu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys Pro Ser Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His His Leu
130 135 140

Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly Gly Pro His Leu Glu
145 150 155 160

000190

Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ala Leu Leu
 165 170 175
 Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg Ser Pro Ala Gly Pro
 180 185 190
 Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys Cys His
 195 200 205
 His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His Pro Gly
 210 215 220
 Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala Glu Ile
 225 230 235 240
 Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu Tyr Thr
 245 250 255
 Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu Lys Gly
 260 265 270
 Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe Ala Leu
 275 280 285
 Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn Ile Pro Gln Leu Glu
 290 295 300
 Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu Arg Pro
 305 310 315 320
 Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu Ala Phe
 325 330 335
 Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser Pro Met
 340 345 350
 His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His Val Pro
 355 360 365
 Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile Gly Leu
 370 375 380
 Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser Thr Leu
 385 390 395 400
 Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly Glu Val
 405 410 415
 Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu Leu His
 420 425 430
 Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala Ala

- 000191

435 440 445
 Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe Val
 450 455 460

 Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala Ser
 465 470 475 480

 Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu Ala
 485 490 495

 Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu Gly
 500 505 510

 Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile Gly
 515 520 525

 <210> 9
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
 <222> (1)..(497)
 <223> Tirosina hidroxilasa

 <400> 9

 Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15

 Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Ser Pro
 20 25 30

 Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu
 35 40 45

 Arg Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro
 50 55 60

 Gly Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala
 65 70 75 80

 Met Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys Pro Ser Ala Leu
 85 90 95

 Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His His
 100 105 110

 Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly Gly Pro His Leu
 115 120 125

 Glu Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ala Leu
 130 135 140

000192

Leu Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg Ser Pro Ala Gly
145 150 155 160

Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys Cys
165 170 175

His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His Pro
180 185 190

Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala Glu
195 200 205

Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu Tyr
210 215 220

Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu Lys
225 230 235 240

Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe Ala
245 250 255

Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn Ile Pro Gln Leu
260 265 270

Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu Arg
275 280 285

Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu Ala
290 295 300

Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser Pro
305 310 315 320

Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His Val
325 330 335

Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile Gly
340 345 350

Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser Thr
355 360 365

Leu Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly Glu
370 375 380

Val Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu Leu
385 390 395 400

His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala
405 410 415

Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe
420 425 430

000193

Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala
 435 440 445

Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu
 450 455 460

Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu
 465 470 475 480

Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile
 485 490 495

Gly

<210> 10
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
 <222> (1)..(501)
 <223> Tirosina hidroxilasa

<400> 10

Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Val Arg
 20 25 30

Gly Gln Ser Pro Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp
 35 40 45

Ala Arg Lys Glu Arg Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val
 50 55 60

Pro Ser Glu Pro Gly Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys
 65 70 75 80

Glu Gly Lys Ala Met Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys
 85 90 95

Pro Ser Ala Leu Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala
 100 105 110

Lys Ile His His Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly
 115 120 125

Gly Pro His Leu Glu Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp
 130 135 140

Leu Ala Ala Leu Leu Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg
 145 150 155 160

000194

Ser Pro Ala Gly Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu
 165 170 175
 Leu Asp Lys Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp
 180 185 190
 Leu Asp His Pro Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys
 195 200 205
 Leu Ile Ala Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro
 210 215 220
 Arg Val Glu Tyr Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr
 225 230 235 240
 Thr Thr Leu Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu
 245 250 255
 Glu Ala Phe Ala Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn
 260 265 270
 Ile Pro Gln Leu Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly
 275 280 285
 Phe Gln Leu Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu
 290 295 300
 Ala Ser Leu Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His
 305 310 315 320
 Ala Ser Ser Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu
 325 330 335
 Leu Gly His Val Pro Met Leu Ala Asp His Thr Phe Ala Gln Phe Ser
 340 345 350
 Gln Asp Ile Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu
 355 360 365
 Lys Leu Ser Thr Leu Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys
 370 375 380
 Gln Asn Gly Glu Val Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr
 385 390 395 400
 Gly Glu Leu Leu His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe
 405 410 415
 Asp Pro Glu Ala Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln
 420 425 430
 Ser Val Tyr Phe Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu

000195

435440445

Arg Ser Tyr Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp
450455460

Pro Tyr Thr Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg
465470475480

Arg Ser Leu Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala
485490495

Leu Ser Ala Ile Gly
500

<210> 11
<211> 528
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(528)
<223> Tirosina 3-monooxigenasa

<400> 11

Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
151015

Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Val Arg
202530

Gly Gln Gly Ala Pro Gly Pro Ser Leu Thr Gly Ser Pro Trp Pro Gly
354045

Thr Ala Ala Pro Ala Ala Ser Tyr Thr Pro Thr Pro Arg Ser Pro Arg
505560

Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu Arg
65707580

Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro Gly
859095

Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala Val
100105110

Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys Pro Ser Ala Leu Ser
115120125

Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His His Leu
130135140

Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly Gly Pro His Leu Glu
145150155160

Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ala Leu Leu
 165 170 175

Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg Ser Pro Ala Gly Pro
 180 185 190

Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys Cys His
 195 200 205

His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His Pro Gly
 210 215 220

Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala Glu Ile
 225 230 235 240

Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu Tyr Thr
 245 250 255

Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu Lys Gly
 260 265 270

Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe Ala Leu
 275 280 285

Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn Ile Pro Gln Leu Glu
 290 295 300

Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu Arg Pro
 305 310 315 320

Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu Ala Phe
 325 330 335

Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser Pro Met
 340 345 350

His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His Val Pro
 355 360 365

Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile Gly Leu
 370 375 380

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser Thr Leu
 385 390 395 400

Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly Glu Val
 405 410 415

Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu Leu His
 420 425 430

Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala Ala
 435 440 445

000197

Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe Val
450 455 460

Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala Ser
465 470 475 480

Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu Ala
485 490 495

Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu Gly
500 505 510

Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile Gly
515 520 525

<210> 12
<211> 528
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(528)
<223> Tirosina 3-monooxigenasa

<400> 12

Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg
1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Val Arg
20 25 30

Gly Gln Gly Ala Pro Gly Pro Ser Leu Thr Gly Ser Pro Trp Pro Gly
35 40 45

Thr Ala Ala Pro Ala Ala Ser Tyr Thr Pro Thr Pro Arg Ser Pro Arg
50 55 60

Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu Arg
65 70 75 80

Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro Gly
85 90 95

Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala Val
100 105 110

Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys Pro Ser Ala Leu Ser
115 120 125

Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His His Leu
130 135 140

Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly Gly Pro His Leu Glu
145 150 155 160

000198

Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ala Leu Leu
165 170 175

Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg Ser Pro Ala Gly Pro
180 185 190

Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys Cys His
195 200 205

His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His Pro Gly
210 215 220

Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala Glu Ile
225 230 235 240

Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu Tyr Thr
245 250 255

Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu Lys Gly
260 265 270

Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe Ala Leu
275 280 285

Leu Glu Arg Phe Ser Gly Tyr Arg Glu Asp Asn Ile Pro Gln Leu Glu
290 295 300

Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu Arg Pro
305 310 315 320

Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu Ala Phe
325 330 335

Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser Pro Met
340 345 350

His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His Val Pro
355 360 365

Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile Gly Leu
370 375 380

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser Thr Leu
385 390 395 400

Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly Glu Val
405 410 415

Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu Leu His
420 425 430

Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala Ala

- 000199

435 440 445
 Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe Val
 450 455 460
 Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala Ser
 465 470 475 480
 Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu Ala
 485 490 495
 Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu Gly
 500 505 510
 Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile Gly
 515 520 525
 <210> 13
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
 <222> (1)..(498)
 <223> Tirosina 3-hidroxilasa
 <400> 13
 Met Pro Thr Pro Ser Ala Pro Ser Pro Gln Pro Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Val Ser Glu Gln Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Val Thr Ser Pro
 20 25 30
 Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu
 35 40 45
 Arg Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Ala Ser Ser Glu
 50 55 60
 Pro Gly Asn Pro Leu Glu Ala Val Val Phe Glu Glu Arg Asp Gly Asn
 65 70 75 80
 Ala Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Leu Arg Gly Thr Lys Pro Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His
 100 105 110
 His Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Leu Ala Gly Ser Pro His
 115 120 125
 Leu Glu Tyr Phe Val Arg Phe Glu Val Pro Ser Gly Asp Leu Ala Ala
 130 135 140

000200

Leu Leu Ser Ser Val Arg Arg Val Ser Asp Asp Val Arg Ser Ala Arg
145 150 155 160

Glu Asp Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys
165 170 175

Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His
180 185 190

Pro Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala
195 200 205

Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Lys His Gly Glu Pro Ile Pro His Val Glu
210 215 220

Tyr Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Val Thr Leu
225 230 235 240

Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Arg Glu His Leu Glu Gly Phe
245 250 255

Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Cys Gly Tyr Arg Glu Asp Ser Ile Pro Gln
260 265 270

Leu Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu
275 280 285

Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu
290 295 300

Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser
305 310 315 320

Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His
325 330 335

Val Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile
340 345 350

Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser
355 360 365

Thr Val Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly
370 375 380

Glu Leu Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu
385 390 395 400

Leu His Ser Leu Ser Glu Glu Pro Glu Val Arg Ala Phe Asp Pro Asp
405 410 415

Thr Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Val Tyr
420 425 430

000201

Phe Val Ser Glu Ser Phe Asn Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Asn Tyr
 435 440 445

Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr
 450 455 460

Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro His Thr Ile Gln Arg Ser Leu
 465 470 475 480

Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu His Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala
 485 490 495

Ile Ser

<210> 14
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
 <222> (1)..(498)
 <223> Tirosina 3-hidroxilasa

<400> 14

Met Pro Thr Pro Ser Ala Ser Ser Pro Gln Pro Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Gln Asp Thr Lys Gln Ala Glu Ala Val Thr Ser Pro
 20 25 30

Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu
 35 40 45

Arg Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Ala Ser Ala Glu
 50 55 60

Pro Gly Asn Pro Leu Glu Ala Val Val Phe Glu Glu Arg Asp Gly Asn
 65 70 75 80

Ala Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Leu Arg Gly Thr Lys Pro Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Arg Ala Leu Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His
 100 105 110

His Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Leu Ala Gly Ser Pro His
 115 120 125

