

COMPOSICIONES ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE DEFICIENCIA DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA (OTC)

Declaración en relación con la investigación o desarrollo patrocinado por el gobierno federal

Este trabajo fue apoyado en parte por becas de National Institutes of Health, Nos. P01-HD057247, P01-HL059407, y P30-DK047757. El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos en esta invención.

Incorporación por referencia del material presentado en formato electrónico

Por la presente el solicitante incorpora por referencia el material de la lista de secuencias presentada en formato electrónico con la presente. Este archivo está marcado como "UPN-14-7037PCT_ST25.txt".

Antecedentes de la invención

La deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC), representa casi la mitad de los casos de errores congénitos de la síntesis de la urea, con una prevalencia estimada en al menos 1 de cada 15,000. Los defectos del ciclo de la urea ponen a los pacientes en riesgo de la amenaza de elevación de amoníaco que puede conducir al deterioro irreversible cognitivo, coma y muerte. Los varones recién nacidos con deficiencia completa desarrollan coma hiperamonémica dentro de los 3 primeros días de vida, que, si no se trata, es letal.

Las terapias actuales para la deficiencia de OTC (OTCD) tienen numerosos desafíos. Los pacientes pueden ser manejados con una dieta baja en proteínas en combinación con el uso de medicamentos que activan rutas de depuración de nitrógeno alternativas, pero esto no impide las crisis de hiperamonemia. A pesar del uso de la diálisis y la terapia de ruta alternativa, existe una tasa de mortalidad de casi el 50% en los recién nacidos. El trasplante de hígado puede curar OTCD, pero hígado de donante es limitando, el procedimiento conlleva una morbilidad significativa y son necesarios fármacos inmunosupresores para la duración de la vida del sujeto.

La terapia génica de una enfermedad metabólica, tal como OTCD presenta un modelo más desafiante para terapia de reemplazo de genes de otras condiciones. Debido a que el gen actúa en una célula de manera autónoma (esto es, que sólo puede influir en la célula en la que este se expresa), los efectos terapéuticos deberían estar correlacionados directamente con el número de células diana que son transducidas, en lugar de con el nivel neto de expresión en hígado tal como con una proteína secretada donde la alta expresión por célula puede superar la baja la transducción. Por otra parte, ha habido al menos un informe

publicado que ARNm de hOTCwt es inestable. [Wang. L., et al, Molecular Genetics and Metabolism, 105 (2012) 203-211].

Ha habido informes publicados sobre el uso de vectores virales para probar de tratar la deficiencia de OTC. Por ejemplo, varios grupos han intentado esto en modelos murinos de la deficiencia de OTC, utilizando adenovirus recombinantes que llevan ADNc OTC de rata, ratón, o humano. Un cierto grado de éxito de la reconstitución de la actividad hepática de OTC y la corrección de las alteraciones metabólicas se han reportado en modelos animales con virus que llevan ADNc de OTC de rata o ratón. Estudios anteriores utilizando vectores adenovirales han ilustrado las dificultades de expresar niveles suficientes de OTC humana activa en ratones con OTCD.

Por lo tanto, existe una necesidad de otros enfoques para terapia de OTCD.

Resumen de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un vector viral recombinante que tiene un casete de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos modificada genéticamente que codifica ornitina transcarbamilasa humana (hOTCasa) y secuencias de control de expresión que dirigen la expresión de hOTC en una célula de hígado, en donde la secuencia del ácido nucleico de hOTC es menos de 80% idéntica a la secuencia de hOTC de tipo salvaje sobre la hOTC de longitud completa de la secuencia de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), o un fragmento del mismo que comprende la hOTC madura pero que carece de al menos la secuencia líder nativa, u otro intermedio que comprende al menos la hOTC madura y expresa una hOTCasa funcional. Adecuadamente, la secuencia modificada genéticamente ha sido preferiblemente de codones optimizados y aún más mejorado de tal manera que mejora al menos una de transducción, transcripción y/o traducción de la enzima.

La secuencia de ácidos nucleicos puede comprender la hOTC madura de la SEQ ID NO: 5, o una secuencia de ácidos nucleicos al menos aproximadamente 96 a aproximadamente 99% idéntica a la misma o una secuencia de ácidos nucleicos que comprende al menos la hOTC madura de la SEQ ID NO: 9, o una secuencia de ácidos nucleicos al menos aproximadamente 96 a aproximadamente 99% idéntica a la misma, que expresa una hOTCasa funcional. En una realización, la hOTC es la longitud completa de la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de ácidos nucleicos al menos aproximadamente 96 a aproximadamente 99% idéntica a la misma o una secuencia de ácidos nucleicos de longitud completa de SEQ ID NO: 9, o una secuencia de ácidos nucleicos al menos aproximadamente 96 a aproximadamente 99% idéntica a la misma. La secuencia de hOTC puede ser la de los correspondientes nucleótidos de SEQ ID NO: 3, 4, 8 o 9. Se incluyen dentro del alcance de la invención las cadenas complementarias a las de la lista de secuencias. El vector viral puede

ser seleccionado de un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector adenoviral y un vector lentiviral.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que tiene una cápside de AAV y empaquetada en esta un casete de expresión que comprende al menos una secuencia terminal invertida de repetición (ITR) de AAV, una secuencia de ácidos nucleicos modificada genéticamente que codifica ornitina transcarbamilasa humana (hOTCasa) y la secuencia control de la expresión que dirigen la expresión de hOTC en una célula de hígado, donde dichas secuencias de control de la expresión comprenden un promotor específico de hígado. La secuencia de ácidos nucleicos de hOTC modificada genéticamente es menos de 80% idéntica a la secuencia hOTC de tipo salvaje sobre la secuencia madura o hOTC de longitud completa de la secuencia de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) y expresa una hOTCasa funcional. La secuencia de ácidos nucleicos hOTC sintética comprende al menos la hOTC madura de SEQ ID NO: 5 o una secuencia de ácidos nucleicos al menos aproximadamente 96 a aproximadamente 99.9% idéntica a la misma o una secuencia de ácidos nucleicos que comprende al menos la hOTC madura de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de ácidos nucleicos al menos aproximadamente 96 a aproximadamente 99.9% idéntica a la misma.

En todavía un aspecto adicional, la invención proporciona un vector viral que comprende un gen hOTC que codifica un ornitina transcarbamilasa quimérica que comprende ornitina transcarbamilasa humana madura con un péptido de tránsito heterólogo, en donde la secuencia de codificación de la ornitina transcarbamilasa humana madura se selecciona de la secuencia de ácidos nucleicos que comprende al menos la hOTC madura de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 8 o 9. Opcionalmente, se pueden seleccionar las secuencias de longitud completa de cualquiera de estas secuencias, que incluyen la secuencia de tránsito. Alternativamente, un gen de OTC quimérica que incluye una secuencia de tránsito heteróloga, como se describe en este documento, y se pueden seleccionar estas hOTC madura.

En otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende un portador y se proporciona una cantidad eficaz de un vector como se describe en este documento.

En otro aspecto más es un vector viral como se describe en este documento utilizado en la preparación de un medicamento para la administración de ornitina transcarbamilasa a un sujeto en necesidad del mismo y/o para el tratamiento de la deficiencia de la ornitina transcarbamilasa. En una realización particularmente deseable, el sujeto es un sujeto humano. El sujeto puede ser homocigotos o heterocigotos para la deficiencia de ornitina transcarbamilasa.

En incluso otro aspecto, se proporciona el uso de un vector viral que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ornitina transcarbamilasa humana funcional en la

prevención y/o tratamiento de la fibrosis o cirrosis relacionada con la deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTCD) en un sujeto para OTCD. En una realización, el sujeto es un paciente humano. En una realización adicional, el sujeto es heterocigótico y puede exhibir aparición tardía de los síntomas.

En incluso un aspecto adicional, se proporciona el uso de un vector viral que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ornitina transcarbamilasa humana funcional en la prevención y/o tratamiento de carcinoma hepatocelular en un sujeto que tiene OTCD. En una realización, el sujeto es un paciente humano. En una realización adicional, el sujeto es heterocigótico para OTCD y puede mostrar aparición tardía de los síntomas.

Otros aspectos y ventajas de la invención serán fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A proporciona un ADNc de hOTC de tipo salvaje, que tiene 324 A, 223 C, 246 G, y 269 T [SEQ ID NO: 1].

La figura 1B-1C proporciona la secuencia de ornitina transcarbamilasa humana codificada por la secuencia de la figura. 1A [SEQ ID NO: 2].

La figura 2 proporciona un ADNc de hOTC modificada genéticamente, con una relación de GC alterada. El recuento de la base en la secuencia es 283 A, 285 C, 284 G, y 216 T [SEQ ID NO: 3]

La figura 3 proporciona un ADNc de hOTC modificado genéticamente denominado LW3 [SEQ ID NO: 4]. El recuento de base en esta secuencia es 279 A, 303 C, 288 G, y 220 T. El codón de inicio para el marco de lectura abierto (ORF) de hOTC está precedido por una secuencia de Kozak en esta figura. La secuencia de codificación para el líder comienza en el nucleótido 15 (primeros 96 nucleótidos), seguido por la secuencia de codificación para 322 aminoácidos de hOTCasa. En esta figura, el codón de parada es seguido por un sitio de restricción NotI (GCGGCCGC), que es un remanente del vector.

La figura 4 proporciona un ADNc de hOTC modificada genéticamente denominada LW4 [SEQ ID NO: 5]. El recuento de base en esta secuencia es 278 A, 303 C, 289 G, y 220 T. La secuencia de codificación para el líder comienza en el nucleótido 15 (primeros 96 nucleótidos), seguido de la secuencia de codificación para la hOTCasa de 322 aminoácidos. En esta figura, el codón de parada es seguido por un sitio de restricción NotI (GCGGCCGC), que es un remanente del vector.

Las Fig. 5A - 5C proporciona una alineación de las secuencias de ADNc de la hOTC de tipo salvaje, y las cinco secuencias modificadas genéticamente, GS [SEQ ID NO: 3], LW3 [SEQ ID NO: 4], LW4 [SEQ ID NO: 5], LW5 [SEQ ID NO: 8] y LW6 [SEQ ID NO: 9]. Las

secuencias alineadas contienen una secuencia de Kozak (primeros 14 nucleótidos de LW3 y LW4) y un sitio de enzima de restricción (después del codón de terminación para LW3 y LW4), que no son parte del marco de lectura abierto.

Descripción detallada de la invención

Un ADNc de ornitina transcarbamilasa (OTC) humana (h) modificada genéticamente se proporciona en este documento, que fue diseñado para maximizar la traducción y mejorar la estabilidad del ARNm, en comparación con el ADN y/o ARNm de hOTC de tipo salvaje. También se proporcionan en este documento las secuencias de ARNm de hOTC modificadas genéticamente. Estas composiciones se pueden utilizar en métodos terapéuticos y/o profilácticos, como se describe en este documento. Opcionalmente, estas composiciones se utilizan en combinación otras terapias consistentes con el estándar de cuidado de las condiciones para las que se ha diagnosticado el sujeto (por ejemplo, un sujeto humano).

Para fines de comparación, una secuencia de ADNc de OTC humana de tipo salvaje se ilustra en la figura 1A. Esta secuencia codifica la ornitina transcarbamilasa humana de la secuencia de aminoácidos de las figuras 1A-1C. Esta misma secuencia de aminoácidos es codificada por los genes de hOTC modificados genéticamente de las figuras 2A-fig. 5. La enzima de hOTC, que puede ser denominada como hOTCasa para distinguir del gen, se expresa a partir de esta secuencia en la forma de una preproteína que tiene un péptido líder de 32 aminoácidos en su terminal N (codificada por 1-96 nt de la figura 1, de aproximadamente 1 a aproximadamente 32 aminoácidos de SEQ ID NO: 2) que se escinde después de dirigir la enzima a las mitocondrias celulares, dejando la proteína "madura" del residuo de 322 aminoácidos (aproximadamente 33 aminoácidos a aproximadamente 354 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Esta hOTCasa "denominada madura" es una proteína homotrimérica con una secuencia de residuos de 322 aminoácidos en cada cadena polipeptídica. Opcionalmente, como una alternativa a la secuencia de tipo salvaje de la SEQ ID NO: 2, se puede seleccionar una secuencia que incluye una o más de las posiciones polimórficas de origen natural que no están implicados en la enfermedad: F101, L111, W1193-194 de SEQ ID NO: 2 (véase, por ejemplo, <http://www.uniprot.org/uniprot/P00480>).

