

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fenilalanina hidroxilasa (PAH) variante opcionalmente un polipéptido de PAH humana, que comprende dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos, en donde las sustituciones de aminoácidos están en sitios seleccionados entre M180, K199, S250 y G256 de un polipéptido de PAH humana natural, opcionalmente en donde el polipéptido PAH humana natural comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:1.
2. El polipéptido de PAH variante de la reivindicación 1, en donde la sustitución de aminoácidos comprende
 - a) una o más de M180T, K199P, S250P y G256A,
 - b) K199P, S250P y G256A; M180T, S250P y G256A; M180T, K199P y G256A; o M180T, K199P y S250P, o
 - c) M180T, K199P, S250P y G256A.opcionalmente en donde el polipéptido de PAH variante además comprende H264P, G272A, G272P, P275L, P279Q, G272P y P275L, o las sustituciones de aminoácidos T323R y F327T, y/o el polipéptido PAH variante comprende una secuencia que es al menos aproximadamente 80% idéntico a o comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 3.
3. El polipéptido de PAH variante de una cualquiera de la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido de PAH variante comprende además una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre G33A, G46A, G46P, G103A, G139A, G139P, G148A, G188A, G218A, G239A, G247A, G257A, G272A, G289A, G307A, G312A, G332A, G337A, G344A, G352A, G442A, P9G, G10V, G12S, K184R, K192R, S196A, Y206H, H220R, Q336E, E360D, I374C, N376E, N401T, I421V, I441V, S446H, la adición de S en la posición 453, F240W, A246P, G247A, Y268W, C284F, T323R, F327Y, E319P, I306(Y,F), K113P, G188A, F191Y, T193R, Y206H, G337P y N376P de un polipéptido de PAH humana natural.
4. Un polipéptido de PAH variante, en donde el polipéptido de PAH variante comprende

a) una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre G33A, G46A, G46P, G103A, G139A, G139P, G148A, G188A, G218A, G239A, G247A, G257A, G272A, G289A, G307A, G312A, G332A, G337A, G344A, G352A y G442A de un polipéptido de PAH humana natural.

b) una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre P9G, G10V, G12S, K184R, K192R, S196A, Y206H, H220R, Q336E, E360D, I374C, N376E, N401T, I421V, I441V, S446H, y la adición de S en la posición 453 de un polipéptido de PAH humana natural, o

c) una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre F240W, A246P, G247A, Y268W, C284F, T323R, F327Y, E319P, I306(Y,F), K113P, G188A, F191Y, T193R, Y206H, G337P y N376P de un polipéptido de PAH humana natural, opcionalmente

en donde el polipéptido de PAH variante comprende uno o más de:

i) un truncamiento en el extremo N-terminal.

opcionalmente un truncamiento en el extremo N-terminal comprende un truncamiento del dominio regulador en el extremo N-terminal.

un y/o un truncamiento de los restos de aminoácidos 1-102 del polipéptido de PAH natural.

ii) un truncamiento en el extremo C-terminal.

opcionalmente un truncamiento del dominio de tetramerización.

y/o un truncamiento de los restos de aminoácidos 429-452 del polipéptido de PAH natural; y

iii) una secuencia de aminoácidos que corresponde a los restos de aminoácidos 103-428 del polipéptido de PAH natural.

5. El polipéptido de PAH variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el polipéptido de PAH variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos para eliminar los sitios potenciales de escisión de la proteasa.

6. El polipéptido de PAH variante de la reivindicación 5, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos para eliminar los sitios potenciales de escisión de la

proteasa se localizan en las posiciones 270-295 y/o 380-405 del polipéptido de PAH natural.

7. El polipéptido de PAH variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polipéptido de PAH variante se fusiona a un polipéptido de direccionamiento hepático, opcionalmente en donde el polipéptido de direccionamiento hepático es un HGF o fragmentos del mismo o glicoproteínas que se unen a un receptor de la asiaglicoproteína de hepatocitos.

8. El polipéptido de PAH variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el polipéptido de PAH variante está PEGilado y/o nitrosilado.

9. El polipéptido de PAH variante de la reivindicación 6, en donde el polipéptido PAH variante comprende una sustitución de aminoácido en I374C, en donde el resto cys en la posición 374 está nitrosilado.

10. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de PAH, en donde

a) el polipéptido de PAH es el polipéptido de PAH variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y/o

b) el polipéptido de PAH es un polipéptido de PAH humana y el ácido nucleico aislado, es codón optimizado, opcionalmente en donde el ácido nucleico es un ARNm, o el ácido nucleico que codifica el polipéptido de PAH está unido operativamente a un promotor; y el promotor opcionalmente se selecciona entre un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un LTR de VSR, un LTR de MoMLV, un promotor de la fosfoglicerato quinasa 1 (PGK), un promotor del virus 40 de simio (SV40), un promotor de CK6, un promotor de la trastirretina (TTR), un promotor de mTTR482, un promotor de mA1MB2-mTTR482, un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor del VHB, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, un promotor de LP1, un promotor específico de hígado (LSP) quimérico, un promotor de E2F, un promotor de la telomerasa (hTERT); un promotor potenciador del citomegalovirus/beta-actina de pollo/ β -globina de conejo (CAG), un alfa del factor de elongación 1 (EFl-alfa), un promotor de la β -glucuronidasa humana,

un promotor de la β -actina de pollo (CBA), un promotor de la β -actina de pollo (CBA) modificada o la SEQ ID NO:17, un promotor LTR retrovírico del virus del sarcoma de Rous (VSR), un promotor de la dihidrofolato reductasa y un promotor de la 13-actina.

11. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico además comprende uno o más de:

una señal de poliadenilación, opcionalmente una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, una señal de poliadenilación de SV40, o de PA TK del VHS;

un intrón, opcionalmente un intrón híbrido de la β -actina de pollo (CBA)/ β -globina de conejo, opcionalmente un intrón híbrido de la β -actina de pollo (CBA) modificada/ β -globina de conejo de SEQ ID NO:15;

uno o más ITRs, y

un ácido nucleico embutido, opcionalmente el ácido nucleico embutido está optimizado para eliminar secuencias de ATG, además opcionalmente el ácido nucleico embutido es una secuencia del intrón A1AT embutido de la SEQ ID NO:16.

12. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 10 o 11, en donde la secuencia de ácido nucleico es al menos un 80 % idéntica a o comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:14.

13. Una cassette de expresión para expresión un transgén en una célula de hígado, en donde el cassette de expresión comprende un transgen unido operativamente a:

a) un promotor que comprende un promotor (mTTR) transtiretina de ratón, opcionalmente el promotor mTTR es un promotor mTTR482; y

(i) un potenciador que comprende que comprende uno o dos potenciadores de protorombina modificada (pPrT2), uno o dos potenciadores de alfa1-microbikunina modificada (mA1MB2), un potenciador de albúmina de ratón modificado (mEalb), un potenciador II del virus de la hepatitis B (HE11) o un potenciador de CRM8, opcionalmente en donde el potenciador es 5' al promotor mTTR; y/o

(ii) un elemento 3', en donde el elemento 3' es un elemento 3' de albúmina (3'Alb) o un elemento 3' de albúmina unido a una región de unión a /matriz de alfa 1 antitripsina humana (SMAR) (3'AlbSMAR), opcionalmente en donde el elemento 3' se localiza 3' al transgén; y

opcionalmente en donde el transgén codifica un polipéptido de PAH o un polipéptido de PAH variante.

14. El cassette de la reivindicación 13, en donde el cassette de expresión además comprende:

un intrón, opcionalmente un intrón híbrido de β -actina de pollo/ β -globina de conejo;
y/o

una señal de poliadenilación, opcionalmente una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina.

15. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12 o el cassette de expresión de la reivindicación 13 o 14, opcionalmente, en donde el vector es un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV).

16. Un vector de rAAV que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12 o el cassette de expresión de la reivindicación 13 o 14 flanqueado por una o más secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) del AAV, opcionalmente en donde:

el ácido nucleico o el cassette de expresión está flanqueado por dos ITR de AAV, y/o el ITR de AAV son AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, un AAV de bovino o unas ITR con un serotipo de AAV de ratón.