Leu Glu Tyr Phe Val Arg Phe Glu Val Pro Ser Gly Asp Leu Ala Ala
 130 135 140

Leu Leu Ser Ser Val Arg Arg Val Ser Asp Asp Val Arg Ser Ala Arg

000202

145		150		155		160
Glu Asp Lys Val	Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys					
	165			170		175
Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His						
	180			185		190
Pro Gly Phe Ser Asp Gln Ala Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala						
	195			200		205
Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Lys Gln Gly Glu Pro Ile Pro His Val Glu						
	210			215		220
Tyr Thr Lys Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Ala Thr Leu						
	225			230		235
Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Arg Glu His Leu Glu Ala Phe						
	245			250		255
Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Cys Gly Tyr Arg Glu Asp Ser Ile Pro Gln						
	260			265		270
Leu Glu Asp Val Ser His Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu						
	275			280		285
Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu						
	290			295		300
Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser						
	305			310		315
Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His						
	325			330		335
Val Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile						
	340			345		350
Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser						
	355			360		365
Thr Val Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly						
	370			375		380
Glu Leu Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu						
	385			390		395
Leu His Ser Leu Ser Glu Glu Pro Glu Val Arg Ala Phe Asp Pro Asp						
	405			410		415
Thr Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Val Tyr						
	420			425		430
Phe Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Asn Tyr						

- 000203

435440445

Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr
450455460

Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro His Thr Ile Arg Arg Ser Leu
465470475480

Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu His Thr Leu Thr Gln Ala Leu Ser Ala
485490495

Ile Ser

<210> 15
<211> 145
<212> ADN
<213> virus asociado con adeno 2

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(145)
<223> secuencia terminal izquierda

<400> 15

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc60

cgagccccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg120

gccaaactcca tcactagggg ttcct145

<210> 16
<211> 145
<212> ADN
<213> virus asociado con adeno 2

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(145)
<223> secuencia terminal derecha

<400> 16

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg60

ccgccccggg aaagccccgg cgtcgggcga cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc120

gagcgcgag agagggagtg gccaa145

<210> 17
<211> 484
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(484)
<223> Secuencia promotora de Synapsin 1 (SYN1)

<400> 17

ctagactcta gctgcagagg gacctgcgta tgagtgaag tgggttttag gaccaggatg60

000204

aggcggggtg ggggtgccta cctgacgacc gaccccgacc cactggacaa gcaccaacc 120
cccattcccc aaattgcgca tcccctatca gagaggggga ggggaaacag gatgcggcga 180
ggcgcggtgcg cactgccagc ttcagcaccg cggacagtgc cttcgcccc gcctggcggc 240
gcgcgccacc gccgcctcag cactgaaggc gcgctgacgt cactcgccgg tccccgcaa 300
actccccctt cgggccacct tggtcgctc cgcgccgccc cggcccagc cggaccgcac 360
cacgcgaggg gcgagatagg ggggcacggg cgcgaccatc tgcgctgcgg cgccggcgac 420
tcagcgctgc ctcagtctgc ggtgggcagc ggaggagtcg tgtcgtgcct gagagcgag 480
tcga 484

<210> 18
<211> 748
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(748)
<223> GTP ciclohidrolasa 1 (GCH1), variante de transcripto 1

<400> 18
atggagaagg gccctgtgcg ggcaccggcg gagaagccgc ggggcccag gtgcagcaat 60
gggttccccg agcgggatcc gccgcggccc gggcccagca ggccggcgga gaagccccg 120
cggccccgagg ccaagagcgc gcagcccgcg gacggctgga agggcgagcg gccccgcagc 180
gaggaggata acgagctgaa cctccctaac ctggcagccg cctactcgtc catcctgagc 240
tcgctgggcg agaaccccc a gggcaaggg ctgctcaaga cgccctggag ggcggcctcg 300
gccatgcagt tcttcaccaa gggctaccag gagaccatct cagatgtcct aaacgatgct 360
atatttgatg aagatcatga tgagatggtg attgtgaagg acatagacat gttttccatg 420
tgtgagcatc acttggttcc atttgttga aaggccata ttggttatct tcctaacaag 480
caagtccttg gcctcagcaa acttgcgagg attgtagaaa tctatagtag aagactacaa 540
gttcaggagc gccttacaaa acaaattgct gtagcaatca cggaagcctt gcggcctgct 600
ggagtcgggg tagtggttga agcaacacac atgtgtatgg taatgcgagg tgtacagaaa 660
atgaacagca aaactgtgac cagcacaatg ttgggtgtgt tccgggagga tccaaagact 720
cggaagagt tctgactct cattagga 748

<210> 19
<211> 155
<212> ADN
<213> Virus de simio 40

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(155)
<223> secuencia de poli-adenilación temprana

<400> 19
ttcgagcaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 60
tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 120

tgtatcttat catgtctgga tcgtctagca tcgaa

155

<210> 20
 <211> 192
 <212> ADN
 <213> Virus de simio 40

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
 <222> (1)..(192)
 <223> secuencia de poli-adenilación tardía

<400> 20
 cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
 ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatggt tcaggttcag ggggaggtgt 180
 gggaggtttt tt 192

<210> 21
 <211> 1490
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
 <222> (1)..(1490)
 <223> Tirosina hidroxilasa (TH), variante de transcripto 2

<400> 21
 atgcccaccc ccgacgccac cagccacag gccaaagggt tccgcagggc cgtgtctgag 60
 ctggacgcca agcaggcaga ggccatcatg tccccgcggt tcattgggcg caggcagagc 120
 ctcatcgagg acgcccgcaa ggagcgggag gcggcgggtg cagcagcggc cgctgcagtc 180
 ccctcggagc ccggggaccc cctggagggt gtggcctttg aggagaagga ggggaaggcc 240
 gtgctaaacc tgctcttctc cccgagggcc accaagccct cggcgctgtc ccgagctgtg 300
 aagggtgttg agacgtttga agccaaaatc caccatctag agaccgggc cggccagagg 360
 ccgcgagctg ggggccccca cctggagtac ttcgtgcgcc tcgaggtgcg ccgaggggac 420
 ctggccgccc tgctcagtgg tgtgcgccag gtgtcagagg acgtgcgcag ccccgcgggg 480
 cccaaggtcc cctggttccc aagaaaagtg tcagagctgg acaagtgtca tcacctggtc 540
 accaagttcg accctgacct ggacttggac caccggggt tctcggacca ggtgtaccgc 600
 cagcgcagga agctgattgc tgagatcgcc ttccagtaca ggcacggcga cccgattccc 660
 cgtgtggagt acaccgccga ggagattgcc acctggaagg aggtctacac cacgctgaag 720
 ggcctctacg ccacgcacgc ctgcggggag cacctggagg cttttgcttt gctggagcgc 780
 ttacagcggct accgggaaga caatatcccc cagctggagg acgtctcccg ctctctgaag 840
 gagcgcacgg gcttccagct gcggcctgtg gccggcctgc tgtccgcccg ggacttctctg 900
 gccagcctgg ccttccgcgt gttccagtgc acccagtata tccgccacgc gtctctgccc 960
 atgcactccc ctgagccgga ctgctgccac gagctgctgg ggcacgtgcc catgctggcc 1020
 gaccgcacct tcgcgcagtt ctgcgaggac attggcctgg cgtccctggg ggcctcggat 1080

000206

```

gaggaaattg agaagctgtc cacgctgtac tggttcacgg tggagttcgg gctgtgtaag      1140
cagaacgggg aggtgaaggc ctatggtgcc gggctgctgt cctcctacgg ggagctcctg      1200
cactgcctgt ctgaggagcc tgagattcgg gccttcgacc ctgaggctgc ggccgtgcag      1260
ccctaccaag accagacgta ccagtcagtc tacttcgtgt ctgagagctt cagtgcgcgc      1320
aaggacaagc tcaggagcta tgccctacgc atccagcgcc ccttctccgt gaagttcgac      1380
ccgtacacgc tggccatcga cgtgctggac agccccagg ccgtgcggcg ctccctggag      1440
gggtgtccagg atgagctgga cacccttgcc catgcgctga gtgccattgg      1490

```

```

<210> 22
<211> 610
<212> ADN
<213> virus de hepatitis B Woodchuck

```

```

<220>
<221> CARACTERÍSTICAS_DIVERSAS
<222> (1)..(610)
<223> secuencia de elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis
B Woodchuck (WHV8)
<400> 22
cgtcgacaat caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta      60
tgttgctcct ttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc      120
ttcccgatag gctttcattt tctcctcctt gtataaaatcc tggttgctgt ctctttatga      180
ggagttgtgg cccgttgta ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac      240
cccactgggt tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc      300
cctccctatt gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc      360
tcggcgtgtg ggcaactgaca attccgtggg gttgtcgggg aagctgacgt cctttccatg      420
gctgctcgcc tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc      480
ggccctcaat ccagcggacc ttcttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggccctcttc      540
gcgtcttcgc cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct ccccgctgg      600
aattcgagct                                     610

```

000207

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 May 2011 (12.05.2011)



(10) International Publication Number
WO 2011/054976 A2

- (51) International Patent Classification:
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/864* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2010/067155
- (22) International Filing Date:
9 November 2010 (09.11.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/259,502 9 November 2009 (09.11.2009) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **GENE-
POD THERAPEUTICS AB** [SE/SE]; c/o Tomas Björk-
lund, Östra Vallgatan 59A, S-223 61 Lund (SE).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **BJÖRKLUND,**
Tomas [SE/SE]; Östra Vallgatan 59A, S-223 61 Lund
(SE). **BJÖRKLUND, Anders** [SE/SE]; Lilla Sigrids-
gatan 2, S-223 50 Lund (SE). **KIRIK, Deniz** [SE/SE];
Vipemöllevägen 103, S-224 66 Lund (SE).
- (74) Agent: **Høiberg A/S**; St. Kongensgade 59 A, DK-1264
Copenhagen K (DK).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
- without international search report and to be republished
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2011/054976 A2

000208

(54) Title: NOVEL VIRAL VECTOR CONSTRUCT FOR NEURON SPECIFIC OPTIMIZED CONTINUOUS DOPA SYN-
THESIS IN VIVO

(57) Abstract: The present invention relates to a one-vector expression system comprising a sequence encoding two polypeptides, such as tyrosine hydroxylase (TH) and GTP- cyclohydrolase 1 (GCH1). The two polypeptides can be should preferentially be expressed at a ratio between 3:1 and 15:1, such as between 3:1 and 7:1. The invention is useful in the treatment of catecholamine deficient disorders, such as dopamine deficient disorders including but not limited to Parkinson's Disease. Moreover, the present invention provides a method to deliver the vector construct in order to limit the increased production of the catecholamine to the cells in need thereof.