Aunque todas de las secuencias de ADNc diseñadas genéticamente son aproximadamente 77% a aproximadamente 78% idénticas a la secuencia de ácidos nucleicos de hOTC wt de la figura 1A [SEQ ID NO: 1], hay diferencias estructurales entre estas secuencias (véase la alineación en la figura 5 que ilustra lo mismo). En particular, hay aproximadamente 4% de diferencia en las secuencias de ácido nucleico entre hOTCco de la figura 2 [SEQ ID NO: 3] y la hOTCcoLW4 de la figura 4 [SEQ ID NO: 5]. Sólo hay una diferencia de nt entre LW-3 [Figura 3, SEQ ID NO: 4] y LW-4 [Figura 4, SEQ ID NO: 5], esto

es, 0.094% (1/1062) de diferencia (una A en LW-3 se cambia a una G en LW-4 como se muestra en la figura 5].

En una realización, se proporciona una secuencia de codificación de hOTC modificada cuya secuencia tiene menos de aproximadamente 80% de identidad, preferiblemente aproximadamente 77% de identidad o menos de la secuencia de codificación de hOTC de longitud completa de tipo salvaje (figura 1A, SEQ ID NO: 1), que codifica hOTCasa funcional. En una realización, la secuencia de codificación hOTC modificada se caracteriza por una estabilidad mejorada en comparación con hOTC wt después de la administración mediada por AAV (por ejemplo, rAAV). Adicional o alternativamente, se proporciona una secuencia de codificación de hOTC modificada que carece de marcos de lectura alternativos para proteínas de al menos aproximadamente 9 aminoácidos de longitud. Adicional, o alternativamente, se proporciona una secuencia de codificación de hOTC modificada que tiene niveles de expresión de hOTCasa de al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 100 veces cuando se mide después de la expresión de un vector viral, en comparación con la hOTCasa de tipo salvaje. Adicional, o alternativamente, se proporciona una secuencia de codificación de hOTC modificado que tiene la actividad del hígado de hOTCasa que es al menos aproximadamente 10 veces mayor, al menos aproximadamente 20 veces mayor, o al menos aproximadamente 30 veces mayor en comparación con la hOTCasa de tipo salvaje expresada a partir de un vector viral.

En una realización, una secuencia que codifica hOTC modificada es 96% a 99.9% idéntica a la secuencia que codifica la enzima madura (aproximadamente 99 a aproximadamente 1068 nt) o la longitud completa de la figura 4 (hOTCco-LW4, SEQ ID NO: 5), o 96.5% a 99% idéntica, o aproximadamente 97%, o aproximadamente 98% idéntica a SEQ ID NO: 5 (figura 4).

En una realización, una secuencia que codifica hOTC modificada es 96% a 99.9% idéntica a la secuencia que codifica la enzima madura (aproximadamente 99 a aproximadamente 1068 nt) o la longitud completa de la figura 3 (hOTCco-LW3, SEQ ID NO: 4), o 96.5% a 99% idéntica, o aproximadamente 97%, o aproximadamente 98% idéntica a SEQ ID NO: 4 (Fig. 3).

En otra realización, una secuencia que codifica hOTC modificada es 96% a 99.9% de la secuencia que codifica la enzima madura (aproximadamente 99 a aproximadamente 1068 nt) o la longitud completa de la figura 2 (hOTCco, SEQ ID NO: 3), o 96.5% a 99% idéntica, o aproximadamente 97%, o aproximadamente 98% idéntica a SEQ ID NO: 3 (Fig. 2).

En incluso otra realización, una secuencia que codifica hOTC modificada tiene la secuencia que codifica la proteína madura (aproximadamente 99 a aproximadamente 1068 nt) o la longitud completa de hOTCco-LW5 [SEQ ID NO: 8] o hOTCco-LW6 [SEQ ID NO: 9], o

una secuencia de 96% a 99.9% idéntica a la misma, hOTCco-LW5 y hOTCco-LW6 son aproximadamente 97% idénticas entre sí, y cada una es aproximadamente 78% idéntica a la secuencia de tipo salvaje [SEQ ID NO: 1].

Las secuencias de las figuras 2-5 se proporcionan como la cadena de sentido de las secuencias de ADNc. La presente invención también abarca las hebras antisentido correspondientes a estas secuencias de ADNc y ARN correspondientes, por ejemplo, secuencias de ARNm. Por ejemplo, el ARNm modificado genéticamente de SEQ ID NO: 10, corresponde al ADN de SEQ ID NO: 4; el ARN modificado genéticamente de SEQ ID NO: 11, corresponde al ADN de la SEQ ID NO: 5; el ARN modificada genéticamente de SEQ ID NO: 12, corresponde al ADN de la SEQ ID NO: 8; y el ARN de la SEQ ID NO: 13 corresponde al ADN de SEQ ID NO: 9. Estas secuencias de ARN y secuencias que son 95% a 99%, o aproximadamente 97%, o aproximadamente 98% idénticas a una o más de estas secuencias se abarcan dentro del alcance de esta invención. Los métodos para alinear y determinar la identidad del ARN se conocen la técnica e incluyen las bases de datos y servicios disponibles comercialmente o basados en la Web publicados y disponibles para el público. Véase, por ejemplo, LocARNA, CARNA, así como otros programas identificados en otras partes en el mismo.

En una realización de la invención, la secuencia de ARNm se puede entregar utilizando un sistema de entrega de ARN seleccionado, ejemplos de los cuales se suministran en este documento.

También se incluyen en este documento los fragmentos. Por ejemplo, las secuencias que codifican el péptido de tránsito (1 a aproximadamente 32 aminoácidos), aproximadamente 332 a aproximadamente 354 aminoácidos, una enzima hOTC intermedia, o la enzima madura, u otros fragmentos, según se desee. Se puede hacer referencia a SEQ ID NO: 2. Véase, por ejemplo, Ye et al. 2001, Hum Gene Ther 12: 1035-1046.

En otra realización, se proporciona una OTC quimérica en la que la presecuencia N-terminal de OTC de tipo salvaje se sustituye con una secuencia de tránsito de otra fuente que es compatible con el sistema del sujeto de tal manera que transporte eficazmente la hOTCasa madura codificada por el gen OTC quimérica para el orgánulo deseado. Véase, por ejemplo, Ye et al. 2001, Hum Gene Ther 12: 1035-1046. Tales secuencias de tránsito codifican un péptido de tránsito (también denominadas un péptido señal, señal de dirección, o señal de localización) que se fusiona a la secuencia codificante para la hOTC de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 8 y/o 9. Por ejemplo, la secuencia de tránsito de hOTC de tipo salvaje corresponde a aproximadamente los primeros 98 nucleótidos de SEQ ID NO: 1. Para construir una OTC quimérica, estas secuencias de terminal N de tipo salvaje se pueden remover (aproximadamente 1 ácido nucleico a aproximadamente 96 nt – 98 nt) y se reemplazan con una secuencia de tránsito heteróloga. Los péptidos de tránsito apropiados

son preferiblemente, aunque no necesariamente de origen humano. Los péptidos de tránsito apropiados se pueden seleccionar de <http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/zhang270.htm>, que se incorpora por referencia en este documento, o se puede determinar utilizando una variedad de programas computacionales para determinar el péptido de tránsito en una proteína seleccionada. Aunque no limitadas, tales secuencias pueden ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o aproximadamente 20 a aproximadamente 28 aminoácidos de longitud, o puede ser más grande o pequeño según se necesite.

El término “porcentaje (%) de identidad”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia”, o “por ciento idéntica” en el contexto de secuencias de ácido nucleico se refiere a los residuos en las dos secuencias que son las mismas cuando se alinean para la correspondencia. La longitud de la comparación de identidad de la secuencia puede ser sobre la longitud completa del genoma, la longitud completa de una secuencia codificante del gen, o un fragmento de al menos aproximadamente 500 a 5000 nucleótidos, se desea. Sin embargo, también puede ser deseable la identidad entre fragmentos más pequeños, por ejemplo, de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 20 a 24 nucleótidos, al menos 28 a 32 nucleótidos, al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos.

El porcentaje de identidad se puede determinar fácilmente para secuencias de aminoácidos sobre la longitud completa de una proteína, polipéptido, aproximadamente 32 aminoácidos, aproximadamente 330 aminoácidos, o un fragmento de péptidos de la misma o las correspondientes secuencias codificantes de la secuencia del ácido nucleico. Un fragmento del aminoácido apropiado puede ser al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, y puede ser hasta aproximadamente 700 aminoácidos. Generalmente, cuando se hace referencia a “identidad”, “homología”, o “similitud” entre dos diferentes secuencias, “identidad”, “homología”, o “similitud” se determina en referencia a secuencias “alineadas”. Las secuencias “alineadas” o “alineaciones” se refieren a secuencias de ácido nucleico múltiples o secuencias de proteínas (aminoácidos), a menudo que contienen correcciones para bases adicionales o faltantes o aminoácidos en comparación con una secuencia de referencia.

Las alineaciones se realizan utilizando cualquiera de una variedad de múltiples programas de alineación de secuencias disponibles de forma pública o comercialmente. Los programas de alineación de secuencias están disponibles para secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas “Clustal X”, “MAP”, “PIMA”, “MSA”, “BLOCKMAKER”, “MEME”, y “Match-Box”. Generalmente cualquiera de estos programas se utiliza en la configuración por defecto, aunque un experto en el arte puede modificar estos valores según sea necesario. Alternativamente, un experto en el arte puede utilizar otro algoritmo o programa de ordenador

que proporciona al menos el nivel de identidad o alineación, como el proporcionado por los algoritmos y programas referenciados. Véase, por ejemplo, J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

Los múltiples programas de alineación de secuencias, también son disponibles de secuencias de ácido nucleico. Ejemplos de tales programas incluyen, "Clustal W", "CAP Sequence Assembly". "BLAST", "MAP", y "MEME", que son accesibles de Web Servers en el internet. Otras fuentes para tales programas se conocen para los expertos en el arte. Alternativamente, también se utiliza Vector NTI utilities. También existe un número de algoritmos conocidos en la técnica que se pueden utilizar para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos, incluyendo los contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, las secuencias de polinucleótido se pueden comparar utilizando FastaTM, un programa en GCG Versión 6.1. FastaTM proporciona las alineaciones y porcentaje de identidad de la secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de investigación y consulta. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de ácido nucleico se puede determinar utilizando FastaTM con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) como se proporciona en GCG Versión 6.1, se incorpora por referencia en este documento.

En una realización, los genes de hOTC modificados descritos en este documento están diseñados genéticamente en un elemento genético apropiado (vector) útil para la generación de vectores virales y/o para la entrega a una célula huésped, por ejemplo, ADN desnudo, fago, transposón, cósmido, episoma, etc., que transfiere las secuencias de hOTC realizadas sobre el mismo. El vector seleccionado se puede entregar por cualquier método apropiado, incluyendo transfección, electroporación, entrega del liposoma, técnicas de fusión de membrana, pellets recubiertos con ADN de alta velocidad, infección viral y fusión de protoplastos. Los métodos usados para hacer tales construcciones son conocidos por los expertos en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas sintéticas. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Como se utiliza en este documento, un "casete de expresión" se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende las secuencias de hOTC, promotor, y puede incluir otras secuencias reguladoras para ello, casete que puede ser empaquetado en la cápside de un vector viral (por ejemplo, una partícula viral). Por lo general, dicho casete de expresión para la generación de un vector viral contiene las secuencias de hOTC descritas en este documento flanqueado por señales de empaquetamiento del genoma viral y otras secuencias de control de expresión tales como las descritas en este documento. Por

ejemplo, para un vector viral AAV, las señales de empaquetamiento son la terminal invertida de repetición 5' (ITR) y la 3' ITR.

En una realización, las secuencias ITR de AAV2, o la versión suprimida de la misma (Δ ITR), se utilizan por conveniencia y para acelerar la aprobación regulatoria. Sin embargo, se pueden seleccionar ITR procedentes de otras fuentes de AAV. Cuando la fuente de las ITR es de AAV2 y la cápside de AAV es de otra fuente de AAV, el vector resultante se puede denominar pseudotipado.

Por lo general, un casete de expresión para un vector de AAV comprende una 5' ITR de AAV, las secuencias codificantes de hOTC y cualquier secuencia reguladora, y una 3' ITR de AAV. Sin embargo, otras configuraciones de estos elementos pueden ser apropiadas. Una versión más corta de la 5' ITR, denominada Δ ITR, se ha descrito en la que se suprimen la secuencia D y el sitio de resolución terminal (trs). En otras realizaciones, se utilizan las 5' ITR y 3' de AAV de longitud completa.