17. El vector de rAAV de la reivindicación 16, en donde el vector de rAAV comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el rAAV comprende de 5' a 3'

una ITR de AAV2,

un promotor, opcionalmente

un promotor de m1A1MB2-mTTR482 o un promotor de LP1;

opcionalmente un intrón híbrido de la β -actina de pollo (CBA)/ β -globina de conejo;

un ácido nucleico que codifica el polipéptido de PAH, opcionalmente en donde el polipéptido de PAH es el polipéptido de PAH variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y/o en donde el ácido nucleico que codifica el polipéptido de PAH es el ácido nucleico optimizado por codones de la reivindicación 10 u 11;

un ácido nucleico embutido, opcionalmente el ácido nucleico embutido comprende ácido nucleico de un intrón del gen alfa de la antitripsina 1 humana, además opcionalmente en donde el intrón del gen de alfa 1 antitripsina humana se ha mutado para eliminar las secuencias ATG;.

una señal de poliadenilación opcionalmente una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina; y

un ITR de AAV2.

18. El vector de rAAV de una cualquiera de la reivindicación 16 o 17, en donde el vector es un vector autocomplementante, opcionalmente en donde el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de PAH y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del polipéptido de PAH, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar un par de bases intrahebra con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayor parte o la totalidad de su longitud,

además opcionalmente en donde la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico se unen mediante una ITR de AAV mutada, en donde la ITR de AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una mutación de la secuencia de resolución terminal.

19. Una partícula de rAAV que comprende el vector de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, opcionalmente en donde:

- a) la partícula vírica de rAAV comprende un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV2 V708K, AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV de bovino, AAV de ratón, o una cápsida del serotipo rAAV2/HBOV1; o
- b) la partícula viral de rAAV comprende una cápsida de AAV diseñada mediante ingeniería genética.

opcionalmente una cápsida DJ o una cápsida LK03.

20. Una composición que comprende el polipéptido de OAH variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, el cassette de expresión de la reivindicación 13 o 14, o la partícula de rAAV de la reivindicación 19, opcionalmente en donde la composición comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.

21. Una célula que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, el cassette de expresión de la reivindicación 13 o 14, o el vector de la modalidad 15, o el vector de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18.

22. Un método para producir un polipéptido de PAH variante, comprendiendo el método cultivar la célula de la reivindicación 21 en condiciones para producir el polipéptido de PAH variante.

opcionalmente en donde el método además comprende además la etapa de purificar el polipéptido de PAH variante.

23. Un método para tratar la fenilcetonuria en un individuo con necesidad de la misma o reducir el nivel de fenilalanina en la sangre de un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo el polipéptido de PAH variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, la expresión de cassette de la reivindicación 13 o 14, el vector de la reivindicación 15, el vectir de rAAV de cualquiera de las reivindicaciones 16-18, la partícula de rAAV de la reivindicación 19, la célula de la reivindicación 21, o la composición de la reivindicación 20, opcionalmente en donde el individuo carece de actividad PAH o en donde el nivel de fenilalanina en la sangre del individuo antes del tratamiento es elevado en comparación con el nivel de fenilalanina en la sangre de los individuos del control emparejados por iguales.

24. El método de la reivindicación 23, en donde el polipéptido de PAH variante, el ácido nucleico, el cassette de expresión, el vector, el vector de rAAV, la partícula de

rAAV, la composición o la célula se administran por vía intravenosa, intraarterial, intrahepática, intraportal, intraperitoneal o subcutánea, y/o en donde la administración se realiza junto con otra terapia, opcionalmente en donde la otra terapia es un tratamiento con tetrahidrobiopterina, tratamiento con fenilalanina amoniaco liasa (PAL) o PAL pegilada, o con una dieta restringida de fenilalanina.

25. Un kit que comprende el polipéptido de PAH variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, , el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, el cassette de expresión de la reivindicación 13 o 14, el vector de la reivindicación 15, el vector de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, la partícula de rAAV la reivindicación 19, o la composición de la reivindicación 20, opcionalmente en donde el kit comprende además instrucciones de uso; tampones y/o excipientes farmacéuticamente aceptables; y/o frascos, viales y/o jeringuillas.

.