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
Høiberg A/S St. Kongensgade 59 A DK-1264 Copenhagen K DANEMARK

Date of mailing (day/month/year) 11 March 2011 (11.03.2011)
Applicant's or agent's file reference P2220PC00
International application No. PCT/EP2010/067155

IMPORTANT NOTIFICATION
International filing date (day/month/year) 09 November 2010 (09.11.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☐ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person		
☐ the name		
☐ the address		
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	SE	SE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
E-mail address	☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The person identified in Box 2 has been added to the records as applicant for all States except the USA.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office		
☒ the International Searching Authority		
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search		
☐ the International Preliminary Examining Authority		
☐ the designated Offices concerned		
☐ the elected Offices concerned		
☐ other:		

000200

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Rochaix Thomas e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
Facsimile No. +41 22 338 89 70	

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

Høiberg A/S
St. Kongensgade 59 A
DK-1264 Copenhagen K
DANEMARK

Date of mailing (day/month/year)
11 March 2011 (11.03.2011)

Applicant's or agent's file reference
P2220PC00

International application No.
PCT/EP2010/067155

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
09 November 2010 (09.11.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address BJÖRKLUND, Tomas BJÖRKLUND, Anders KIRIK, Deniz	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
Change of status: The persons identified in Box 1 are now recorded as inventors for all States and applicants for the USA only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Rochaix Thomas e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

27 FEB. 2012

HØIBERG

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Høiberg AS
St. Kongensgade 59 A
DK-1264 Copenhagen K
DANEMARK

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Applicant's or agent's file reference P2220PC00		Date of mailing (day/month/year) 21.02.2012	
IMPORTANT NOTIFICATION			
International application No. PCT/EP2010/067155	International filing date (day/month/year) 09.11.2010	Priority date (day/month/year) 09.11.2009	
Applicant Genepod Therapeutics Ab			

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Moreno, Ramon

Tel. +49 89 2399-2658

000211



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P/2220PC00	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEAA416	
International application No. PCT/EP2010/067155	International filing date (day/month/year) 09.11.2010	Priority date (day/month/year) 09.11.2009
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K48/00		
Applicant Genepod Therapeutics Ab		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 23 sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☒ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 09.09.2011	Date of completion of this report 21.02.2012	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Sommer, Birgit Telephone No. +49 89 2399-7099 000212 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/067155

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1-86 as originally filed

Sequence listings, SEQ ID NO

1-22 as originally filed

Claims, Numbers

1-84 filed with the letter of

07-09-2011

Drawings, Sheets

1/11-11/11 as originally filed

- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☒ the claims, Nos. 85-105
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☒ the claims, Nos. 21
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):

000213

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/067155

5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ restricted the claims.
 - ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee.
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid.
 - ☐ neither restricted the claims nor paid additional fees.
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:
- ☐ complied with.
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos. .

000214

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/067155

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-84</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-84</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-84</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

000215

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2010/067155

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, Item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ to this Authority as an amendment on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - * *If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

000216

Reference is made to the following documents:

D1 WO 97/18319 A1

The present application discloses an AAV2 vector expressing GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) and tyrosine hydroxylase (TH) under control of two human synapsin promoters and comprising an additional WPRE sequence. Said vector is useful for the treatment of Parkinson's disease.

Re Item IV:

- 1 The amended claims were restricted to subject-matter relating to the first group of inventions mentioned in the International Search Report (ISR). Therefore, the present set of claims comply with the requirements of unity as set forth in the PCT regulations (**Article 34(3), Rule 13 PCT**).

However, the description still relates to the three groups of inventions mentioned in the International Search Report (ISR) which are not so linked as to form a single general inventive concept. The technical problem underlying all groups of inventions seems to be the provision of further one-vector expression systems for the simultaneous coexpression of GCH1 and TH. The application solves this problem by providing vectors comprising GCH1 and TH encoding sequences either under control of two separate promoters, linked by an IRES sequence and controlled by a single promoter or linked by an IRES sequence and controlled by terminal repeats, respectively. It is not apparent which common technical feature among said three types of vectors defines an inventive contribution over the prior art. Consequently, any of the three types of vectors disclosed in the application represents a separate invention and the application as a whole is still non-unitary.

Re Item V:

- 2 Amended claims 1-84 are novel in view of the available prior art (**Article 33(2) PCT**).
- 3 D1, which is considered as most relevant prior art, discloses the simultaneous coexpression of TH and GTP cyclohydrolase for the treatment of Parkinson's disease and suggests a viral vector, e.g. an AAV vector, or a nonviral vector for said purpose, optional with two promoters or with an IRES sequence. As example, D1 discloses a retroviral vector comprising a GCH1-IRES-TH sequence under control of a retroviral LTR (D1, e.g. page 5, line 36 - page 6, line 28; page 8, line 8 - page 9, line 10; claims, example 5).

000217

The problem is formulated as the provision of further one-vector expression systems for the simultaneous coexpression of GCH1 and TH under control of two promoters.

The application solves this problem by disclosing an AAV2 vector comprising a first expression cassette comprising a GCH1 encoding sequence controlled by a human synapsin 1 promoter and a second expression sequence comprising a TH encoding sequence controlled by a human synapsin 1 promoter and an additional WPRE sequence.

The use of a bicistronic AAV vector for the coexpression of GCH1 and TH controlled by two separate promoters is already suggested in general in D1. D1 also discloses the order of the transgenes GCH1-TH used in the present application.

Nevertheless, the specific one-vector expression system claimed in the present application, i.e. an AAV vector comprising a first synapsin 1 promoter, a GCH-1 coding sequence, a second synapsin 1 promoter, a TH encoding sequence and a WPRE sequence exhibits unknown or unexpected effects in comparison to those vectors disclosed or suggested in the prior art. As outlined in applicant's letter of 09.09.2010, the WPRE element increases the expression of TH such that the claimed vector provides the continuous expression of both GCH-1 and TH in an optimal stoichiometry required for *in vivo* L-DOPA synthesis. Furthermore, the small, strong endogenous synapsin promoter enables cloning of the full length TH cDNA in the size limited AAV vector.

Therefore, an inventive step can be acknowledged for the subject-matter of claims 1-84 (**Article 33(3) PCT**).

- 4 Claims 59-68 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of **Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT**. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VIII:

- 5 Claims 1, 10, 19, 20, 69 and 82 lack clarity due to the general terms "*biologically active fragment or variant thereof*" without any functional or structural limitations. This is not suitable to clearly define the scope of the claims as the subject-matter is not sufficiently defined by technical features. A

protein or nucleic acid in general has to be regarded as a chemical compound which must be clearly characterized by reference to technical features but not merely by its function or by a result to be achieved. Moreover, any protein can exhibit non-specific biological activities, e.g. it can function as an antigen. Unless no specific definition of the intended activity for the protein is present in said claims, their subject-matter is not clear (**Article 6 PCT**)

- 6 Claim 9 attempts to define the subject-matter in terms of a result to be achieved. Such a formulation is not allowable because it appears possible to define the subject-matter in more concrete terms, viz. in terms of how the effect is to be achieved (**Article 6 PCT**).
- 7 The definition of the TH:GCH1 ratio in claims 27 and 28 is open to interpretation and thus unclear since no test system is mentioned in said claims which allows verifying said functional definition.
- 8 The subject-matter of claims 39-43, 49-53 and 59-63 is unclear since it is open to interpretation which diseases are associated with catecholamine dysfunction (**Article 6 PCT**). It is left to the skilled person to determine for which disease and how the claimed vector can be used.

000219

P2220PC00

1

Claims

1. A one-vector expression system comprising:

- a first and a second expression cassette,

5

wherein said first expression cassette comprises

a nucleotide sequence comprising

a first promoter sequence operably linked to

a first nucleotide sequence,

10

said first nucleotide sequence encoding a GTP-

cyclohydrolase 1 (GCH1; EC 3.5.4.16) polypeptide or a

biologically active fragment or variant thereof, and

wherein said second expression cassette comprises

15

a nucleotide sequence comprising

a second promoter sequence operably linked to

a second nucleotide sequence

said second nucleotide sequence encoding a tyrosine

hydroxylase (TH; EC 1.14.16.2) polypeptide or a biologically

20

active fragment or variant thereof, and

wherein the vector is an adeno associated vector (AAV) and

wherein said second nucleotide sequence is operably linked to a Woodchuck

25

hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE), and

wherein both said first and said second promoter are Synapsin1 promoters.

2. The vector of claim 1 wherein the GTP-cyclohydrolase 1 (GCH1; EC 3.5.4.16)

30

polypeptide or the biologically active fragment or variant thereof is at least 70%

identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID

NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, and wherein

said tyrosine hydroxylase (TH; EC 1.14.16.2) polypeptide or a biologically active

fragment or variant thereof is at least 70% identical to a polypeptide selected from the

P2220PC00

2

group consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO. 14.

- 5 3. The vector of claim 1, wherein said vector does not comprise a nucleotide sequence encoding an aromatic amino acid decarboxylase (AADC) polypeptide.
- 10 4. The vector of claim 1, wherein said vector has a packaging capacity from 1 to 40 kb, for example from 1 to 30 kb, such as from 1 to 20 kb, for example from 1 to 15 kb, such as from 1 to 10, for example from 1 to 8 kb, such as from 2 to 7 kb, for example from 3 to 6 kb, such as from 4 to 5 kb.
- 15 5. The vector of claim 1, wherein said vector has a packaging capacity from 4.5 to 4.8 kb.
- 20 6. The vector of claim 1, wherein the adeno associated vector (AAV) is an AAV2 vector.
- 25 7. The vector of claim 6 wherein the capsid of the AAV2 vector is packaged in an AAV capsid other than an AAV2 capsid.
- 30 8. The vector of claim 7 wherein the AAV2 vector is packaged in an AAV5 capsid.
9. The vector of any of claims 1 to 8, wherein said vector is functional in mammalian cells.
10. The vector of claim 1, wherein said biologically active fragment comprises at least 50 contiguous amino acids, wherein any amino acid specified in the selected sequence is altered to a different amino acid, provided that no more than 15 of the amino acid residues in the sequence are so altered.
11. The vector of claim 10, wherein said biologically active fragment is the catalytic domain of tyrosine hydroxylase.

000221

P2220PC00

3

12. The vector of claim 1, wherein said biologically active variant is a mutated tyrosine hydroxylase polypeptide, wherein one or more of the residues S19, S31, S40 or S404 have been altered to another amino acid residue.

5 13. The vector of any of claims 1 to 12, wherein said GTP-cyclohydrolase 1 (GCH1) polypeptide is at least 70% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 75% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, 10 SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 80% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 85% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 80% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, 15 SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 95% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 96% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 97% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 98% 20 identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably at least 99% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, more preferably 100% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6.