En una realización, la construcción es una molécula de ADN (por ejemplo, un plásmido) útil para la generación de vectores virales. Un plásmido ilustrativo que contiene los elementos del vector deseables se ilustra por pAAVsc. TBG.hOTCco-LW4, cuya secuencia es SEQ ID NO: 6 y que se incorpora por referencia. Este plásmido ilustrativo contiene un casete de expresión que comprende: scITR (5-109 nt de la SEQ ID NO: 6), una señal TATA (851 a 854 nt de la SEQ ID NO: 6), una secuencia de codificación hOTC sintética (976 a 2037 nt de SEQ ID NO: 6), una poli A (2182-2046 nt en el complemento de la SEQ ID NO: 6), un scITR (2378 a 2211 nt sobre el complemento de SEQ ID NO: 6), y un promotor específico del hígado (TBG) (4172 a 4760 nt) de la SEQ ID NO: 6). Otros casetes de expresión pueden ser generados utilizando otras secuencias de codificación de hOTC sintética, y otros elementos de control de expresión, que se describen en este documento.

La abreviatura "sc" en este contexto se refiere al autocomplementario. "AAV autocomplementario" se refiere a una construcción en la que una región de codificación transportada por una secuencia de ácidos nucleicos de AAV recombinante ha sido diseñada para formar una plantilla de ADN bicatenario intra-molecular. Tras la infección, en lugar de esperar para la síntesis mediada por células de la segunda cadena, las dos mitades complementarias de scAAV se asociarán para formar una unidad de ADN bicatenario (ADNbc), que está lista para la replicación y la transcripción inmediata. Véase, por ejemplo, D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (agosto 2001), Vol 8, Número 16, páginas 1248-1254. AAV autocomplementarios se describen en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,596,535; 7,125,717; y 7,456,683, cada uno de los cuales se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

El casete de expresión normalmente contiene una secuencia de promotor como parte de las secuencias de control de expresión, por ejemplo, que se encuentra entre la secuencia 5' ITR seleccionada y de la secuencia de codificación de hOTC. El vector y plásmido ilustrativo descrito en este documento utiliza el promotor específico del hígado, globulina de unión de tiroxina (TBG). Alternativamente, otros promotores específicos de hígado se pueden utilizar [véase, por ejemplo, The Liver Specific Gene Promoter Database, Cold Spring Harbor, <http://rulai.schl.edu/LSPD/>, tal como, por ejemplo, alfa 1 anti-tripsina (A1AT); albumina humana Miyatake et al., J. Virol., 71:5124-32 (1997), humAlb; and hepatitis B virus core promoter, Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996)]. Promotor/potenciador TTR mínima, promotor de alfa-antitripsina, LSP (845 nt) 25 (requiere scAAV intrón-menos); o LSP1. Aunque menos deseados, otros promotores, tales como promotores constitutivos, promotores regulables [véase, por ejemplo, WO 2011/126808 y WO 2013/04943], o un promotor que responde a las señales fisiológicas pueden ser utilizados en los vectores descritos en este documento.

Además de un promotor, un casete de expresión y/o un vector puede contener una o más de otras apropiadas secuencias de iniciación de la transcripción, terminación, potenciadoras, señales de procesamiento del ARN eficaces, tales como señales de poliadenilación (poliA) y de empalme; secuencias que estabilizan ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de traducción (esto es, secuencias de consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. Los ejemplos de secuencias poliA apropiadas incluyen, por ejemplo, SV40, SV50, hormona de crecimiento bovina (bGH), hormona de crecimiento humana, y poliA sintéticas. Los ejemplos de potenciadores apropiados incluyen, por ejemplo, el potenciador de alfa fetoproteína, el potenciador/promotor mínimo de TTR, LSP (promotor de globulina de unión a TH/alfa1-microglobulina/potenciador de bikunina), entre otros. En una realización, el casete de expresión comprende uno o más potenciadores de la expresión. En una realización, el casete de expresión contiene dos o más potenciadores de la expresión. Estos potenciadores pueden ser iguales o pueden ser diferentes uno de otro. Por ejemplo, un potenciador puede incluir un promotor de Alfa mic/bik. Este potenciador puede estar presente en dos copias que están situados uno junto a otro. Alternativamente, las dos copias del potenciador pueden estar separadas por una o más secuencias. En aún otra realización, el casete de expresión contiene además un intrón, por ejemplo, el intrón Promega. Otros intrones apropiados incluyen los conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describen en WO 2011/126808. Opcionalmente, una o más secuencias se pueden seleccionar para estabilizar el ARNm. Un ejemplo de tal secuencia es una secuencia modificada WPRE, que puede estar modificada genéticamente en dirección 5'

de la secuencia de poliA y en dirección 3' de la secuencia codificante [véase, por ejemplo, MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619.

Estas secuencias de control están "unidas operativamente" a las secuencias génicas de hOTC. Como se utiliza en este documento, el término "unida operativamente" se refiere tanto a secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de las secuencias de interés y control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés.

Los vectores virales AAV recombinantes son muy apropiados para la entrega de las secuencias de expresión hOTC descritas en este documento. Tales vectores AAV pueden contener ITR que son de la misma fuente de AAV como la cápside. Alternativamente, las ITR de AAV pueden ser de una fuente de AAV diferente a la que suministra la cápside.

Cuando AAV pseudotipado se debe producir, las ITR en la expresión se seleccionan de una fuente que se diferencia de la fuente de AAV de la cápside. Por ejemplo, ITR AAV2 se pueden seleccionar para su uso con una cápside de AAV que tiene una eficacia particular para dirigir al hígado (por ejemplo, hepatocitos). Las cápsides de AAV se pueden seleccionar de AAV8 [Patente de los Estados Unidos 7790449; Patente de los Estados Unidos 7282199] y rh10 [WO 2003/042397] para las composiciones descritas en este documento. Sin embargo, otros AAV, incluyendo, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, y otros tales como, por ejemplo, los descritos en WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2, que se incorporan por referencia en este documento] se pueden utilizar en sujetos humanos.

En una realización, se proporciona un AAV auto-complementario. Este vector viral puede contener una $\Delta 5'$ ITR y una 3'ITR de AAV. En un ejemplo, el vector viral es scAAV2/8.TBG.hOTCco. En otro ejemplo, el vector viral es scAAV2/rh10.TBG.hOTCco. Estos vectores contienen tanto el 5' Δ ITR de AAV2, el promotor TBG específico de hígado, una secuencia codificante de hOTCco modificada genéticamente de la invención, una poliA de SV40, y la ITR de 3' AAV2 en una cápside de AAV8 [véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nº 8,318480B2] o cápside de AAV rh10. La secuencia se puede seleccionar a partir de hOTC modificada genéticamente de una de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 8 o 9. Opcionalmente, la secuencia de tránsito de la hOTC modificada genéticamente puede ser sustituida con una secuencia de tránsito heteróloga para proporcionar una hOTC quimérica, que conserva la hOTCasa madura.

En otra realización, se proporciona un vector viral de AAV bicatenario. Dicho vector puede contener una 5' ITR de AAV y una 3' ITR. Un ejemplo es AAV2/8.TBG.hOTCco, que contiene la 5' ITR de AAV2 de longitud completa, el promotor TBG específico de hígado, la secuencia de codificación de hOTC, una hormona de crecimiento bovina poliA, y 3' ITR de AAV2. Otro ejemplo es AAV2/8.TBG.hOTCco-WPRE.bGH, que contiene los mismos

elementos del vector, y, además, contiene el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). En otras realizaciones, WPRE está ausente de las construcciones que se van a utilizar *in vivo*. La secuencia de hOTC modificada genéticamente (abreviada en este documento hOTCco) se puede seleccionar a partir de hOTC modificada genéticamente de una de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 8 o 9. Opcionalmente, la secuencia del péptido de tránsito de la hOTC modificada genéticamente puede estar sustituida con una secuencia heteróloga de tránsito para proporcionar una hOTC quimérica, que conserva la hOTCasa madura.

Además, otros promotores se pueden seleccionar, incluyendo promotores específicos de tejido. Los métodos para generar y aislar los vectores virales de AAV apropiados para la administración a un sujeto son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos No. 2007/0036760 (febrero 15, 2007), la Patente de los Estados Unidos 7790449; la Patente de los Estados Unidos 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; y US 7588772 B2]. Las secuencias de AAV8 y métodos de generación de vectores sobre la base de la cápside AAV8 se describen en la Patente de los Estados Unidos 7,282,199 B2, US 7,790,449 y US 8,318,480, que se incorporan en este documento por referencia. En un sistema de uno, una línea celular productora se transfecta transitoriamente con una construcción que codifica el transgén flanqueado por ITRs y una(s) construcción(es) que codifica rep y cap. En un segundo sistema, una línea celular de empaquetamiento que suministra de forma estable rep y cap se transfecta transitoriamente con una construcción que codifica el transgén flanqueado por ITRs. En cada uno de estos sistemas, los viriones de AAV se producen en respuesta a la infección con adenovirus o herpesvirus auxiliares, que requiere la separación de los rAAVs a partir de virus contaminantes. Más recientemente, se han desarrollado sistemas que no requieren la infección con virus auxiliar para recuperar el AAV - las funciones auxiliares requeridas (es decir, adenovirus E1, E2a, VA, y E4 o herpesvirus UL5, UL8, UL52 y UL29, y herpesvirus polimerasa) también se suministran, en trans, por el sistema. En estos sistemas más nuevos, las funciones auxiliares pueden ser suministrados por transfección transitoria de las células con construcciones que codifican las funciones auxiliares requeridas, o las células pueden ser diseñadas genéticamente para contener de forma estable genes que codifican las funciones de ayuda, la expresión de los cuales se puede controlar en el nivel transcripcional o posttranscripcional. En incluso otro sistema, el transgén flanqueado por ITRs y los genes rep/cap se introducen en células de insectos por infección con vectores basados en baculovirus. Para las revisiones de estos sistemas de producción, véase, en general, por ejemplo, Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adenovirus associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929, los contenidos de cada uno de los cuales se incorpora en

este documento por referencia en su totalidad. Los métodos de fabricación y uso de estos y otros sistemas de producción de AAV también se describen en las siguientes patentes de Estados Unidos, los contenidos de cada uno de los cuales se incorporan en este documento por referencia en su totalidad: 5,139,941; 5,741,683; 6,057,152; 6,204,059; 6,268,213; 6,491,907; 6,660,514; 6,951,753; 7,094,604; 7,172,893; 7,201,898; 7,229,823; y 7,439,065.

El espacio disponible, para el empaquetado puede ser conservado mediante la combinación de más de una unidad de transcripción genética en una única construcción, reduciendo así la cantidad de espacio de secuencia reguladora requerido. Por ejemplo, un único promotor puede dirigir la expresión de un ARN único que codifica dos o tres o más genes, y la traducción de los genes en dirección 3' son accionados por secuencias IRES. En otro ejemplo, un único promotor puede dirigir la expresión de un ARN que contiene, en un solo marco de lectura abierto (ORF), dos o tres o más genes separados uno de otro por secuencias que codifican un péptido de auto-escisión (por ejemplo, T2A) o un sitio de reconocimiento de proteasa (por ejemplo, furina). Así, el ORF codifica una única poliproteína que, ya sea durante (en el caso de T2A) o después de la traducción, se escinde en las proteínas individuales (tales como, por ejemplo, transgén y el factor de transcripción dimerizables). Cabe señalar, sin embargo, que, aunque estos IRES y sistemas de poliproteína se pueden utilizar para ahorrar espacio de empaquetamiento de AAV, sólo pueden ser utilizados para la expresión de componentes que pueden ser accionados por el mismo promotor. En otra alternativa, la capacidad de transgén de AAV se puede aumentar proporcionando ITR de AAV de dos genomas que se pueden hibridar para formar concatámeros de la cabeza a la cola.

Opcionalmente, los genes de hOTC descritos en este documento se pueden utilizar para generar vectores virales distintos de rAAV. Tales otros vectores virales pueden incluir cualquier virus apropiado para terapia génica se puede utilizar, incluyendo, pero no limitado a adenovirus; virus del herpes; lentivirus; retrovirus; etc. Adecuadamente, donde se genera uno de estos otros vectores, este se produce como un vector viral de replicación defectuosa.

Un "virus de replicación defectuosa" o "vector viral" se refiere a una partícula viral sintética o artificial en la que un casete de expresión que contiene un gen de interés está empaquetado en una cápside o envoltura viral, donde cualquiera de las secuencias genómicas virales también empaquetadas dentro de la cápside viral o envoltura son deficientes de replicación; esto es, no pueden generar progenie de viriones, pero conservan la capacidad de infectar células diana. En una realización, el genoma del vector viral no incluye genes que codifican las enzimas requeridas para replicar (el genoma puede ser modificado genéticamente para ser "gutless" – que contiene sólo el transgén de interés flanqueado por las señales necesarias para la amplificación y empaquetado del genoma artificial), pero estos genes pueden ser suministrados durante la producción. Por lo tanto, se

considera seguro para el uso en la terapia génica ya que la replicación y la infección por viriones de progenie no pueden ocurrir excepto en la presencia de la enzima viral requerida para la replicación. Tales virus de replicación defectuosa pueden ser virus adenoasociados (AAV), adenovirus, lentivirus (integrando o no integrando), u otra fuente de virus apropiado.

Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento están diseñadas para la administración a sujetos en necesidad del mismo por cualquier ruta apropiada o una combinación de diferentes rutas. Se desea una administración directa o intrahepática en el hígado y se puede realizar opcionalmente a través de administración intravascular, por ejemplo, a través de la vena porta, vena hepática, conducto biliar, o por trasplante. Alternativamente, se pueden seleccionar otras rutas de administración (por ejemplo, oral, inhalación, intranasal, intratraqueal, intraarterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, y otras rutas parentales). Las construcciones de administración de hOTC descritas en este documento se pueden administrar en una composición única o múltiples composiciones. Opcionalmente, dos o más AAV diferentes pueden ser administrados [véase, por ejemplo, WO 2011/126808 y WO 2013/049493]. En otra realización, tales múltiples virus pueden contener diferentes virus de replicación defectuosa (por ejemplo, AAV, adenovirus y/o lentivirus). Alternativamente, la administración puede ser mediada por construcciones no virales, por ejemplo, "ADN desnudo", "ADN de plásmido desnudo", ARN y ARNm; junto con diversas composiciones de administración y nano partículas, incluyendo, por ejemplo, micelas, liposomas, lípidos catiónicos - composiciones de ácidos nucleicos, composiciones de poli-glucano y otros polímeros, conjugados de ácido nucleico basados en lípidos y/o colesterol, y otras construcciones, tal como se describen en este documento. Véase, por ejemplo, X. Su et al, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), pp 774-787; publicación en la web: Mar 21, 2011; WO2013/182683, WO 2010/053572 y WO 2012/170930, ambos de los cuales se incorporan en este documento por referencia. Tales construcciones de administración de hOTC no virales se pueden administrar por las rutas descritas anteriormente.

Los vectores virales, o ADN no viral o unidades estructurales de transferencia de ARN, se pueden formular con un portador fisiológicamente aceptable para su uso en aplicaciones de transferencia génica y terapia génica. En el caso de vectores virales de AAV, la cuantificación de las copias del genoma ("GC") se puede utilizar como la medida de la dosis contenida en la formulación. Cualquier método conocido en la técnica se puede utilizar para determinar el número de copias del genoma (GC) de las composiciones de virus de replicación defectuosa de la invención. Un método para realizar la titulación del número de GC de AAV es de la siguiente manera: muestras de vectores de AAV purificadas se tratan primero con DNasa para eliminar el ADN del genoma de AAV no-encapsulado o ADN plasmídico contaminante a partir del proceso de producción. Las partículas resistentes a DNasa se someten después a un tratamiento térmico para liberar al genoma de la cápside.

Los genomas liberados son entonces cuantificados mediante PCR en tiempo real utilizando conjuntos de cebador/sonda de orientación de región específica del genoma viral (por lo general señal de poliA). Las composiciones de virus de replicación defectuosa se pueden formular en unidades de dosificación para contener una cantidad de virus de replicación defectuosa que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1.0×10^9 GC a aproximadamente 1.0×10^{15} GC (para tratar un sujeto promedio de 70 kg de peso corporal) y, preferiblemente, 1.0×10^{12} GC a 1.0×10^{14} GC para un paciente humano. Preferiblemente, la dosis del virus de replicación defectuosa en la formulación es 1.0×10^9 GC, 5.0×10^9 GC, 1.0×10^{10} GC, 5.0×10^{10} GC, 1.0×10^{11} GC, 5.0×10^{11} GC, 1.0×10^{12} GC, 5.0×10^{12} GC, 1.0×10^{13} GC, 5.0×10^{13} GC, 1.0×10^{14} GC, 5.0×10^{14} GC, 1.0×10^{15} GC.

El ADN y el ARN se miden generalmente en las cantidades de nanogramos (ng) a microgramos (μ g) de los ácidos nucleicos. En general, para un tratamiento en un humano preferiblemente dosificaciones del ARN es el rango de 1 ng a 700 μ g, 1 ng a 500 μ g, 1 ng a 300 μ g, 1 ng a 200 μ g, o 1 ng a 100 μ g se formulan y administran. Las cantidades de dosificación similares de una molécula de ADN que contiene un casete de expresión y no administrados a un sujeto a través de un vector viral se pueden utilizar para construcciones de administración de ADN de hOTC no virales.

La producción de lentivirus se mide como se describe en este documento y se expresa como IU por volumen (por ejemplo, mL). IU es la unidad infecciosa, o, alternativamente, unidades de transducción (TU); IU y TU se pueden utilizar indistintamente como una medida cuantitativa del título de una preparación de partícula del vector viral. El vector lentiviral es por lo general no integrante. La cantidad de partículas virales es al menos aproximadamente 3×10^6 IU, y puede ser al menos aproximadamente 1×10^7 IU, al menos aproximadamente 3×10^7 IU, al menos aproximadamente 1×10^8 IU, al menos aproximadamente 3×10^8 IU, al menos aproximadamente 1×10^9 IU, o al menos aproximadamente 3×10^9 IU.

Los vectores recombinantes descritos anteriormente pueden ser administrados a las células huésped de acuerdo con métodos publicados. El rAAV, preferiblemente suspendido en un portador fisiológicamente compatible, se puede administrar a un paciente mamífero humano o no humano. Los portadores apropiados se pueden seleccionar fácilmente por un experto en la técnica en vista de la indicación para la que se dirige el virus de transferencia. Por ejemplo, un portador apropiado incluye solución salina, que se puede formular con una variedad de soluciones de solución reguladora (por ejemplo, solución salina regulada con fosfato). Otros portadores de ejemplo incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, y agua. La selección del portador no es limitación de la presente invención.

Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además del rAAV y portador(es), otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes, o estabilizantes químicos. Los estabilizantes de ejemplo apropiados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, vainillina de etilo, glicerina, fenol, y paraclorofenol. Los estabilizantes químicos apropiados incluyen gelatina y albúmina.

Los vectores virales descritos en este documento se pueden utilizar en la preparación de un medicamento para la administración de ornitina transcarbamilasa a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) en necesidad del mismo, el suministro de hOTCasa funcional a un sujeto, y/o para el tratamiento de la deficiencia de ornitina transcarbamilasa. Un ciclo de tratamiento puede implicar opcionalmente la administración repetida del mismo vector viral (por ejemplo, un vector de AAV8) o un vector viral diferente (por ejemplo, un AAV8 y un AAVrh10). Además, otras combinaciones se pueden seleccionar utilizando los vectores virales y sistemas de administración no virales descritos en este documento.

En otra realización, las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento se pueden administrar mediante una vía no viral. Por ejemplo, una secuencia de hOTC puede ser a través de un sistema portador para la expresión o administración en forma de ARN (por ejemplo, ARNm) utilizando uno de un número de sistemas de portador que son conocidos en la técnica. Tales sistemas de portador incluyen los proporcionados por las entidades comerciales, tales como PhaseRx' denominada tecnología "SMARTT". Estos sistemas utilizan copolímeros de bloque para la entrega a una célula huésped diana. Véase, por ejemplo, US 2011/0286957, titulada "Multiblock Polymers", publicada el 24 de noviembre de 2011; US 2011/0281354, publicada el 17 de noviembre de 2011; EP2620161, publicada 31 de julio de 2013; y WO 2015/017519, publicada el 5 de febrero de 2015. Véase, también, S. Uchida et al, (febrero de 2013) PLoS ONE 8 (2): e56220. Aún, otros métodos implican la generación y la inyección de ARNbc sintéticos [véase Soutschek et al. Nature (2004) 432 (7014): 173-8; véase también Morrissey et al. Hepatol. (2005) 41(6):1349-1356], la administración local al hígado también se ha demostrado mediante la inyección de ARN bicatenario directamente en el sistema circulatorio circundante del hígado utilizando cateterización de la vena renal. [Véase Hamar et al. PNAS (2004) 101(41): 14883-8]. Además, otros sistemas implican la administración de ARNbc y particularmente siARN utilizando complejos catiónicos o formulaciones liposomales [véase, por ejemplo, Landen et al. Cancer Biol. Ther. (2006) 5(12); véase también Khoury et al. Arthritis Rheumatol. (2006) 54(6): 1867-77. Otras tecnologías de administración de ARN también están disponibles, por ejemplo, de Veritas Bio [véase, por ejemplo, US 2013/0323001, 23 de diciembre de 2010, "In vivo delivery of double stranded RNA to a target cell" (contenido citosólico que incluye ARNs,

por ejemplo, ARNm, si ARN/shARN/miARN, así como siARN/shARN/miARN inyectado/introducido, o posiblemente incluso ADN transfectado presente en el citosol empacado dentro de exovesículas y ser transportado a sitios distales tales como el hígado). Además, se han descrito otros sistemas para la administración *in vivo* de secuencias de ARN. Véase, por ejemplo, US 2012/0195917 (agosto 2, 2012) (análogos 5'-cap de ARN para mejorar la estabilidad e incrementar la expresión del ARN), WO 2013/143555A1, Oct 3, 2013 y/o disponible comercialmente (BioNTech, Alemania; Valera (Cambridge, MA); Zata Pharmaceuticals).

Por lo tanto, en una realización, la invención provee un ARNm de hOTC modificada genéticamente de la secuencia madura (al menos aproximadamente 99–1098 nt) o la longitud completa de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, o una secuencia que tiene al menos 97% a 99% de identidad con esta, en una composición para la entrega de ARN monocatenario o bicatenario que resulta en la expresión de la hOTCasa madura en una célula huésped diana, por ejemplo, una célula del hígado.

Las cinéticas de la composición descrita en este documento que contiene ARNm (administrado directamente, en comparación con la transcrita a partir de una molécula de administración de ADN) son particularmente apropiados para uso en sujetos en crisis aguda, como expresión de la hOTCasa a partir del ARNm se puede ver dentro de un periodo de varias horas. Con el fin de evitar depuración rápida del ARN, este se modifica como se describe en este documento (por ejemplo, utilizando una caperuza o una base modificada), de manera que sus efectos se pueden retener por más de 24 horas, más de 48 horas, o hasta aproximadamente 3 días (aproximadamente 72 horas). Puede ser deseable coadministrar un ARNm directamente como se describe en este documento y coadministrar al mismo o sustancialmente al mismo tiempo, una composición de hOTC basada en vector viral o ADN como se define en este documento. Por lo tanto, un sujeto puede recibir tratamiento inmediato, y al momento como la expresión mediada por ARNm comienza a decaer, la expresión de hOTC a largo plazo conferida por una expresión mediada por el vector viral empieza a hacer efecto. Alternativamente, un sujeto puede recibir una segunda administración de una composición basada en ARNm como se define en este documento. Las composiciones de ARNm descritas en este documento se pueden utilizar en otros regímenes terapéuticos o métodos, incluyendo aquellos que implican pacientes con OTCD que no están en crisis aguda.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se definió anteriormente. En una realización, la composición comprende un copolímero de bloque asociado con un polinucleótido de hOTC como se describe en este documento. Los copolímeros de bloque pueden formar una micela, de manera que la micela comprende una pluralidad de copolímero en bloque.

Por lo general, dicha composición contiene una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ARNm que corresponde a la secuencia de hOTC que codifica la hOTCasa madura (al menos aproximadamente 99 a 1098 nt) o la longitud completa de cualquiera de SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13. Además, esta molécula de ácido nucleico puede incluir la región no traducida 5' (UTR), también conocida como la secuencia líder o ARN líder, y uno o más de un intrón(es) opcional(es), un exón(es) opcional(es), una secuencia opcional de Kozak, un WPRE opcional, y un poliA, y la UTR 3' flanqueantes de las secuencias de codificación. Las secuencias líder apropiadas incluyen las discutidas anteriormente en relación con las secuencias de ADN de hOTC, cuya discusión se incorpora por referencia en este documento. Ejemplos de fuentes de secuencias líder apropiadas, diferentes de las secuencias líder de hOTC nativas, o aquellas correspondientes a la figura 2, figura 3 o figura 4, o figura 5 se discuten anteriormente. Del mismo modo, fuentes de intrones apropiados, poliA, y secuencias Kozak se discuten anteriormente y son aplicables a la administración de las secuencias de ARN correspondientes discutidos en el presente párrafo. Además, diversas modificaciones para el ARN se pueden generar, por ejemplo, una estructura cap 5' modificada puede ser modificada genéticamente en la construcción con el fin de evitar la depuración rápida del ARNm *in vivo* o por otra razón deseada. Los métodos de generación de tales estructuras cap 5' se conocen para los expertos en el arte. Véase, por ejemplo, US 2012/0195917 y WO 2013/143555A1, Oct 3, 2013. Además, nucleótidos modificados se pueden utilizar para hacer ARNm *in vitro*, como pseudouridina. También ARN se puede dosificar repetitivamente, o el sujeto puede ser dosificado primero con ARNm para manejar crisis neonatalaes seguido por administración mediada con vector viral (por ejemplo, AAV) para terapia a largo plazo y para prevenir fibrosis/cirrosis y/o carcinoma hepatocelular.

ARNm puede ser sintetizado a partir de las secuencias de ADN de hOTC descritas en este documento, utilizando técnicas que son bien conocidas en el arte. Por ejemplo, Cazenave C, Uhlenbeck OC, RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 19;91(15):6972-6, describe el uso de la polimerasa de ARN T7 para generar ARN a partir de plantillas de ADNc o ARN. Véase también, Wichlacz Al, Legiewicz M, Ciesiołka J., Generating *in vitro* transcripts with homogenous 3' ends using trans-acting antigenomic delta ribozyme., Nucleic Acids Res. 2004 Feb 18;32(3):e39; Krieg PA, Melton DA., Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs, Nucleic Acids Res. 1984 Sep 25; 12(18):7057-70; y Rio, D.C., et al. RNA: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011, 205-220. Cada una de estas referencias se incorpora en este documento por referencia. Además, kits y protocolos para generar ARNm son disponibles comercialmente incluyendo, sin limitación, Riboprobe® In Vitro Transcription System (Promega Corp.); RiboMAX™ Large

Scale RNA Production Systems (Promega Corp.); MAXIscript Kit (Ambion); MEGIscript kit (Ambion); y MessageAmpTM aRNA Kit (Ambion); mMMESSAGE mMACHINE® Kits (Ambion); y HiScribeTM T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs® Inc.). ARN a medida también se puede generar comercialmente en compañías que incluyen, sin limitación, TriLink Biotechnologies; bioSYNTHESIS; GE Dharmacon; e IBA Lifesciences.

Las secuencias de ADN de hOTC descritas en este documento pueden ser generadas *in vitro* y sintéticamente, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la síntesis exacta basada en PCR (PAS) del método de secuencia de ADN largo, como se describe por Xiong et al, PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences, *Nature Protocols* 1, 791-797(2006). Un método de combinación de los métodos de PCR de extensión solapada y PCR asimétrico dual se describe por Young and Dong, Two-step total gene synthesis method, *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(7): e59. Véase también, Gordeeva et al, *J Microbiol Methods*. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification. 2010 May;81(2):147-52. Epub 2010 Mar 10; véase, también las siguientes patentes sobre síntesis de oligonucleótidos y síntesis de genes, *Gene Seq.* 2012 Apr;6(1):10-21; US 8008005; y US 7985565. Cada uno de estos documentos se incorpora en este por referencia. Además, hits y protocolos para la generación de ADN a través de PCR son disponibles comercialmente. Estos incluyen el uso de polimerasas incluyendo, sin limitación, polimerasa Taq; One Taq® (New England Biolabs); Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs); and GoTaq® G2 Polymerase (Promega). El ADN también se puede generar a partir de células transfectadas con plásmidos que contienen las secuencias de hOTC descritas en este documento. Los kits y protocolos son conocidos y están disponibles comercialmente e incluyen, sin limitación, kits de plásmidos QIAGEN; kits de plásmidos Chargeswitch® Pro Filter (Invitrogen); y kits de plásmidos GenEluteTM (Sigma Aldrich). Otras técnicas útiles en este documento incluyen métodos de amplificación isoterma específica de la secuencia, que eliminan la necesidad de termociclado. En lugar de calor, estos métodos por lo general emplean una polimerasa de ADN que desplaza la cadena, Polimerasa de ADN tipo Bst, Large Fragment (New England Biolabs), para separar ADN bicatenario. El ADN también se puede generar a partir de moléculas de ARN a través de la amplificación con el uso de transcriptasas inversas (RT), que son polimerasas de ADN dependientes del ARN. RT polimerizan una cadena de ADN que es complementaria a la plantilla de ARN original y se refiere como ADNc. A continuación, este ADNc puede ser amplificado adicionalmente a través de PCR o métodos isotérmicos como se describe anteriormente. El ADN personalizado también se puede generar comercialmente a partir de las compañías

incluyendo, sin limitación, GenScript; GENEWIZ®; GeneArt® (Life Technologies); e Integrated DNA Technologies.

El término “expresión” se utiliza en este documento en su sentido más amplio y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína. Con respecto a ARN, el término “expresión” o “traducción” relacionada en particular con la producción de péptidos o proteínas. La expresión puede ser transitoria o puede ser estable.

El término “traducción” en el contexto de la presente invención se relaciona con un proceso en el ribosoma, en donde una cadena de ARNm controla el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para generar una proteína o un péptido.

De acuerdo con la presente invención, una “cantidad terapéuticamente efectiva” de la hOTC se administra como se describe en este documento para lograr un resultado deseado, esto es tratamiento de la deficiencia de OTC o uno o más de los síntomas de la misma. Como se describe en este documento, un resultado deseado incluye la reducción de los niveles del ácido orótico, reduciendo hiperamonemia y/o minimizando o eliminando una o más de las complicaciones neurofísicas incluyendo retraso en el desarrollo, problemas de aprendizaje, discapacidad intelectual, déficit de atención, trastorno de hiperactividad y déficit de la función ejecutiva. El tratamiento puede incluir tratamiento de los sujetos que tienen enfermedad de inicio neonatal severa (machos o, más raramente, hembras), y enfermedad de inicio tardío (parcial) en machos y hembras, que se puede presentar desde la infancia a finales de la infancia, adolescencia, o la edad adulta. En ciertas realizaciones, la invención provee un método de tratamiento y/o prevención de fibrosis y/o cirrosis en sujetos, particularmente aquellos sujetos heterocigotos de inicio tardío, mediante la administración de hOTC como se describe en este documento. En una realización, objetivos terapéuticos para la deficiencia de OTC son mantener el amoníaco el plasma a menos de $<80 \mu\text{mol/L}$, glutamina en plasma $<1,000 \mu\text{mol/L}$, argininemia $80\text{-}150 \mu\text{mol/L}$ y aminoácidos de cadena ramificada dentro del rango normal. Sin embargo, otros criterios de valoración terapéuticos pueden ser seleccionados por el médico tratante.

En incluso otra realización, la invención provee un método de rescate y/o tratamiento de un sujeto neonatal con OTCD que comprende la etapa de entregar un gen de hOTC al hígado de un sujeto recién nacido (por ejemplo, un paciente humano). Este método puede utilizar cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica una hOTC funcional, si una hOTC sintética como se describe en este documento o una hOTC de tipo salvaje, o una hOTC a partir de otra fuente, o una combinación de las mismas. En una realización, el tratamiento neonatal se define como siendo administrada una hOTC como se describe en este documento dentro de las 8 horas, las primeras 12 horas, las primeras 24 horas, o las primeras 48 horas de administración. En otra realización, particularmente para un primate, la

administración neonatal está dentro de un periodo de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, o aproximadamente 1 mes, o después de 24 horas a aproximadamente 48 horas. Para hacer frente a la dilución debido a la rápida renovación de las células del hígado en un mamífero en crecimiento (por ejemplo, un primate no humano o humano), es deseable la terapia neonatal seguido por la readministración a aproximadamente 3 meses de edad, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 9 meses, o aproximadamente 12 meses. Opcionalmente, se permite más de una readministración. Tal readministración puede ser con el mismo tipo de vector, un vector viral diferente, o a través de entrega no viral. En una realización, un sistema de entrega basado en ARN para hOTC funcional, se utiliza para estabilizar un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) en crisis, seguido por la entrega de una entrega mediada por un vector viral de una hOTC funcional. En otra realización, la terapia inicial implica la coadministración de sistemas de entrega de hOTC mediada viral o no viral. En una realización adicional, las construcciones de ADN y ARN de hOTC se pueden utilizar solas, o en combinación con el estándar de cuidado para el diagnóstico del paciente y la afección.

Como se describe en los ejemplos de trabajo en este documento, la invención ha encontrado que los sujetos con OTCD heterocigotos, incluyendo aquellos con OTCD de inicio tardío, han aumentado la fibrosis y/o esteatosis microvesicular en todo el hígado. Tal fibrosis y/o esteatosis microvesicular del hígado puede conducir a la cirrosis relacionada con OTCD. Por lo tanto, en otra realización, la invención provee métodos de prevención de la fibrosis en el hígado y/o la condición médica asociada con la cirrosis relacionada con OTCD, mediante la administración al sujeto (por ejemplo, un paciente humano) una hOTC. Este aspecto de la invención puede utilizar un sistema de entrega viral o no viral. El casete de expresión del ácido nucleico puede contener un ADN o ARN de la hOTC sintético como se provee en este documento, u otra secuencia apropiada que expresa hOTC funcional. En una realización, un método de tratamiento y/o prevención de la fibrosis del hígado, esteatosis microvesicular, y/o cirrosis relacionada con OTCD se provee que implica la entrega de hOTC a un sujeto que tiene OTCD. El sujeto puede ser un paciente humano. En una realización, el paciente es heterocigoto y tiene OTCD de inicio tardío. Puede haber sido sin tratar previamente para OTCD, o puede haber recibido otros tratamientos convencionales. En el presente, no existe un estándar de cuidado para OTCD, sino más bien los síntomas se manejan, por ejemplo, a través de la interrupción de la ingesta de proteínas, aumentos compensatorios en la dieta de carbohidratos y lípidos, hemodiálisis para pacientes en coma con niveles extremadamente altos en sangre; y/o la administración intravenosa de benzoato de sodio, arginina, y/o fenilacetato de sodio. La US FDA ha aprobado el glicerol fenilbutirato (Ravicti®) para el manejo a largo plazo de algunos trastornos del ciclo de la urea para los pacientes mayores

de 2 años y mayores; este fármaco ayuda a liberar el cuerpo de amoníaco y está destinado a pacientes que no pueden ser manejados por una dieta restringida en proteínas o los suplementos de aminoácidos solos. En una realización, el tratamiento del paciente (por ejemplo una primera inyección) se inició después del primer 1 año, o después de los primeros 2 a 3 años, después de 5 años, después de 11 años, o a una edad mayor.

En una realización, el método de la invención provee el tratamiento y/o reversión de la fibrosis hepática y/o cirrosis relacionada con OTCD mediante la entrega al sujeto de una OTCasa funcional que se codifica por un ADN modificado genéticamente de SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 8 o 9, o un ADN quimérico como se define en este documento. La entrega del ADN se puede mediar por un vector viral que contiene el modificado genéticamente en un casete de expresión, o por un sistema de entrega no viral, cualquiera de los cuales media la expresión de OTCasa funcional en las células del hígado del sujeto. En otra realización, al sujeto se le administra un ARN modificado genéticamente de SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 13, o un ARN quimérico como se define en este documento. La entrega del ARN se puede mediar por un vector viral que contiene el ARN modificado genéticamente en un casete de expresión, o por un sistema de entrega no viral, cualquiera de los cuales media la expresión de OTCasa funcional en las células de hígado del sujeto.

Los sujetos con OTCD heterocigotos tienen un riesgo aumentado del desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC). Véase, por ejemplo, JM Wilson et al, *Molecular Genetics and Metabolism* (2012), *Mol Genet Metab.* 2012 Feb; 105(2): 263-265, Publicado en línea el 7 de Noviembre de 2011. Por lo tanto, en otra realización, la invención provee métodos de prevención, tratamiento y/o prevención de HCC mediante la entrega al sujeto (por ejemplo, un paciente humano) una hOTC. Este aspecto de la invención puede utilizar un sistema de entrega viral o no viral. El casete de expresión del ácido nucleico puede contener un ADN o ARN de hOTC sintético como se provee en este documento, u otra secuencia apropiada y que expresa hOTCasa funcional. El paciente puede haber sido sin tratar previamente para OTCD, o puede haber recibido otro tratamiento convencional, esto es, estándar de cuidado. En una realización, el tratamiento del paciente (por ejemplo, una primera inyección) se inició antes del diagnóstico con HCC. En otra realización, el tratamiento del paciente se inició después del diagnóstico de HCC. Opcionalmente, el tratamiento implica la coadministración con sorafenib (comercialmente disponible como Nexavar®), o siendo utilizado en conjunto con quimioembolización, radiación, ablación térmica, inyección percutánea de etanol, terapia dirigida (por ejemplo, fármacos antiangiogénesis), infusión arterial hepática de fármacos contra el cáncer, inmunoterapia, o con opciones quirúrgicas incluyendo, por ejemplo, resección, criocirugía, y trasplante de hígado. Cuando se utiliza para el tratamiento de HCC, puede ser deseable seleccionar un sistema de entrega no integrante (por ejemplo, entrega

de ARN directo, o virus no integrantes tales como adenovirus o lentivirus no integrantes) para la entrega de un ADN o ARN de hOTC sintético como se describe en este documento.