14. The vector of any of claims 1 to 13, wherein said tyrosine hydroxylase (TH) polypeptide is at least 70% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ 35

000222

P2220PC00

4

ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO. 14, more preferably at
 least 75% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID
 NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID
 NO. 12 SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO. 14, more preferably at least 80% identical
 5 to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO.
 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13
 and SEQ ID NO. 14, more preferably at least 85% identical to a polypeptide
 selected from the group consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9,
 SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO.
 10 14, more preferably at least 90% identical to a polypeptide selected from the group
 consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ
 ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO. 14, more preferably at
 least 95% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID
 NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID
 15 NO. 12 SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO. 14, more preferably at least 96% identical
 to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO.
 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13
 and SEQ ID NO. 14, more preferably at least 97% identical to a polypeptide
 selected from the group consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9,
 20 SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO.
 14, more preferably at least 98% identical to a polypeptide selected from the group
 consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ
 ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO. 14, more preferably at
 least 99% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID
 25 NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID
 NO. 12 SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO. 14, more preferably 100% identical to a
 polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8,
 SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13
 and SEQ ID NO. 14.

30

15. The vector of claim 1, wherein said first expression cassette or said second
 expression cassette further comprises a polyadenylation sequence.

16. The vector of claim 1, wherein said first expression cassette and said second
 35 expression cassette further comprises polyadenylation sequences.

000223

P2220PC00

5

17. The vector of any of claims 15 or 16, wherein said polyadenylation sequence is a SV40 polyadenylation sequence.
- 5 18. The vector of any of claims 15 to 17, wherein the 5' of said polyadenylation sequence is operably linked to the 3' of said first and/or said second nucleotide sequence.
- 10 19. The vector of claim 1, wherein said first nucleotide sequence encoding a GTP-cyclohydrolase 1 (GCH1) polypeptide or a biologically active fragment or variant thereof comprises the sequence of SEQ ID NO. 18.
- 15 20. The vector of claim 1, wherein said second nucleotide sequence encoding a tyrosine hydroxylase (TH) polypeptide or a biologically active fragment or variant thereof comprises the sequence of SEQ ID NO. 21.
- 20 21. The vector of claim 1, wherein said Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element comprises a sequence that has at least 85 percent sequence identity, preferably at least 90 to 95 percent sequence identity, more preferably at least 99 percent sequence identity to SEQ ID NO: 22.
- 25 22. The vector of claim 1, wherein said Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element comprises the sequence of SEQ ID NO. 22.
- 30 23. The vector of any of claims 1 to 22 wherein the expression cassettes of said vector comprises a 5' terminal repeat and a 3' terminal repeat.
24. The vector of claim 23, wherein the 5' and 3' terminal repeats are selected from Inverted Terminal Repeats [ITR] and Long Terminal Repeats [LTR].
25. The vector of claim 23, wherein the 5' and 3' terminal repeats are AAV Inverted Terminal Repeats [ITR].
- 35 26. The vector of claim 25, wherein said Inverted Terminal Repeats comprises the sequences of SEQ ID NO. 15 and SEQ ID NO. 16.

000224

P2220PC00

6

27. The vector of any of claims 1 to 26 wherein the TH:GCH1 ratio is at least 3:1, such as at least 4:1, for example at least 5:1, such as at least 6:1, for example at least 7:1, such as at least 10:1, for example 15:1, such as 20:1, for example 25:1, such as 30:1, for example 35:1, such as 40:1, for example 45:1, such as 50:1.

5

28. The vector of any of claims 1 to 27 wherein the TH:GCH1 ratio is 7:1.

29. The vector of any of claims 27 to 28 wherein the ratio is determined by measuring the activity of the expressed TH and GCH1 enzymes.

10

30. The vector of any of claims 27 to 28 wherein the ratio is determined by measuring the amount of Tetrahydrobiopterin (BH₄).

31. The vector of any of claims 27 to 28 wherein the ratio is determined by the amount of mRNA transcribed.

15

32. The vector of any of claims 27 to 28 wherein the ratio is determined by the amount of protein expressed.

20

33. The vector according to any of the preceding claims wherein said vector is the vector defined in figure 6.

34. The vector of any of claims 1 to 33 wherein said vector is a minimally integrating vector.

25

35. The vector of any of the claims 1 to 34, for use as a medicament.

36. An isolated host cell comprising the vector of any of claims 1 to 35.

30

37. The host cell of claim 36, wherein said cell is selected from the group consisting of eukaryotic cells, preferably mammalian cells, more preferably primate cells, more preferably human cells.

38. The host cell of claim 37, wherein the cell is selected from the group consisting of Chinese hamster ovary cells, CHO-K1, baby hamster kidney cells, mouse

35

000225

P2220PC00

7

fibroblast-3T3 cells, African green monkey cell lines, rat adrenal pheochromocytoma, AT3 cells, rat glial tumor cells, rat neuronal cells and rat hippocampal cells.

- 5 39. Use of the vector of any of claims 1 to 35, for the preparation of a medicament for the treatment of a disease associated with catecholamine dysfunction.
- 10 40. The use of claim 39, wherein the catecholamine dysfunction is catecholamine deficiency.
41. The use of claim 39 wherein the catecholamine dysfunction is catecholamine excess.
- 15 42. The use of claim 40, wherein the catecholamine deficiency is dopamine deficiency.
43. The use of claim 41, wherein the catecholamine excess is dopamine excess.
- 20 44. The use of any of claims 39 to 43 wherein said disease associated with catecholamine dysfunction is a disease, disorder or damage of the central and/or peripheral nervous system.
45. The use of claim 44, wherein said disease, disorder or damage of the central and/or peripheral nervous system is a neurodegenerative disorder.
- 25 46. The use of any of claims 39 to 45 wherein said disease associated with catecholamine dysfunction is a disease of the basal ganglia.
- 30 47. The use of any of claims 39 to 46, wherein said disease is selected from the group consisting of Parkinson's Disease (PD), DOPA responsive dystonia, ADHD, schizophrenia, depression, vascular parkinsonism, essential tremor, chronic stress, genetic dopamine receptor abnormalities, chronic opioid, cocaine, alcohol or marijuana use, adrenal insufficiency, hypertension, noradrenaline deficiency, post-traumatic stress disorder, pathological gambling disorder, dementia, Lewy body dementia.
- 35

000226

P2220PC00

8

48. The use of any of claims 39 to 46, wherein said neurodegenerative disorder is Parkinson's Disease (PD).
- 5 49. The vector of any of claims 1 to 35, for use in a method of treatment of a disease associated with catecholamine dysfunction.
50. The vector of claim 49, wherein the catecholamine dysfunction is catecholamine deficiency.
- 10 51. The vector of claim 49 wherein the catecholamine dysfunction is catecholamine excess.
52. The vector of claim 50, wherein the catecholamine deficiency is dopamine deficiency.
- 15 53. The vector of claim 51, wherein the catecholamine excess is dopamine excess.
54. The vector of any of claims 49 to 53 wherein said disease associated with catecholamine dysfunction is a disease, disorder or damage of the central and/or peripheral nervous system.
- 20 55. The vector of claim 54, wherein said disease, disorder or damage of the central and/or peripheral nervous system is a neurodegenerative disorder.
- 25 56. The vector of any of claims 49 to 55 wherein said disease associated with catecholamine dysfunction is a disease of the basal ganglia.
- 30 57. The vector of any of claims 49 to 55, wherein said disease is selected from the group consisting of Parkinson's Disease (PD), DOPA responsive dystonia, ADHD, schizophrenia, depression, vascular parkinsonism, essential tremor, chronic stress, genetic dopamine receptor abnormalities, chronic opioid, cocaine, alcohol or marijuana use, adrenal insufficiency, hypertension, noradrenaline deficiency, post-traumatic stress disorder, pathological gambling disorder, dementia, Lewy body dementia.

35

000227

P2220PC00

9

58. The vector of any of claims 49 to 56, wherein said neurodegenerative disorder is Parkinson's Disease (PD).

5 59. A method of treating a disease associated with catecholamine dysfunction, in a patient in need thereof, said method comprising administering to said individual the vector of any of claims 1 to 35.

10 60. The method of claim 59, wherein the catecholamine dysfunction is catecholamine deficiency.

61. The method of claim 59 wherein the catecholamine dysfunction is catecholamine excess.

15 62. The method of claim 60, wherein the catecholamine deficiency is dopamine deficiency.

63. The method of claim 61, wherein the catecholamine excess is dopamine excess.

20 64. The method of any of claims 59 to 63 wherein said disease associated with catecholamine dysfunction is a disease, disorder or damage of the central and/or peripheral nervous system.

25 65. The method of claim 64, wherein said disease, disorder or damage of the central and/or peripheral nervous system is a neurodegenerative disorder.

66. The method of any of claims 59 to 65 wherein said disease associated with catecholamine dysfunction is a disease of the basal ganglia.

30 67. The method of any of claims 59 to 66, wherein said disease is selected from the group consisting of Parkinson's Disease (PD), DOPA responsive dystonia, ADHD, schizophrenia, depression, vascular parkinsonism, essential tremor, chronic stress, genetic dopamine receptor abnormalities, chronic opioid, cocaine, alcohol or marijuana use, adrenal insufficiency, hypertension, noradrenaline deficiency, post-traumatic stress disorder, pathological gambling disorder, dementia, Lewy body
35 dementia.

000228

P2220PC00

10

68. The method of any of claims 59 to 66, wherein said neurodegenerative disorder is Parkinson's Disease (PD).

5 69. A pharmaceutical composition for use in a method of treatment of Parkinson's Disease, said composition comprising a one-vector expression system and a formulation for delivering said vector to the basal ganglia, wherein said one-vector expression system comprises:

10 - a first and a second expression cassette,

wherein said first expression cassette comprises

a nucleotide sequence comprising

a first promoter sequence operably linked to

15 a first nucleotide sequence,

said first nucleotide sequence encoding a GTP-cyclohydrolase 1 (GCH1; EC 3.5.4.16) polypeptide or a biologically active fragment or variant thereof, and

20 wherein said second expression cassette comprises

a nucleotide sequence comprising

a second promoter sequence operably linked to

a second nucleotide sequence

25 said second nucleotide sequence encoding a tyrosine hydroxylase (TH; EC 1.14.16.2) polypeptide or a biologically active fragment or variant thereof, and

wherein said second nucleotide sequence is operably linked to a Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE), and

30

wherein the vector is an adeno associated vector (AAV) and

wherein both said first and said second promoter are Synapsin1 promoters.