Por “OTC funcional”, se entiende un gen que codifica la OTCasa de tipo salvaje tal como se caracteriza por SEQ ID NO: 2 u otra OTCasa que provee al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o aproximadamente el mismo o mayor de 100% del nivel de actividad biológica de la enzima ornitina transcarbamilasa humana de tipo salvaje, que se puede caracterizar por la secuencia de SEQ ID NO: 2 o una variante natural o polimorfo de la misma que no se asocia con la enfermedad. Más particularmente, como los pacientes heterocigotos pueden tener un nivel funcional de OTCasa tan bajo como aproximadamente 50% o menos, el tratamiento efectivo puede no requerir reemplazo de actividad de OTCasa para niveles dentro del rango de pacientes “normal” o pacientes sin OTCD. Del mismo modo, los pacientes que tienen cantidades no detectables de OTCasa pueden ser rescatados administrando la función OTCasa a niveles de actividad de menos de 100%, y opcionalmente se puede someter posteriormente a un tratamiento adicional. Como se describe en este documento, la terapia génica descrita en este documento, si viral o no viral, se puede utilizar en conjunto con otros tratamientos, esto es el estándar de cuidado para el diagnóstico del sujeto (paciente).

En una realización, dicha OTCasa funcional tiene una secuencia que tiene aproximadamente 95% o mayor identidad a la proteína madura (esto es, aproximadamente al menos 322 aminoácidos) o secuencia de longitud completa de SEQ ID NO: 2, o aproximadamente 97% de identidad o más, o aproximadamente 99% o más para la SEQ ID NO: 2 en el nivel de aminoácidos. Dicha OTCasa funcional, también puede haber abarcado polimorfos naturales que no son asociados con ninguna enfermedad (por ejemplo, F101, L111, y/o W1193-194 de SEQ ID NO: 2). La identidad se puede determinar preparando una alineación de las secuencias y a través del uso de una variedad de algoritmos y/o programas de ordenador conocidos en la técnica o disponibles comercialmente [por ejemplo BLAST, ExpASY; ClustalO; FASTA; utilizando, por ejemplo, algoritmo de Needleman-Wunsch, Smith-Waterman].

Una variedad de ensayos existe para medir la expresión de OTC y niveles de actividad *in vitro*. Véase, por ejemplo, X Ye, et al, 1996 Prolonged metabolic correction in adult ornithine transcarbamylase-deficient mice with adenoviral vectors. J Biol Chem 271:3639-3646) o *in vivo*. Por ejemplo, la actividad de enzima de OTC se puede medir utilizando un método de dilución de isótopo estable de espectrometría de masa cromatografía líquida para detectar la formación de citrulina normalizada a [1,2,3,4,5-¹³C₅] citrulina (98% ¹³C). El método se adapta a partir de un ensayo desarrollado previamente para la detección de actividad de N-acetilglutamato sintasa [Morizono H, et al, Mammalian N-

acetylglutamate synthase. Mol Genet Metab. 2004;81 (Suppl 1):S4-11.]. Rodajas de hígado congeladas frescas se pesaron y homogeneizaron brevemente en solución reguladora que contiene HEPES 10 mM, Triton al 0.5% X-100, EDTA 2.0 mM y DTT 0.5 mM. El volumen de solución reguladora de homogeneización se ajusta para obtener 50 mg/mL de tejido. La actividad enzimática se mide utilizando 250 µg de tejido de hígado en acetato Tris 50 mM, ornitina 4 mM, carbamil fosfato 5 mM, pH 8.3. La actividad enzimática se inició con la adición de carbamil fosfato 50 mM preparada recientemente disuelta en acetato Tris 50 mM, pH 8.3, se dejó proceder durante 5 minutos a 25°C y se inactivó por la adición de un volumen igual de 13C5-citrulina 5 mM en TCA al 30%. Los residuos se separan con 5 minutos de microcentrifugación, y los sobrenadantes se transfieren a viales de espectroscopía de masas. Diez µL de muestra se inyectan en un LC-MS Agilent serie 1100, bajo condiciones isocráticas con una fase móvil de 93% de solvente A (1 mL de ácido trifluoroacético en 1 L de agua): 7% de solvente B (1 mL de ácido trifluoroacético en 1 L de agua/acetonitrilo 1:9). Los picos correspondientes a citrulina [relación carga:masa 176.1 (m/z)] y 13C5-citrulina (181.1 m/z) se cuantifican y sus relaciones se comparan con las relaciones obtenidas para una curva estándar de citrulina realizada con cada ensayo. Las muestras se normalizaron para ya sea tejido de hígado total o para concentración de proteína determinada utilizando un kit de ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). También se pueden utilizar otros ensayos, que no requieren biopsia de hígado. Uno de dichos ensayos es un ensayo de aminoácidos en plasma en el cual se evalúa la relación de glutamina y citrulina y si la glutamina es alta (>800 microlitros/litro) y citrulina baja (por ejemplo, un solo dígito), se sospecha de un defecto del ciclo de la urea. Los niveles de amoniaco en plasma se pueden medir y una concentración de aproximadamente 100 micromoles por litro es indicativo de OTCD. Los gases en sangre se pueden evaluar si un paciente está hiperventilando; alcalosis respiratoria es frecuente en OTCD. El ácido orótico en orina, por ejemplo, mayor de aproximadamente 20 micromoles por milimol de creatina es indicativa de OTCD, como se evalúa orotato urinario después del ensayo de desafío con alopurinol. Los criterios de diagnóstico para OTCD se han establecido en Tuchman et al, 2008, Urea Cycle Disorders Consortium (UCDC) of the Rare Disease Clinical Research Network (RDCRN). Tuchman M, et al, Consortium of the Rare Diseases Clinical Research Network. Cross-sectional multicenter study of patients with urea cycle disorders in the United States. Mol Genet Metab. 2008;94:397-402, que se incorpora por referencia en este documento. Véase, también, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK154378/>, que provee una discusión del presente estándar de cuidado para OTCD.

Es de señalar que el término "un" o "una" se refiere a uno o más. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" se usan indistintamente en este documento.

Las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" se deben interpretar inclusivamente en vez de exclusivamente. Las palabras "consisten", "que consiste", y sus variantes, se deben interpretar exclusivamente, en lugar de inclusive. Aunque varias realizaciones en la memoria descriptiva se presentan utilizando la expresión "que comprende", en otras circunstancias, una realización relacionada también está destinada a ser interpretada y descrita utilizando la expresión "que consiste en" o "consiste esencialmente en".

Como se utiliza en este documento, el término "aproximadamente" se refiere a una variabilidad de 10% ($\pm 10\%$) a partir de la referencia dada, a menos que se especifique lo contrario.

El término "regulación" o variaciones de los mismos como se utilizan este documento se refiere a la capacidad de un compuesto de fórmula (I) para inhibir uno o más componentes de una ruta biológica.

Un "sujeto" es un mamífero, por ejemplo, un ser humano, ratón, rata, cobaya, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, o primate no humano, tal como un mono, chimpancé, babuino o gorila.

Como se utiliza en este documento, "enfermedad", "trastorno" y "afección" se utilizan indistintamente, para indicar un estado anormal en un sujeto.

A menos que se defina lo contrario en esta memoria descriptiva, los términos técnicos y científicos utilizados este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en el arte por referencia a los textos publicados, que proporcionan un experto en el arte con una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

Los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos y no tienen la intención de limitar la presente invención.

Ejemplo 1 - Vectores AAVsc que contienen hOTC

pAAVsc.TBG.hOTCwt y pAAVsc.TBG.hOTCco-LW4 fueron construidos mediante la sustitución de la secuencia de codificación mOTC con hOTC de tipo salvaje (WT) (hOTCwt) o hOTCcoLW ADNc, respectivamente, en un plásmido derivado del pAAVsc.TBG.mOTC1.3 descrito previamente con el intrón interrumpido [Moscioni D, et al, "Long-term correction of ammonia metabolism and prolonged survival in ornithine transcarbamylase-deficient mice following liver-directed treatment with adeno-associated viral vectors", Mol Ther. 2006;14:25-33; Cunningham SC, et al, "AAV2/8-mediated correction of OTC deficiency is robust in adult

but not neonatal Spf(ash) mice”, *Mol Ther.* 2009;17:1340-1346; Wang L, et al., “Sustained correction of OTC deficiency in spf^{ash} mice using optimized self-complementary AAV2/8 vectors”, *Gene Ther.* 2012 Apr; 19(4):404-10, Epub 2011 Aug 18].

El scAAV2/8.TBG.hOTCco-LW4 contiene una 3' ITR y una 5' ITR de AAV2 con una delección en la secuencia D y trs (sitio de resolución terminal), un promotor TBG, el gen hOTCco-LW4 y un SV40 poliA de 137 pb. Las dos preparaciones de vector (AAV2/8sc.TBG.hOTCwt y AAV2/8sc.TBG.hOTCco-LW4) utilizados en el estudio de comparación inicial se purificaron mediante dos rondas de centrifugación en gradiente de cloruro de cesio, como se describe anteriormente [Wang L, et al, Systematic evaluation of AAV vectors for liver directed gene transfer in murine models. *Mol Ther.* 2010;18:118-125]. Los vectores utilizados en el resto del estudio se produjeron mediante un método de producción a escala basado en transfección de polietilenimina (PEI) y se purificaron a partir del sobrenadante o lisado total mediante centrifugación en gradiente de iodixanol como se describe [Lock M, et al, *Hum Gene Ther.* 2010;21:1259-1271]. Los títulos del genoma [copias del genoma (GC)/mL] de vectores AAV se determinaron mediante PCR en tiempo real utilizando conjuntos de cebadores y sondas dirigidos al promotor TBG (cebador hacia adelante 5'-AAACTGCCAATTCCACTGCTG-3' [SEQ ID NO: 14], cebador reverso 5'-CCATAGGCCAAAAGCACCAAGA-3' [SEQ ID NO: 15], sonda 6FAM-TTGGCCCAATAGTGAGAACTTTTTCCTGC [SEQ ID NO: 16]-TAMRA), y utilizando un plásmido linealizado como el estándar. El cebador hacia adelante se encuentra 400 pb en dirección 3' de la de la horquilla cerrada en 5'. Fagone et al [Systemic errors in quantitative polymerase chain reaction titration of self-complementary adeno-associated viral vectors and improved over alternative methods, *Hum Gene Ther Methods.* 2012 Feb;23(1):1-7.] informó recientemente de que el método de PCR cuantitativa (Q-PCR) podría subestimar significativamente el título de vectores de ScAAV, sobre todo cuando los cebadores de PCR estaban cerca de la horquilla cerrada del vector ScAAV. El título de un lote de AAV2/8sc.TBG.hOTCco-LW4 vector utilizando un conjunto de cebador y sonda dirigido a la región poliA (1900 pb en dirección 3' de la horquilla cerrada en 5'), y el título del genoma fue 1.1 veces del título original, que estaba dentro del error intraensayo de Q-PCR.

Los niveles de expresión de proteínas OTC y actividad de OTC se evaluaron en el hígado de ratones spf^{ash} 14 días después de inyección i.v. de 1×10^{11} GC de vectores AAV2/8sc.TBG.hOTCwt o AAV2/8sc.TBG.hOTCco-LW4. Los ratones spf^{ash} son un modelo para la enfermedad OTC de aparición tardía en humanos. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Pennsylvania. Los ratones spf^{ash} se mantuvieron en el Animal Facility of the Translational Research Laboratories at the University of Pennsylvania, como se describe anteriormente. Ratones spf^{ash} de tres a seis meses de

edad y sus compañeros de camada normales se utilizaron en los estudios. Los vectores fueron administrados por inyección intravenosa (i.v.) a través de la vena de la cola. El grado de transferencia de genes basado en genomas de vector residentes no fue estadísticamente diferente entre los dos grupos. Las muestras de orina se recogieron antes y en diversos momentos después del tratamiento con vector para el análisis de ácido orótico como se describe anteriormente [Moscioni D, et al, Long-term correction of ammonia metabolism and prolonged survival in ornithine transcarbamylase-deficient mice following liver-directed treatment with adeno-associated viral vectors. *Mol Ther.* 2006;14:25-33].

El análisis de transferencia Western para detectar la expresión de hOTC en lisado de hígado se realizó como se ha descrito anteriormente [Wang L, et al, 2012, epub 2011)]. El anticuerpo primario para detectar hOTC fue un anticuerpo policlonal de conejo personalizado proporcionado por el laboratorio de Hiroki Morizono en Children's National Medical Center. Lisados de hígado (10 µg/carril) también se transfirieron y se probaron con un anticuerpo anti-tubulina (Abcam, Cambridge, MA). El análisis de Western demostró expresión de hOTC más alta de 100-veces del vector de hOTCco-LW4 en comparación con el vector hOTCwt, alcanzando niveles en ligero exceso de los observados en los ratones WT.

La actividad enzimática OTC se midió utilizando un método de dilución de isótopos estables de espectrometría de masas cromatografía líquida para detectar la formación de citrulina normalizada a [1,2,3,4,5-¹³C₅] citrulina (98% ¹³C). El método es adaptado de un ensayo previamente desarrollado para la detección de la actividad de N-acetilglutamato sintasa [Morizono H, et al, Mammalian N-acetylglutamate synthase. *Mol Genet Metab.* 2004;81(Suppl 1):S4-11.]. Rodajas de hígado congeladas frescas se pesaron y se homogeneizaron brevemente en una solución reguladora que contiene HEPES 10 mM, Triton al 0.5% X-100, EDTA 2.0 mM y DTT 0.5 mM. El volumen de solución reguladora de homogeneización se ajusta para obtener 50 mg/mL de tejido. La actividad enzimática se mide utilizando 250 µg de tejido de hígado en acetato Tris 50 mM, ornitina 4 mM, carbamil fosfato 5 mM, pH 8.3. La actividad enzimática se inició con la adición de carbamil fosfato 50 mM preparada recientemente disuelta en Tris-acetato pH 8.3 50 mM, se dejó proceder durante 5 minutos a 25°C y se inactivó mediante la adición de un volumen igual de 5 mM ¹³C₅-citrulina en 30% de TCA. Los residuos se separan mediante 5 minutos de microcentrifugación, y los sobrenadantes se transfirieron a viales para espectroscopía de masas. Diez µL de muestra se inyectó en un LC-MS Agilent serie 1100, bajo condiciones isocráticas con una fase móvil de 93% de solvente A (1 mL de ácido trifluoroacético en 1 L de agua): 7% de solvente B (1 mL de ácido trifluoroacético en 1 L de agua/acetonitrilo 1:9). Los picos correspondientes a cirtrulina [relación carga:masa 176.1 (m/z)] y ¹³C₅-cirtrulina (181.1 m/z) se cuantifican y sus relaciones se comparan con las relaciones obtenidas para una curva estándar de cirtrulina

realizada con cada ensayo. Las muestras se normalizaron para ya sea tejido de hígado total o para concentración de proteína determinada utilizando un kit de ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA).

Se ha encontrado que el vector que lleva ADNc de hOTC modificado genéticamente denominado este documento LW4 (Fig. 4), mejora los niveles de proteína de hOTC expresada por 100 veces. Una evaluación de la actividad enzimática de OTC generalmente correlacionada con los experimentos de transferencia Western de OTC, aunque la proteína de OTC fue más elevada que la actividad enzimática de OTC cuando se compara con OTC endógena. Al restar los niveles de actividad de fondo en los ratones *spf^{ash}*, el hOTCco-LW4 resultó en actividad más de 33 veces mayor que la hOTCwt. Los niveles de actividad y expresión de hOTC correlacionada con la dosis y sostenidos se observaron en los ratones *spf^{ash}* tratados. En comparación con un vector de OTC murino descrito previamente que difiere principalmente en el ADNc, el vector que lleva el vector hOTCco-LW4 fue aproximadamente 10 veces más potente.

El vector ilustrativo que lleva el hOTCco-LW4 modificado (Fig. 4) proporcionó alto nivel de transducción, como se mide mediante ensayos histológicos de OTC, a través de un amplio rango de dosis. Entre las dosis 1×10^{11} GC y 3×10^9 GC, eficacia de transducción, como se mide por tinción histoquímica, varió entre 50-70%. A la dosis más baja de 1×10^9 GC, 40% de las áreas del hígado fueron positivas por tinción histoquímica de OTC. La falta de un efecto de la dosis clara por histoquímica e inmunotinción podría ser debido al hecho de que la optimización de codones mejoró significativamente la expresión hOTC en los hepatocitos transducidos. Esto conduce a una mejor sensibilidad para detectar las células transducidas con copias del genoma del vector baja. La transducción podría ser saturada con dosis alta del vector (1×10^{11} a 1×10^{10} GC), y por lo tanto la eficacia de transducción medidas por los métodos de detección *in situ* no discriminaría entre los grupos de dosis baja y alta, en contraste con la actividad enzimática de OTC en lisados de hígado medidos por espectrometría de masas.

Se realizó un estudio adicional en el que la expresión neonatal de hOTC se evaluó en ratones *spf^{ash}*, inyectados en el día 1 de vida, utilizando el scAAV2/8.TBG.hOTCco a una dosis de 5×10^{10} GC/cría inyectado a través de la vena temporal. Se detectó la expresión robusta a las 24 y 48 horas. Se realizaron estudios adicionales utilizando dosis de 1×10^{11} , 3×10^{10} , y 1×10^{10} , y se evaluaron durante 12 semanas. Durante el período de 16 semanas del estudio, se observó una reducción en los niveles de expresión iniciales robustos en cada uno de las dosis. Esto se cree que es debido a la dilución, esto es, un resultado natural de la proliferación de células hepáticas en animales en crecimiento. Por lo tanto, mientras se observa restauración inicial de la actividad de OTC del hígado después de la transferencia génica neonatal en ratones *spf^{ash}*, este resultado es temporal, con la actividad de OTC que

cae desde aproximadamente 1000% de los niveles de tipo salvaje (wt) a aproximadamente 1 semana, a aproximadamente 50% de niveles wt a las 4 semanas, a aproximadamente 10% de los niveles wt a las 12 semanas (1×10^{11} GC nivel); o aproximadamente 500% de los niveles wt en la semana 1, a aproximadamente 20% de los niveles wt, o aproximadamente 10% de los niveles wt en la semana 1 (dosis 3×10^{10} GC) o aproximadamente 200% de los niveles wt en la semana 1, a aproximadamente 10% de niveles wt en la semana 4 (dosis 1×10^{10} GC). En un estudio, utilizando animales que recibieron la primera inyección de 3×10^{10} GC en el día 1, los animales fueron inyectados con un segundo vector de AAV que lleva el gen hOTCco (scAAVrh10.hOTCco; 1.8×10^{10} GC) en la semana 4. Como control, un grupo de animales no recibió la readministración y un grupo recibió sólo el segundo vector a las 4 semanas. La readministración del AAV.hOTCco dio lugar a la restauración de la actividad hepática de OTC.

Estudios adicionales fueron diseñados para evaluar la capacidad de rescatar a las crías OTC-KO mediante terapia génica neonatal, tanto a corto plazo como a largo plazo.

Ejemplo 2 - Producción de vectores ScAAV que tienen secuencias de codones optimizados

A. scAAV8.TBG.hOTC-co

Los plásmidos que contienen una secuencia de hOTC de codón optimizado de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 9 o 10, respectivamente, se clonaron como se describe en el Ejemplo 1, mediante la sustitución de la secuencia de codificación mOTC con hOTCco en un plásmido derivado del pAAVsc.TBG.mOTC1.3 descrito previamente con el intrón. El plásmido pAAVsc.TBG.hOTCco resultante se clonó en una cápside de AAV8 [Gao et al, PNAS USA, 2002,99: 11854-11859] utilizando técnicas convencionales.

B. scAAVrh10.TBG.hOTC-co

Los plásmidos que contienen una secuencia de hOTC de codón optimizado de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 9 o 10, respectivamente, se clonaron como se describe en el Ejemplo 1 mediante la sustitución de la secuencia de codificación de mOTC con hOTCco en un plásmido derivado del pAAVsc.TBG.mOTC1.3 descrito previamente con el intrón. Los plásmidos resultantes pAAVsc.TBG.hOTCco se clonan en una cápside de AAVrh10 [Gao et al, PNAS USA, 2002,99: 11854-11859] utilizando técnicas convencionales.

Ejemplo 3 - Producción de vectores ssAAV que tienen secuencias de codón optimizado

ssAAV2/8.LSP1.hOTC-co

Los plásmidos que contienen las secuencias de hOTCco de codón optimizado se clonan como se describe mediante la sustitución de la secuencia de codificación mOTC del plásmido pLSP1mOTC [Cunningham et al, Mol Ther, 2009, 17: 1340-1346] con la correspondiente secuencia de ADNc de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 9 o 10. Los plásmidos

resultantes pAAVsc.LSP1.hOTCco se clonan en cápsides de AAV8 para formar los correspondientes vectores ssAAV2/8.LSP1.hOTC-co utilizando técnicas descritas en el Ejemplo 1.

B. ssAAV2/rh10.LSP1.hOTC-co

Los plásmidos que contienen las secuencias de hOTCco de codón optimizado se clonan como se describe mediante la sustitución de la secuencia de codificación de mOTC del plásmido pLSP1mOTC [Cunningham et al, Mol Ther, 2009, 17: 1340-1346] con la secuencia de ADNc correspondiente de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 9 o 10. Los plásmidos resultantes pAAVsc.LSP1.hOTCco se clonan en cápsides de AAV8 para formar los correspondientes vectores ssAAV2/8.LSP1.hOTC-co utilizando técnicas descritas en el Ejemplo 1.

Los vectores generados de acuerdo con la Parte A o B pueden ser purificados mediante dos rondas de centrifugación en gradiente de cloruro de cesio, solución reguladora de intercambio con PBS, y se concentraron utilizando dispositivos de filtro de centrífuga 100K Amicon Ultra15 (Millipore, Bedford, MA). Título del genoma (GC/mL) de los vectores de AAV se puede determinar por PCR en tiempo real utilizando un conjunto de cebador/sonda que corresponde al promotor TBG y los estándares de plásmido linealizado. Los vectores pueden estar sujetos a pruebas de control de calidad adicionales, incluyendo análisis de electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio poliacrilamida (SDS-PAGE) para la pureza del vector y lisado de amebocitos de Limulus (LAL) para la detección de endotoxinas (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA).

Ejemplo 4 - ssAAV8.TBG.hOTCco en modelo de inicio tardío de OTCD

Un vector AAV8 se generó utilizando los métodos descritos en este documento. El vector ha empaquetado en el mismo una 5' ITR de AAV2, un promotor TBG, un intrón, una hOTCco, un elemento WPRE, una hormona de crecimiento de bovino poliA, y una 3' ITR de AAV2. La expresión y la cinética de este vector se compararon con un vector AAV8 autocomplementario con o sin el elemento WPRE. Los resultados muestran que las construcciones de cadena sencilla con el elemento WPRE superaron a aquellos vectores que carecen del elemento WPRE; a dosis comparables ambos vectores de cadena sencilla (con y sin WPRE) fueron menos robustos que el vector autocomplementario que carece de WPRE en los momentos medidos.

Sin embargo, los vectores monocatenarios pueden tener otras propiedades deseables, por ejemplo, en términos de cinética, dependiendo de la edad y estado del paciente.