35

000329

P2220PC00

11

70. The composition of claim 69 wherein the GTP-cyclohydrolase 1 (GCH1) polypeptide or the biologically active fragment or variant thereof is at least 70% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 and SEQ ID NO. 6, and
5 wherein said tyrosine hydroxylase (TH) polypeptide or a biologically active fragment or variant thereof is at least 70% identical to a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 and SEQ ID NO. 14.
- 10 71. The pharmaceutical composition of any of claims 69 to 70, wherein the formulation comprises manitol, heparin or gadolinium based MRI contrast agents.
72. The pharmaceutical composition of any of claims 69 to 71 further comprising trophic factors or reversible proteasome inhibitors.
15
73. The pharmaceutical composition of any of claims 69 to 72, and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.
74. The pharmaceutical composition of any of claims 69 to 73, formulated for
20 administration by injection, sublingual tablet or spray, cutaneous administration or inhalation.
75. The pharmaceutical composition of claim 74, wherein the injection is intracranial, intracerebral, intravenous, intravitreal, intranasal, intramuscular, intraspinal,
25 intraperitoneal, subcutaneous, a bolus or a continuous administration.
76. The pharmaceutical composition according to any of claims 69 to 75, wherein the pH of the composition is between pH 4 and pH 10.
- 30 77. The pharmaceutical composition according to any of claims 69 to 76, wherein the dosage of the vector is between $1.5E+10$ and $2.2E+12$ vector genome copies per milliliter putaminal grey matter.

000280

P2220PC00

12

78. The pharmaceutical composition according to any of claims 69 to 76, wherein administration occurs at intervals of 30 minutes to 24 hours.

5 79. The pharmaceutical composition according to any of claims 69 to 76, wherein administration occurs at intervals of 1 to 6 hours.

80. The pharmaceutical composition according to any of claims 69 to 76, wherein the duration of the treatment is from 6 to 72 hours.

10 81. The pharmaceutical composition according to any of claims 69 to 76, wherein the duration of the treatment is life long.

15 82. A method for determining the expression ratio of GTP cyclohydroxylase1 polypeptide (SEQ ID NOs. 1, 2, 3, 4, 5 and 6) and tyrosine hydroxylase polypeptide (SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 and 14), respectively, or variants thereof, said polypeptide encoded by the vector as defined in any of claims 1 to 34, comprising measuring the:

- 20
- a. enzymatic activity of the polypeptides, or
 - b. amount of BH₄ produced, or
 - c. amount expressed of said polypeptides, or
 - d. level of transcribed mRNA corresponding to the polypeptides of GTP cyclohydroxylase1 polypeptide and tyrosine hydroxylase, respectively.

25 83. The method of claim 82, wherein the ratio is determined by a combination of the activity of said polypeptides and the amount present of said polypeptides.

84. A kit in parts, said kit comprising the pharmaceutical composition of any of claims 69 to 83, and instructions for administration.

30

000231

HØIBERG
European patent & trademark attorneys

European Patent Office
D-80298 München
Germany

Copenhagen
HØIBERG A/S
St. Kongensgade 59 A
DK-1264 Copenhagen K
Denmark

Aarhus
HØIBERG A/S
Aabogade 25 A
DK-8200 Aarhus N
Denmark

T: +45 3332 0337
F: +45 3332 0304

hoiberg@hoiberg.com
www.hoiberg.com

Vat No.: dk 21490601

7 September 2011

By fax: 0049 89 2399-4465

Filing a Demand – Response to Written Opinion
International Patent Application No. PCT/EP2010/067155
Applicant: Genepod Therapeutics AB
Our ref.: P2220PC00

Enclosed please find a demand for preliminary examination in respect of the above PCT application.

Please debit from our EPO deposit account no. 28030052 the handling fee and examination fee as specified in the fee calculation sheet.

Request

The applicant respectfully requests that the Examiner acknowledges the patentability of the claims amended as described below. In case the Examiner intends to issue a preliminary report on patentability not acknowledging patentability of the claimed invention, the applicant requests either

- a telephone interview (Rule 66.6 PCT) or
- a second Written Opinion.

Claims

Please find enclosed an amended set of claims which replaces the claims currently on file. The claims have been amended as follows:

Claim 1 has been amended by deleting features a, c and d. Claim 1, feature b has been maintained but reformatted with indentations to improve clarity. Additionally the grammar of the claim has been corrected to comply with the altered structure of the claim. Claim 1 has been further amended by defining the EC-numbers for the GTP-cyclohydrolase 1 (GCH1) and tyrosine hydroxylase (TH) polypeptides. This amendment has basis from page 83, lines 3 and 55 respectively.

000232

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

Claim 1 has also been amended to define that the second nucleic acid encoding TH is operably linked to a Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE), said amendment having basis in original claims 38, 39 and 40.

Finally claim 1 has been amended by defining that both the first and the second promoter are synapsin promoters, said amendment having basis in claim 26 of the application as originally filed.

Claims 1a, 1c, 1d, 2, 4, 5, 9-14, 23-25, 27-31, 38-39 and 88, 90-91 have been deleted, and any subsequent claims renumbered accordingly. Applicant reserves his rights to pursue the deleted claims at a later stage.

Original claim 3 corresponding to amended claim 2, has been amended by defining the EC-numbers of the GCH-1 and TH enzymes, having basis mutatis mutandis with the equivalent amendment of claim 1. Additionally said claim has been amended for enhanced clarity by deleting the phrases "...expressed by , wherein said polypeptide or biologically active fragment or variant thereof..." and the corresponding "... expressed by said second expression cassette...".

Original claim 89, corresponding to amended claim 70 has been amended in analogy with original claim 3 and thus has basis accordingly.

New dependent claim 21 has basis on page 19, lines 24-32, and also on page 20, line 23 to page 21, line 8, in particular on page 20, line 32-34 and page 21, lines 4-5 and 7. As new claim 21 defines a species of the subject matter of original claim 40, which has been searched, the subject matter of new claim 21 has also been searched.

Claim 87, corresponding to renumbered claim 69, has been amended in analogy with claim 1, and thus has basis accordingly.

It is submitted that the above amendments fulfil the requirements of Art. 34(2)(b) PCT.

Unity of invention

Examiner is of the opinion that the application as filed lack unity of invention. The applicant disagrees. However, in order to progress prosecution of the present application claims have been amended to excise the subject matter of original claims 1c, 1d, 2, 4, 87c, 87d, 88, 90 and 91 have been deleted.

Hence, the applicant submits that the subject matter of the amended set of claims exclusively relates to what Examiner refers to as "invention 1". Accordingly issues relating to what Examiner consider being invention 2 will not be further addressed herein.

Applicant reserves his rights to pursue the deleted claims at a later stage.

000233

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

Novelty

The applicant gratefully notes that Examiner has acknowledged novelty of original claims 3 and 89 (completely).

Amended claims 1 and 69 (corresponding to original claims 1 and 87 respectively) have been amended as indicated above and now include the subject matter of said original claims 3 and 89, respectively.

D1: WO 1997/18319 (Somatix / Leff & Mandel)

Examiner has rejected original claim 1 and 87, features a and b as lacking novelty over document D1. Claim 1 feature a has been cancelled, while feature b is maintained in the amended set of claims.

D1 discloses one or more retroviral- or adenoviral vector constructs for the expression of GCH1 and TH where the expression is controlled by LTR:s. AAV vectors are also listed as one out of several useful vector types. However AAV vectors are not mentioned among the preferred embodiments and the data presented is performed solely with retroviral vectors. A disclosure is novelty-destroying only if the teaching it contains is reproducible (T206/83). Thus, as the disclosure of AAV vectors in D1 is made entirely without data supporting use of a bicistronic AAV vector for expression of TH and GCH-1, D1 does not constitute an enabling disclosure of AAV vectors comprising a construct for the expression of GCH1 and TH.

Moreover, D1 does not disclose a one-vector AAV expression system wherein the expression is directed by synapsin promoters, and wherein the nucleotide encoding TH is operably linked to a Woodchuck Hepatitis Virus post transcriptional regulatory element (WPRE).

Accordingly, amended claims 1 and 69 are novel over D1.

D2: WO 2002/29065 (Oxford Biomedica / Kingsman et al)

Examiner in the ISR/WO point 2.2 indicates that original claim 1 and 87, lack novelty over document D2. Claim 1 features a, c and d have been cancelled, while feature b is maintained in the amended set of claims.

D2 discloses multicistronic lentiviral vectors comprising TH and GCH1 coding regions linked by IRES and controlled by a CMV promoter. D2 also suggests replacing the IRES with multiple internal promoters.

D2 does not disclose an AAV vector wherein the expression of the polypeptides GCH-1 and TH both individually are directed by synapsin promoters, and wherein the nucleotide encoding TH is operably linked to a Woodchuck Hepatitis Virus post transcriptional regulatory element (WPRE).

Accordingly D2 does not disclose the AAV vector of amended claims 1 and 69. Hence claims 1 and 69 are novel over D2.

Thus in summary the applicant submits that amended claims 1 and 69 fulfil the requirements of Art. 33(2) PCT.

000234

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

Inventive step

Examiner is of the opinion (ISR/WO points 2.1, first sentence and 2.3, last sentence) that D1 represents the most relevant piece of prior art for original claim 1, feature b which forms the basis for amended claim 1. Examiner furthermore considers the specific TH and GCH-1 sequences, the use of polyadenylation sequences and the use of terminal repeats to be obvious and that claim 1 thus lacks inventive step over D1 in view of "common general knowledge".

The applicant disagrees. As discussed herein above, D1 discloses one or more retroviral- or adenoviral vector constructs for the expression of GCH1 and TH. It is stated that any promoter known to those of skill in the art could be used to direct expression.

D1 also mentions AAV vectors as one out of several useful vector types, without providing any experimental evidence.

D1 does not address the problem of obtaining an optimal stoichiometric ratio between the TH and GCH-1 enzymes.

The strategy applied in D1 is to utilize either a two-vector design or single multi-cistronic vectors. The use of separate viral vectors each coding for one of the genes has a number of limitations. First, the product becomes in reality two drugs, each having its own production variation. Second, although at a global scale the expression pattern of the two genes might look similar, the number of copies of the two vectors in an individual cell varies dramatically, thus resulting in lost control over TH:GCH-1 stoichiometry resulting in varying levels of DOPA synthesised through the TH and GCH-1 enzymes. In addition, the effect might be aggravated with many cells receiving only one of the genes and which therefore display very limited DOPA synthesis, if any.

An alternative approach however is to merge the genes into a single vector as in the present invention, as the two genes then will always be expressed in the same cell, and there will just be one "product". This approach however has historically been hindered by gene sequences being too large to fit into certain vector constructs, such as a recombinant AAV vector. E.g. document D4 cited by the Examiner (page 57-58) states that a two-vector system is preferred for expressing two different genes in an AAV vector as even the use of small transcription elements may be too large to fit into an AAV vector.

The packaging capacity of AAV is optimized around the size of the wild-type AAV genome (4.7 kb). If the recombinant genome significantly exceeds this size, the production titers and in vivo efficacy are both severely impaired.

While the dopamine synthesis pathway is commonly considered to include two major enzymes, TH and AADC, the inventors have shown herein that gene therapy using a vector or vectors that express TH and GCH1, without expressing AADC, can provide symptomatic and therapeutic relief. This is of utmost importance, as the limited packaging capacity of an AAV vector prohibits or limits the inclusion of all three

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

genes, TH, GCH1, and AADC. Moreover, the combination of the two genes TH and GCH1 is not possible with traditional bi-cistronic vector genome construction. While it might be possible to truncate the TH enzyme at the N-terminal to reduce the size of the gene, this comes at the expense of removing the intrinsic safety mechanism of feedback inhibition and phosphorylation. Such truncated enzyme would continue to be efficient even at times when cytosolic DA concentrations would approach toxic levels. This is not the case with the full length TH cDNA as utilized in the invention of the present patent application, which utilizes a dual expression cassette approach where each expression cassette accommodates a synapsin promoter. With the synthetic fusion promoters traditionally used in gene therapy such as the synthetic chicken β -actin promoter containing a rabbit gamma-globulin intron, preceded with an enhancer element from the cytomegalovirus promoter (termed as the chicken β -actin, CBA, promoter) this vector construct design would not be possible due to size restrictions. The use of a small, strong endogenous promoter has allowed the novel and inventive plasmid design approach of the present invention.

It is a main object of the present invention to provide a vector construct that delivers optimized proportions of TH and GCH1.

The Examiner appears to have rejected the pending claims on the basis that the skilled person would have had a reasonable expectation of success in applying the disclosure of D1 taken alone or in combination with any of the disclosures in documents D3 to D7.

D1 is not an enabling disclosure

As discussed above, document D1 is aimed at producing L-DOPA in vivo by producing TH and GCH-1 without addition of tetrahydrobiopterin (BH₄). D1 does so by coexpressing TH and GCH-1 using separate viral vectors, or vectors where TH and GCH-1 are present on the same vector. D1 presents data (example 1) where the cDNA for the relevant enzymes, separated by an IRES, is cloned into MFG- δ which is a retroviral vector. No experimental data is provided demonstrating cloning of the construct into an Adeno-Associated Vector (AAV).

In analogy with the case discussed in T385/07, D1 - cited against the present application - does not provide any experimental evidence that TH and GCH-1 can be co-expressed in an AAV vector to render an optimised intracellular stoichiometry and concentration of the two enzymes thus expressed.

The applicant below presents a problem and solution approach to determine the issue of inventiveness of the present invention in the light of D1,

Difference

The differences between amended claim 1 of the present application and the teachings of D1 are:

(i) The use of one AAV vector for expressing both GCH-1 and TH, (ii) the use of synapsin promoters operably linked to TH and GCH-1 respectively, (iii) a WPRE element operably linked to the nucleotide encoding TH (see e.g. fig. 2).

000236

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

Technical effect

(i) The technical effect conferred by the use of a one AAV vector system is its suitability for neuron-specific gene therapy, the continuous expression of both GCH-1 and TH in the transfected cells, and the thus resulting optimal stoichiometry between the two enzymes required for in vivo L-DOPA synthesis.

(ii) The technical effect conferred by the small, strong endogenous synapsin promoter is that the construct of the present invention can be accommodated and is functional in the size limited AAV vector.

The technical effect conferred by (iii) the presence of the WPRE element operably linked to the nucleotide encoding TH, is that the expression ratio between the two polynucleotides of the invention, is shifted such that the expression of TH is increased in relation to the expression of GCH-1 resulting in an optimal stoichiometry between the enzymes required for in vivo L-DOPA synthesis.

Objective Technical Problem

The objective technical problem to be solved can thus be taken as the provision of a vector capable of rendering optimal in vivo production of L-DOPA with the aim of treating a disease associated with catecholamine dysfunction in a subject.

Solution

The solution to the posed problem is to provide the vector of claim 1 to the subject. This is supported and clearly shown in examples 1 and 2 and corresponding figures 3-5 together with the figure legends on pages 13-14.

Obviousness

The solution is by no means obvious to the person skilled in the art presented with the teachings of D1, as D1 fails to present any data based on adeno associated viral vectors, and additionally is totally silent regarding the optimal stoichiometry of GCH-1 and TH - the enzymes required for production of L-DOPA.

Additionally, document D1 was published in 1997, i.e. 12 years prior to the filing date of the present application. D1 acknowledges the problem of providing continuous flow of L-DOPA to a patient in need thereof. However, the scientific community has not been able to achieve this long felt need before the advent of the invention of the present application.

Hence the solution to the problem is not obvious to the person skilled in the art presented with document D1. Accordingly the present invention as currently claimed is novel and inventive over D1.

Even if the skilled person were to apply the teachings of D1 to one or more of documents D2 to D4 as indicated by the Examiner, he would not arrive at the solution of the present invention as none of documents D2 through D4 neither discloses the arrangement of the individual elements of the present vector construct, nor the purpose of obtaining an optimal stoichiometry of TH to GCH-1 enzyme for the efficient in vivo production of L-DOPA with the aim of treating diseases associated with catecholamine dysfunction.

000237

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

D2: WO 2002/29065 (Oxford Biomedica / Kingsman et al)

As mentioned herein above, this document discloses multicistronic lentiviral vectors comprising TH and GCH1 coding regions linked by IRES and controlled by a CMV promoter. D2 also suggests replacing the IRES with internal promoters. D2 discloses (e.g. claim 39) a bicistronic cassette comprising a nucleotide sequence which encodes tyrosine hydroxylase and a nucleotide sequence which encodes GTP-cyclohydrolase I operably linked by one or more IRES(s). The construct of D2 using an IRES would not generate the optimal stoichiometry of the expressed enzymes GCH-1 and TH.

Amended claim 1 does not define using an IRES.

Additionally, D2 does not disclose or even hints that the construct could be inserted in an AAV vector and how to structure the elements of the expression cassettes.

D2 does not mention using synapsin promoters or operably linking the TH coding region to a Woodchuck Hepatitis Virus post transcriptional regulatory element (WPRE).

Finally, D2 is totally silent regarding how to obtain the optimal stoichiometry of the enzymes GCH-1 and TH.

Accordingly the skilled person presented with the teachings of D1, and setting out to arrive at the invention of present claim 1, would find no guidance in document D2.

Accordingly claim 1 as currently amended is inventive over D1 in combination with D2.

D3: Kügler et al (2003) Virology 311(1):89-95

This document presents a study of the effect of hSYN and mCMV promoters in what the authors denote as a bicistronic AAV-2 vector. The authors describe independent expression of a functional transgene (Bcl-X) and the fluorescent reporter EGFP from a construct controlled by cellular promoters. D3 furthermore discloses synapsin 1 promoters as useful since these would be sufficiently small to fit into a bicistronic AAV vector. The construct of D3 also comprises a WPRE post-transcriptional regulatory element, an SV40 polyadenylation site as well as terminal repeats. The construct of D3 additionally comprises an intron between the first functional transgene and the SV40.

The Examiner is of the opinion that it would be obvious for the skilled person presented with D1, to combine the teachings of this document with those of D3, and thus to arrive at the present invention.

The applicant once again wish to emphasize that the construct of the present invention has the advantage of being capable of directing expression to yield the optimal ratio between the TH and GCH-1 enzymes.

000238

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

D3 comprises an intron, which is not the case with the present invention. Inclusion of an intron may result in altered expression and thus cause unpredictable and unwanted effects on the stoichiometry of enzymes thus expressed.

D3 mentions that the reporter gene may be operably linked to a WPRE element to increase fluorescent labelling, however the WPRE is mentioned as optional and no connection is made between inclusion of WPRE and the possibility of rendering a specific stoichiometry between two polypeptides expressed by the construct of D3.

Furthermore, D3 on page 94, right hand column, first paragraph describes that "...small promoters and polyadenylation sites allowing expression of two transgenes under control of identical transcriptional control elements should be favorable simply because both transgenes will be expressed independently but with identical kinetics." (our emphasis). As discussed herein above, GCH1 and TH are not expressed with identical kinetics using the construct of the present invention partly due to the arrangement of the encoding genes, and the operably linked WPRE element. Accordingly D3 teaches away from a construct capable of yielding an optimal and non-identical stoichiometry between the expressed enzymes.

In summary, the skilled person presented with the teachings of D1 in combination with D3, would not arrive at the invention of present claim 1, as D3 does not teach continuous in vivo production of L-DOPA by applying an optimal ratio between the enzymes TH and GCH-1 essential for L-DOPA production.

Accordingly the present invention as currently claimed is inventive over D1 in combination with D3.

D4: Shevtsova et al (2005) Exp Physiol 90(1):53-59.

The Examiner is of the opinion that D4 is equally relevant for assessing inventive step of the present invention as document D3, when taken in combination with document D1.

Document D4 is from the same research group, and is partly based on the results of D3. In relation to D3, document D4 further elaborates on the efficacy of hSYN, mCMV and other promoters in AAV vectors, including the use of AAV5 capsids for enhancing spread in brain tissue. However, D4 reports (p. 55, left hand column) that expression levels were substantially reduced using AAV5 capsids. The authors of D4 in fact states that "...AAV vectors packaged into the serotype 5 capsid are relatively inefficient in transducing neurones [...] but are excellently suited for astrocyte-specific transgene expression." Hence D4 teaches away from using cross-packaged AAV vectors for transducing neurons.

D4 mentions use of WPRE control elements (figure 1), however as in D3, no connection is made between the inclusion of WPRE and the rendered stoichiometry between two genes thus expressed.

Finally document D4 concludes (page 57-58) that "As co-expression of several interacting proteins may be desirable [...] AAV genome size may constitute restrictions even if small transcriptional units are used. Therefore, we demonstrate that this problem may be overcome by the use of a double transduction ap-

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

proach: after intravitreal injection of two different AAV-2 vectors, one expressing EGFP, the other DsRed [...] the majority of RGCs was found to express both transgenes".