Ejemplo 5 - Producción de vectores adenovirus que tienen secuencias de codón optimizado

ADNc de hOTCco [SEQ ID NO: 3, 4, 5, 9 y 10] con enzimas NotI se clona en dirección 3' de un promotor de PEPCK de rata para generar pPEPCK-hOTC como se describe en A. Mian et al, *Molecular Therapy*, 2004, 10: 492-499 (2004). Este plásmido se digirió con AscI y el fragmento de PEPCK-hOTCco resultante se inserta en el plásmido pC4HSU31 esqueleto adenoviral para generar los plásmidos pC4HSU-PEPCK-hOTCco parentales. El plásmido pWPRE se digiere con ClaI para liberar el WPRE, que se inserta a continuación en el sitio MluI de pPEPCK-hOTC, para generar el plásmido pPEPCK-hOTCco-WPRE con sus respectivas secuencias hOTCco. Las etapas restantes para generar el plásmido pC4HSU-PEPCK-hOTCco-WPRE adenoviral se describen como anteriormente. Todos los sitios de clonación se confirman por análisis de secuencias de ADN. La identidad de plásmidos recombinantes adenovirales se puede confirmar mediante digestión con enzimas de restricción con HindIII y BamHI. Los plásmidos adenovirales se linealizan con PmeI antes de la transfección en células 293Cre4. Los vectores adenovirales son rescatados y amplificados con células 293Cre4 y virus auxiliar AdLC8cluc. Las células 293N3Scre8 en suspensión se pueden usar en la etapa final de la producción de vector. La purificación, cuantificación por OD260 y la extracción de ADN viral se llevan a cabo como se describe en detalle en otra parte [Brunetti-Pierri, N., et al. (2004). Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* 15:35-46; Ng, P., Parks, R. J. and Graham, F. L. (2002). Preparation of helper-dependent adenoviral vectors. *Methods Mol. Med.* 69: 371-388]

Ejemplo 6 - Producción de vectores lentivirales hOTCco

A. Vectores lentivirales de replicación defectuosa que contienen las secuencias hOTCco proporcionadas en este documento se pueden producir mediante la sustitución del inserto de la secuencia del gen de OTC de rata del plásmido pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro [disponible comercialmente de Applied Biological Materials (ABM) Inc.; Canada] con la secuencia deseada hOTCco [SEQ ID NO: 3, 4, 5, 9 y 10]. Los virus se generan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sistema de ABM incluye una delección del potenciador en la región U3 de la 3'ΔLTR para asegurar la autoinactivación del vector lentiviral después de la transducción y la integración en el ADN genómico de la célula diana; contiene genes lentivirales mínimos necesarios para el empaquetamiento, replicación y transducción (Gag/Pol/Rev), derivados de diferentes plásmidos que carecen todos de señales de empaquetamiento; además, ninguno de los genes Gag, Pol, o Rev se incorporan en el genoma viral empaquetado, haciendo así el virus maduro incompetente para la replicación.

B. Replicación defectuosa, vectores lentivirales de hOTC no integrante

Una construcción de ADN que contiene un promotor específico de hígado y el ADN de hOTCco de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 9 y 10 están modificados genéticamente en vectores lentivirus que son pseudotipados en virus E2 sindbus con envoltura producida como se

describe en US2011/0064763, que se incorpora por referencia en este documento, todos los vectores contienen donante de empalme, señal de empaquetamiento (psi), un elemento sensible Rev (RRE), donante de empalme, aceptor de empalme, tracto poli-purina central (cPPT). El elemento WPRE es eliminado en ciertos virus.

C. El ADN de hOTCco de SEQ ID NO: 3, 4, 5, 9 y 10, se clona en un pseudotipado lentivirus con un gen de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV), adquirido de InvivoGen (SanDiego, CA) utilizando las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 7 - Producción de sistemas de entrega de ARN de hOTCco

El ARN se puede preparar por transcripción *in vitro* a partir de un sintetizado o plantilla de ADN. Se prepara el casete de expresión de ARN que incluye una 5' UTR, un intrón opcional con donantes de empalme y sitios aceptores, una secuencia de Kozak opcional, la secuencia de codificación de hOTC proporcionada en este documento, una poliA, y una 3' UTR utilizando técnicas conocidas.

A. Una cantidad apropiada de ARNm se incorpora en unas nanopartículas de polímeros sensibles al pH de envoltura lipídica generadas utilizando técnicas publicadas [X. Su et al, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), pp 774-787; publicación en la web: 21 de Marzo de 2011].

B. Formulaciones de nanopartículas poliméricas con polietilenimina (PEI) ramificadas de 25 kDa se preparan de la siguiente manera. Cuando PEI está presente, puede ser PEI ramificada de un peso molecular que oscila de 10 a 40 kDa, por ejemplo, PEI ramificada de 25 kDa (Sigma # 408727). Ejemplos de polímeros adicionales apropiados para la presente invención incluyen los descritos en la Publicación PCT WO2013182683, cuyo contenido se incorpora en este documento por referencia. La cantidad requerida de ARNm se diluye justo antes de la aplicación en agua para inyección (Braun, Melsungen) a un volumen total de 4 mL adicionado rápidamente a 4 mL de una solución acuosa de PEI ramificada de 25 kDa con una pipeta a una relación N/P de 10. La solución se mezcla pipeteando arriba y abajo.

C. Para una nanopartícula basada en lípidos, una formulación lipídica se ha creado utilizando el casete de expresión que contiene el ARN de hOTCco en la formulación de ck - E12:DOPE:Chol:PEG-DMG2K (cantidades relativas 50:25:20:5 (mg:mg:mg:mg)) para proveer una solución para la entrega. Se utiliza ck -E12 lípido catiónico (véase, por ejemplo, WO 2013/063468), y se combina con dioleoilfosfatidil-etanolamina o "DOPE", colesterol (chol), y polietilenglicol (PEG) o lípido PEGilado (PEG-DMG2K) utilizando métodos de formulación descritos en las Publicaciones de Patente Internacional WO 2010/053572 y WO 2012/170930, ambos de los cuales se incorporan este documento por referencia.

Ejemplo 8 – Sistemas de entrega de ADN de hOTCco

A. El ADN del plásmido desnudo - Las secuencias de hOTCco [SEQ ID NO: 3, 4, o 5], se modifican genéticamente como construcciones de ADN del plásmido desnudo que se

entregan a una célula del hígado diana (por ejemplo, a través de la administración intravascular) y expresar la proteína de OTC humana en la célula diana.

B. Complejos catiónicos de lípido ADN – Los complejos catiónicos de ADN lípido se preparan utilizando una cantidad apropiada de un casete de expresión que contiene al menos un promotor, un intrón opcional, una secuencia opcional de Kozak, una hOTCco de SEQ ID NO: 3, 4, o 5, una poliA, y otras secuencias de control de expresión opcionales. El promotor puede ser un promotor específico de hígado. Como alternativa, se puede seleccionar otro promotor específico de no-tejido. Por ejemplo, una cantidad apropiada de ADN se formula con un lípido catiónico de cK – E12:DOPE:Chol:PEG-DMG2K (cantidades relativas 50:25:20:5 (mg:mg:mg:mg)) para formar un complejo catiónico lípido-ADN apropiado para su entrega a un sujeto. Se utiliza el cK -E12 lípido catiónico (véase, por ejemplo, WO 2013/063468), y se combina con dioleoilfosfatidil-etanolamina o "DOPE", colesterol (chol), y polietilenglicol (PEG) o un lípido PEGilado (PEG-DMG2K) utilizando unos métodos de formulación descritos en las publicaciones de patentes internacionales WO 2010/053572 y WO 2012/170930, ambos de los cuales se incorporan por referencia en este documento.

Ejemplo 9 Corrección a largo plazo de una forma letal neonatal de deficiencia de OTC mediante múltiples tratamientos con vectores AAV de diferentes serotipos

En el presente estudio, el scAAV8.TBG.hOTCcoLW4 preparado como se describe en el Ejemplo 1, se utilizó para rescatar a los animales en un modelo de ratón neonatal de inicio (temprano) de OTCD. Ratones OTC KO se generaron a través de la delección de los exones 2-3, y las propiedades de este ratón caracterizado en términos de similitud a pacientes humanos con mutaciones nulas de OTC. En resumen, el modelo de modificación genética (KO) de OTC generado en nuestro laboratorio a través de la delección de los exones 2-3 imita la forma neonatal de inicio grave de OCTD en los seres humanos. Cachorros OTC KO neonatales machos han elevado los niveles de amoníaco en plasma debido a la ausencia de expresión de OTC en el hígado, y mueren inevitablemente dentro de las 24 horas después del nacimiento. Las mujeres heterocigotas que se reproducen normalmente, tienen niveles normales de amoníaco en plasma, actividad enzimática reducida de OTC de hígado, niveles elevados de ácido orótico en orina, y en algunos casos de menor peso corporal en comparación con sus compañeros de camada de tipo salvaje (WT). Una sola inyección del vector scAAV8-hOTCco preparado como se describe en el Ejemplo 1 a una dosis de $1-3 \times 10^{10}$ GC/cachorro inmediatamente después del nacimiento es capaz de rescatar a las crías OTC KO y extender la vida a 6 semanas. Para lograr corrección a largo plazo, un grupo de ratones OTC-KO de 4 semanas recibió una segunda administración del vector del vector scAAVrh10-hOTCco, que había sido preparado como se describe en el Ejemplo 1.

Más de 30 crías de OTC-KO recuperados por cesárea han sido rescatadas con éxito con la administración de genes. Las crías rescatadas tenían menor peso corporal que sus compañeros de camada normales y tenían un fenotipo transitorio de pelaje escaso y piel anormal. Con mayor importancia, sus niveles de amoníaco en plasma estaban en el rango normal. Sin embargo, la eficacia no puede mantenerse más allá de 6 semanas debido a la pérdida de genoma del vector durante la proliferación hepática rápida en la etapa neonatal. Una segunda administración del vector del vector scAAVrh10-hOTCco en ratones OTC-KO de 4 semanas, es capaz de extender aún más sus vidas hasta la edad adulta. Los ratones más viejos han llegado a los 18 meses de edad. A largo plazo, los ratones rescatados muestran niveles de amoníaco en plasma cercanos a los normales, aunque los niveles de ácido orótico en orina un subconjunto de estos ratones, fueron significativamente elevados. La tinción con rojo sirio en muestras de hígado de ratones heterocigotos de diferentes edades (6, 12, 18 meses) mostró fibrosis hepática en ratones OTC-KO hembra heterocigotos con una edad (18 meses), similar a una muestra de hígado de un paciente con OTCD de 11 años.

Ejemplo 10 - Tratamiento de la deficiencia de OTC (OTCD) de inicio tardío

Ratones OTC-KO heterocigotos de dos meses recibieron una sola inyección en la vena de la cola de un vector AAV8 auto-complementario que codifica un gen OTC humano con codones optimizados (SEQ ID NO: 5) a 1×10^{10} , 3×10^{10} y 1×10^{11} copias del genoma del vector por ratón. Una semana después del tratamiento con vector, los ratones de todos los grupos de dosis del vector tenían niveles normales de ácido orótico en orina que se mantuvieron durante todo el estudio (16 meses). Las muestras de hígado se recogieron de ratones tratados de 18 meses para análisis de patología y en comparación con los ratones heterocigotos no tratados de la misma edad y compañeros de camada WT. Todos los ratones tratados mostraron histología hepática normal similar a WT, en contraste con los animales heterocigotos no tratados que tenían fibrosis durante toda la vida. En conclusión, una única inyección de vector AAV8sc-hOTCco puede prevenir la fibrosis hepática en OTC-KO heterocigotos y tiene gran potencial para la corrección de la fibrosis hepática en pacientes con OTCD.

Vectores de terapia génica descritos en este documento son capaces de la expresión del gen rápida, robusta y prolongada incluso en ratones con una falta completa de OTC. Las hembras heterocigotas son capaces de reproducir y entregar descendencia masculina hemicigota, pero estas crías mueren en un día de vida si no se tratan. Los ratones hembras viejos heterocigóticos no tratados muestran un aumento de la fibrosis y esteatosis microvesicular, un hallazgo que parece similar al observado en los pacientes heterocigóticos humanos. Se ha desarrollado un régimen de transferencia de genes que es capaz de

rescatar a los machos afectados y los machos tratados han sobrevivido a lo largo de 72 semanas.

Por lo tanto, estos datos demuestran que la terapia génica específica del hígado con hOTC puede prevenir la fibrosis hepática. Estos datos se correlacionan con el tratamiento de seres humanos heterocigóticos con deficiencia de OTC, por ejemplo, sujetos que tienen inicio tardío de OTCD.

(Texto Libre Listado de Secuencias)

Se proporciona la siguiente información para secuencias que contienen texto libre en el identificador numérico <223>.

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre bajo <223>
3	hOTC modificada genéticamente
4	hOTC modificada genéticamente
5	hOTC modificada genéticamente
6	Plásmido pscAAVTBGhOTCLW
8	hOTC modificada genéticamente
9	hOTC modificada genéticamente
10	ARN de hOTC modificada genéticamente
11	ARN de hOTC modificada genéticamente
12	ARN de hOTC modificada genéticamente
13	ARN de hOTC modificada genéticamente
14	Cebador hacia adelante PCR
15	Cebador reverso PCR
16	Sonda

La prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/950,157, presentada el 9 de marzo de 2014, y todos los documentos publicados citados en esta especificación se incorporan en este documento por referencia. Del mismo modo, la SEQ ID NO que se hace referencia en este documento y que aparecen en el listado de secuencias adjunto se incorporan por referencia. Aunque la invención se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, Se apreciará que se pueden hacer modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención. Tales modificaciones están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.