Accordingly D4 teaches away from using a bicistronic AAV one-vector system for expressing multiple functional transgenes. Again, D4 does not disclose simultaneous expression of two polypeptides with therapeutic potential such as GCH1 and TH.

In summary, the present invention as currently claimed is inventive over D1 in combination with D4.

D5: Björklund et al (2009) J Neurochem. 111(2): 355-367

Examiner is of the opinion that the original method claims 103 and 104 amount to routine experimental procedure as evidenced by document D5. The applicant disagrees. Original claims 103-104 corresponding to claims 82-83 in the amended set of claims, refer specifically to the ratio between the polypeptides expressed from the vector of claim 1. The vector of claim 1 is novel and inventive as evidenced herein above. Accordingly, the method claims 82-83 are novel and inventive by virtue of the vector claims to which they refer (See GL C-IV 11.13).

D6: US 2003/059941 (Prockop et al)

This document discloses transduction of cells with *retroviral* vector constructs comprising TH and GCH-1 linked by an IRES and flanked by 5' and 3' LTR:s. The vector includes an SV40 promoter but it is mentioned that any promoter could be used, but no specific disclosure is made of a hSYN promoter. D6 also discloses methods of treating PD by administering the vector to a patient.

Examiner has cited this document as relevant for novelty of what Examiner refers to as "invention 2". As the subject matter classified as "invention 2" has been excised from the amended set of claims, D6 is no longer relevant as prior art document and will not be further discussed herein.

D7: WO 96/05319 (Arch Development Corporation)

This document discloses bicistronic vectors with either an IRES site or the promoter in the 5' retroviral LTR, which controls expression of both an upstream and a downstream cistron.

Examiner has cited this document as relevant for novelty of what Examiner refers to as "invention 2". As the subject matter classified as "invention 2" has been excised from the amended set of claims, D7 is no longer relevant as prior art document and will not be further discussed herein.

Thus in summary, claim 1 and analogous claim 68 both fulfil the requirements of Art. 33(3)PCT. Claims dependent thereon are also inventive by virtue of the Independent claims upon which they refer (GL C-IV 11.13).

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

Patentability

Examiner states that the subject matter of original claims 77-86, corresponding to renumbered claims 58-67, falls under the provisions of Rule 39.1(iv) and 67.1(iv)PCT. Applicant however maintains these claims as the claim format is allowable in the USA which is designated in this PCT application.

Clarity

Examiner has in item 5 of the ISR/WO raised a clarity objection relating to the use of the term "biologically active fragment thereof" in pending claims 1-4, 18-20, 36, 37, 87-90 and 103.

Claims 1a, 1c, 1d, 2 and 4 and 88-99 have been cancelled.

Independent claims 1 and 87 (renumbered claim 69) have been amended to define that the fragment or variant is a fragment or variant the specified EC-numbers: EC 3.5.4.16 (GCH1) and EC 1.14.16.2 (TH). Additionally both independent claims define that the fragment or variant is biologically active. As the activity of EC 3.5.4.16 (GCH1) and EC 1.14.16.2 (TH) are well known, it is submitted that the person skilled in the art would have no difficulty in understanding the meaning of the phrase "biologically active fragment or variant thereof". Accordingly, the applicant submits that said claims now fulfil the requirements of Art. 6 PCT.

Accordingly, dependent (original) claims 18-20, 36, 37 and 103 corresponding to claims 10-12, 19, 20 and 85 in the amended set of claims respectively, are also clear and concise by virtue of the independent claims to which they refer.

Examiner has raised a further clarity issue relating to the definition of the TH:GCH ratio of original claims 45-50 corresponding to amended claims 28-33. Examiner is of the opinion that this ratio is inherent from the structure of the vector used and is thus a functional definition which is less preferred. The applicant disagrees. Functional definitions are allowed provided that tests are provided for verifying the functional definition. Such tests are defined in e.g. original claims 47-50 and thus the clarity rejection should be withdrawn.

Finally Examiner objects to original claim 105 as defining presentation of information and that the combination of a container and a pharmaceutical composition cannot be distinguished from an already known kit with the same content.

The applicant disagrees. The kit of original claim 105, corresponding to amended claim 84 comprises the defined pharmaceutical composition of any of claims 69-81, said composition comprising the one-vector expression system which is novel over cited prior art (see above). As the kit comprises a novel and inventive pharmaceutical composition, the kit is also novel and inventive by definition. Accordingly applicant respectfully requests that the clarity rejection raised should be withdrawn.

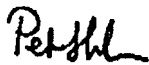
000241

H Ø I B E R G
European patent & trademark attorneys

Conclusion

By the above explanations, the claims of the present patent application are believed to be in the order of acceptance and we look forward to receiving an International Preliminary Report on Patentability reflecting this opinion. Accordingly, the Examiner is respectfully asked to take the above observations into consideration when examining this international patent application in more detail in PCT Chapter II. If any matters are considered to remain outstanding, we are looking forward to receiving a second Written Opinion from the International Preliminary Examination Authority.

Yours sincerely
HØIBERG A/S



Peter Holm
Patent Attorney
MSc, PhD

Enclosed documents:
Amended claims
Demand Incl. fee calculation sheet

000242

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de expresión de un vector caracterizado porque comprende:

- un primer y un segundo casete de expresión,
en donde el primer casete de expresión comprende
una secuencia de nucleótidos que comprende
una primera secuencia promotora operablemente ligada a
una primera secuencia de nucleótidos,
la primera secuencia de nucleótidos que codifica un
polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1; EC 3.5.4.16) o un
fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y
en donde el segundo casete de expresión comprende
una secuencia de nucleótidos que comprende
una segunda secuencia promotora operablemente ligada a
una segunda secuencia de nucleótidos
la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un
polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH; EC 1.14.16.2) o un
fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y
en donde el vector es un vector asociado a adeno (AAV) y
en donde la segunda secuencia de nucleótidos está
operablemente ligada a un elemento regulador post-transcripcional
del virus de hepatitis de la marmota (WPRE), y
en donde tanto el primero como el segundo promotor son
promotores de Sinapsina 1.

2. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido de GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1; EC 3.5.4.16) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido

000243

seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y en donde el polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH; EC 1.14.16.2) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

3. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el vector no comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido aromático de aminoácido descarboxilasa (AADC).

4. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el vector tiene una capacidad de empaquetado desde 1 hasta 40 kb, por ejemplo desde 1 hasta 30 kb, tal como desde 1 hasta 20 kb, por ejemplo desde 1 hasta 15 kb, tal como desde 1 hasta 10, por ejemplo desde 1 hasta 8 kb, tal como desde 2 hasta 7 kb, por ejemplo desde 3 hasta 6 kb, tal como desde 4 hasta 5 kb.

5. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el vector tiene una capacidad de empaquetado desde 4.5 hasta 4.8 kb.

6. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el vector asociado a adeno (AAV) es un vector AAV2.

7. El vector de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la cápsida del vector AAV2 se empaqueta en una cápsida AAV diferente de una cápsida AAV2.

8. El vector de conformidad con la reivindicación 7,

000244

caracterizado porque el vector AAV2 se empaqueta en una cápsida AAV5.

9. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 8, caracterizado porque el vector es funcional en células mamíferas.

10. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el fragmento biológicamente activo comprende al menos 50 aminoácidos contiguos, en donde cualquier aminoácido especificado en la secuencia seleccionada se altera a un aminoácido diferente, con la condición de que no más de 15 de los residuos de aminoácidos en la secuencia se alteran.

11. El vector de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el fragmento biológicamente activo es el dominio catalítico de tirosina hidroxilasa.

12. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la variante biológicamente activa es un polipéptido de tirosina hidroxilasa mutado, en donde uno o más de los residuos S19, S31, S40 o S404 se han alterado a otro residuo de aminoácido.

13. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 12, caracterizado porque el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 75% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 80% idéntico a un polipéptido

000045

seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 85% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 90% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 95% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 96% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 97% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 98% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente al menos 99% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, más preferiblemente 100% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6.

14. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 13, caracterizado porque el polipéptido

000246

de tirosina hidroxilasa (TH) es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 75% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 80% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 85% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 90% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 95% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 96% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 97% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más

000047

preferiblemente al menos 98% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente al menos 99% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14, más preferiblemente 100% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12 SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

15. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el primer casete de expresión o el segundo casete de expresión comprende además una secuencia de poliadenilación.

16. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el primer casete de expresión y el segundo casete de expresión comprende además secuencias de poliadenilación.

20 17. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, caracterizado porque la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación SV40.

18. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 hasta 17, caracterizado porque la 5' de la secuencia de poliadenilación está operablemente ligada a la 3' de la primera y/o la segunda secuencia de nucleótidos.

19. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la primera secuencia de nucleótidos que

000248

codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo comprende la secuencia de SEQ ID NO. 18.

20. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo comprende la secuencia de SEQ ID NO. 21.

21. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 hasta 95 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia para SEQ ID NO: 22.

22. El vector de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota comprende la secuencia de SEQ ID NO. 22.

23. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 22, caracterizado porque los casetes de expresión del vector comprenden una repetición de terminal 5' y una repetición de terminal 3'.

24. El vector de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque las repeticiones de terminal 5' y 3' se seleccionan de Repeticiones de Terminal Invertida [ITR] y Repeticiones de Terminal Larga [LTR].

25. El vector de conformidad con la reivindicación 23,

000249

caracterizado porque las repeticiones de terminal 5' y 3' son Repeticiones de Terminal Invertida AAV [ITR].

26. El vector de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque las Repeticiones de Terminal Invertida
5 comprende las secuencias de SEQ ID NO. 15 y SEQ ID NO. 16.

27. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 26, caracterizado porque la relación TH:GCH1 es al menos 3:1, tal como al menos 4:1, por ejemplo al menos 5:1, tal como al menos 6:1, por ejemplo al menos 7:1, tal
10 como al menos 10:1, por ejemplo 15:1, tal como 20:1, por ejemplo 25:1, tal como 30:1, por ejemplo 35:1, tal como 40:1, por ejemplo 45:1, tal como 50:1.

28. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 27 caracterizado porque la relación
15 TH:GCH1 es 7:1.

29. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 hasta 28 caracterizado porque la relación se determina al medir la actividad de las enzimas TH y GCH1 expresadas.

20 30. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 hasta 28 caracterizado porque la relación se determina al medir la cantidad de Tetrahidrobiopterina (BH₄).

31. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 hasta 28 caracterizado porque la relación se determina por la cantidad de mRNA transcrito.

32. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 hasta 28 caracterizado porque la relación se determina por la cantidad de proteína expresada.

000750.

33. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque el vector es el vector definido en la figura 6.

34. El vector de conformidad con cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 hasta 33 caracterizado porque el vector es un vector mínimamente integrado.

35. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 34, caracterizado porque es para uso como un medicamento.

10 36. La célula hospedera aislada caracterizada porque comprende el vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 35.

37. La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque la célula es seleccionada del grupo que
15 consiste de células eucarióticas, preferiblemente células mamíferas, más preferiblemente células de primate, más preferiblemente células humanas.

38. La célula hospedera de conformidad con la reivindicación 37, caracterizada porque la célula es seleccionada del grupo que
20 consiste de células de ovario de hámster Chino, CHO-K1, células de riñón de hámster bebé, células de fibroblasto-3T3 de ratón, líneas celulares de mono verde Africano, feocromocitoma adrenal de rata, células AT3, células de tumor glial de rata, células neuronales de rata y células hipocampo de rata.

39. El uso del vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 35, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con disfunción de catecolamina.

000251

40. El uso de conformidad con la reivindicación 39, en donde la disfunción de catecolamina es deficiencia de catecolamina.

41. El uso de conformidad con la reivindicación 39 en donde la disfunción de catecolamina es exceso de catecolamina.

5 42. El uso de conformidad con la reivindicación 40, en donde la deficiencia de catecolamina es deficiencia de dopamina.

43. El uso de conformidad con la reivindicación 41, en donde el exceso de catecolamina es exceso de dopamina.

10 44. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 39 hasta 43 en donde la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso periférico y/o central.

15 45. El uso de conformidad con la reivindicación 44, en donde la enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso periférico y/o central es un trastorno neurodegenerativo.

46. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 39 hasta 45 en donde la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad de los ganglios basales.

20 47. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 39 hasta 46, en donde la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de mal de Parkinson (PD), distonía con respuesta a DOPA, ADHD, esquizofrenia, depresión, parquinsonismo vascular, temblor esencial, tensión crónica, anormalidades del receptor de dopamina genética, uso crónico de opioides, cocaína, de alcohol o marihuana, insuficiencia adrenal, hipertensión, deficiencia de noradrenalina, trastorno de tensión post-traumático, trastorno patológico del juego, demencia,

000952

demencia del cuerpo de Lewy.

48. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 39 hasta 46, en donde el trastorno neurodegenerativo es mal de Parkinson (PD).

5 49. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 35, caracterizado porque es para uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con disfunción de catecolamina.

10 50. El vector de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque la disfunción de catecolamina es deficiencia de catecolamina.

51. El vector de conformidad con la reivindicación 49 caracterizado porque la disfunción de catecolamina es exceso de catecolamina.

15 52. El vector de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque la deficiencia de catecolamina es deficiencia de dopamina.

20 53. El vector de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque el exceso de catecolamina es exceso de dopamina.

54. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49 hasta 53 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso periférico y/o central.

55. El vector de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque la enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso periférico y/o central es un trastorno neurodegenerativo.

000253

56. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49 hasta 55 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad de los ganglios basales.

5 57. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49 hasta 55, caracterizado porque la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de mal de Parkinson (PD), distonía con respuesta a DOPA, ADHD, esquizofrenia, depresión, parquinsonismo vascular, temblor esencial, tensión crónica,
10 anormalidades del receptor de dopamina genética, uso crónico de opioides, cocaína, alcohol o marihuana, insuficiencia adrenal, hipertensión, deficiencia de noradrenalina, trastorno de tensión post-traumático, trastorno patológico del juego, demencia, demencia del cuerpo de Lewy.

15 58. El vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49 hasta 56, caracterizado porque el trastorno neurodegenerativo es mal de Parkinson (PD).

59. El método para tratar una enfermedad asociada con disfunción de catecolamina, en un paciente que necesita del
20 mismo, el método caracterizado porque comprende administrar al individuo el vector de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 35.

60. El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque la disfunción de catecolamina es deficiencia de catecolamina.

61. El método de conformidad con la reivindicación 59 caracterizado porque la disfunción de catecolamina es exceso de catecolamina.

000254

62. El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque la deficiencia de catecolamina es deficiencia de dopamina.

63. El método de conformidad con la reivindicación 61,
5 caracterizado porque el exceso de catecolamina es exceso de dopamina.

64. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 59 hasta 63 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad,
10 trastorno o daño del sistema nervioso periférico y/o central.

65. El método de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado porque la enfermedad, trastorno o daño del sistema nervioso periférico y/o central es un trastorno neurodegenerativo.

15 66. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 59 hasta 65 caracterizado porque la enfermedad asociada con disfunción de catecolamina es una enfermedad de los ganglios basales.

20 67. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 59 hasta 66, caracterizado porque la enfermedad es seleccionada del grupo que consiste de mal de Parkinson (PD), distonía con respuesta a DOPA, ADHD, esquizofrenia, depresión, parquinsonismo vascular, temblor esencial, tensión crónica, anormalidades del receptor de dopamina genética, uso crónico de opioides, cocaína, alcohol o marihuana, insuficiencia adrenal, hipertensión, deficiencia de noradrenalina, trastorno de tensión post-traumático, trastorno patológico del juego, demencia, demencia del cuerpo de Lewy.

000255

68. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 59 hasta 66, caracterizado porque el trastorno neurodegenerativo es mal de Parkinson (PD).

69. Una composición farmacéutica caracterizada porque es para uso en un método de tratamiento de mal de Parkinson, la composición que comprende un sistema de expresión de un vector y una formulación para suministrar el vector a los ganglios basales, en donde el sistema de expresión de un vector comprende:

- un primer y un segundo casete de expresión,

en donde el primer casete de expresión comprende

una secuencia de nucleótidos que comprende

una primera secuencia promotora operablemente ligada a

una primera secuencia de nucleótidos,

la primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1; EC 3.5.4.16) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y

en donde el segundo casete de expresión comprende

una secuencia de nucleótidos que comprende

una segunda secuencia promotora operablemente ligada a

una segunda secuencia de nucleótidos

la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH; EC 1.14.16.2) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo, y

en donde la segunda secuencia de nucleótidos está operablemente ligada a un elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de la marmota (WPRE), y

en donde el vector es un vector asociado a adeno (AAV) y

en donde tanto el primero como el segundo promotor son

000256

promotores Sinapsina 1.

70. La composición de conformidad con la reivindicación 69 caracterizada porque el polipéptido GTP-ciclohidrolasa 1 (GCH1) o el fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6, y

en donde el polipéptido de tirosina hidroxilasa (TH) o un fragmento biológicamente activo o variante del mismo es al menos 70% idéntico a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9, SEQ ID NO. 10, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 12, SEQ ID NO. 13 y SEQ ID NO. 14.

71. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 70, caracterizada porque la formulación comprende agentes de contraste MRI basados en manitol, heparina o gadolinio.

72. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 71 caracterizada porque comprende además factores tróficos o inhibidores de proteasoma reversibles.

73. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 72, y caracterizado porque tiene un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

74. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 73, caracterizada porque está formulada para administración por inyección, rocío o comprimido sublingual, administración cutánea o inhalación.

75. La composición farmacéutica de conformidad con la

000257

reivindicación 74, caracterizada porque la inyección es intracraneal, intracerebral, intravenosa, intravítrea, intranasal, intramuscular, intraespinal, intraperitoneal, subcutánea, un bolo o una administración continua.

5 76. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 75, caracterizada porque el pH de la composición está entre pH 4 y pH 10.

10 77. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 76, caracterizada porque la dosificación del vector está entre $1.5E+10$ y $2.2E+12$ copias del genoma de vector por mililitro de materia gris putaminal.

15 78. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 76, caracterizada porque la administración ocurre en intervalo de 30 minutos hasta 24 horas.

 79. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 76, caracterizada porque la administración ocurre en intervalos de 1 hasta 6 horas.

20 80. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 76, caracterizada porque la duración del tratamiento es desde 6 hasta 72 horas.

 81. La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 76, caracterizada porque la duración del tratamiento es de larga vida.

 82. Un método para determinar la relación de expresión de polipéptido GTP ciclohdroxilasa1 (SEQ ID NOs. 1, 2, 3, 4, 5 y 6) y polipéptido de tirosina hidroxilasa (SEQ ID NOs. 7, 8, 9, 10,

000258

11, 12, 13 y 14), respectivamente, o variantes del mismo, el polipéptido codificado por el vector como se define de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 34, caracterizado porque comprende medir la:

- 5 a. actividad enzimática de los polipéptidos, o
 b. cantidad de BH_4 producido, o
 c. cantidad expresada de los polipéptidos, o
 d. nivel de mRNA transcrito correspondiente a los polipéptidos del polipéptido GTP ciclohidroxilasa1 y tirosina
10 hidroxilasa, respectivamente.

83. El método de conformidad con la reivindicación 82, caracterizado porque la relación se determina por una combinación de la actividad de los polipéptidos y la cantidad presente de los polipéptidos.

- 15 84. El kit en partes, el kit caracterizado porque comprende la composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 69 hasta 83, e instrucciones para administración.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0043374
		Bogotá D.C., Mayo 03 de 2012 - 14:30:53

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643 RE

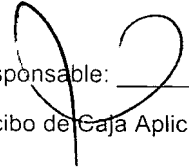
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	43216	03/05/2012		205.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43250	03/05/2012		3.600.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43255	03/05/2012		1.274.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43256	03/05/2012		750.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43258	03/05/2012		555.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43261	03/05/2012		100.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43268	03/05/2012		87.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43327	03/05/2012		160.000.00
RECIBO DE CA	999999999	43328	03/05/2012		185.500.00
RECIBO DE CA	999999999	43329	03/05/2012		100.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
			\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIE*

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-076254- -00000-0000

Fecha: 2012-05-09 15:30:30
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 261

000'bu

P- 3323

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0045491

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C., Mayo 09 de 2012 - 09:16:28

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	39186	23/04/2012		30.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44583	07/05/2012		2.184.000.00
RECIBO DE CA	999999999	44588	07/05/2012		6.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
74 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	2.220.000.00
			\$2.220.000.00

SON: **DOS MILLONES DOSCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

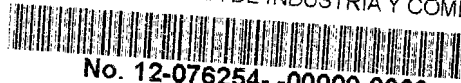
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-076254- -00000-0000
Fecha: 2012-05-09 15:30:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 261

000261

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Mayo 9 de 2012 - 09:16:29



No. 12-076254-00000-0000

Fecha: 2012-05-09 15:30:30

Tra. 11 PATENTE I/II

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 261

Art. 33 Decisión 486/00

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