

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 796**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05796011 .4**
96 Fecha de presentación: **09.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1804839**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**

54 Título: **Expresión mejorada de Factor IX en vectores de terapia génica**

30 Prioridad:
22.09.2004 US 612135 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.05.2012

73 Titular/es:
**ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL
332 N. LAUDERDALE ST., J. SCOTT ELMER,
MAIL STOP 742
MEMPHIS, TENNESSEE 38105, US**

72 Inventor/es:
GRAY, John Trainor

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 381 796 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Expresión mejorada de Factor IX en vectores de terapia génica

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de terapia génica en general y más específicamente al uso de vectores de terapia génica para administrar genes útiles en el tratamiento de hemofilia y trastornos de almacenamiento lisosomal.

10 **Antecedentes**

La hemofilia es un trastorno genético hemorrágico recesivo enlazado a X causado por una deficiencia de un factor de coagulación sanguíneo. Existen dos tipos básicos de hemofilia; hemofilia A y hemofilia B. La hemofilia A está causada por una deficiencia en el factor de coagulación sanguíneo conocido como Factor VIII y afecta a aproximadamente 17.000 personas en los Estados Unidos. La hemofilia B está causada por una deficiencia en el factor de coagulación sanguíneo conocido como Factor IX y afecta a aproximadamente uno de cada 34.500 hombres. Las presentaciones clínicas de ambas hemofilias se caracterizan por episodios de hemorragia espontánea y prolongada. Los pacientes con frecuencia sufren hemorragias articulares que conducen a artropatía incapacitante. El tratamiento actual se dirige a la detención de los episodios hemorrágicos con infusiones intravenosas de factores de coagulación obtenidos de plasma o, para hemofilia A, Factor VIII recombinante. Sin embargo, la terapia está limitada por la disponibilidad de factores de coagulación, sus semividas cortas *in vivo* y el coste elevado del tratamiento.

La terapia génica ofrece la promesa de un método nuevo para tratar hemofilia. Ambos tipos de hemofilia son candidatos teóricos excelentes para terapia génica ya que cada uno tiene una patología molecular razonablemente sencilla y se debería poder remediarse mediante la administración de un gen único. La terapia génica satisfactoria para hemofilia requiere niveles suficientemente elevados de expresión del factor deficiente para generar una respuesta terapéutica.

Varios grupos de investigadores han conducido investigación con vectores de terapia génica diseñados para expresar el Factor IX, pero no han sido capaces de conseguir una producción estable de niveles terapéuticos de estos factores en seres humanos. Recientemente, se han usado vectores autocomplementarios para aumentar la expresión génica heteróloga mediante el aumento de la eficacia de transducción. Véase la Patente de los Estados Unidos Pub. N° 2004/0029106, Wang, Z. *et al.*, "Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*", *Gene Therapy* 10: 2105-2111 (2003); McCarty, D. M. *et al.*, "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*", *Gene Therapy* 10: 2112-2118 (2003); McCarty, D. M. *et al.*, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy* 8: 1248-1254 (2001). Sin embargo, los casetes de expresión específica en hígado actualmente en uso en terapia génica de AAV superan la capacidad de estos vectores AAVsc. Véase Ziegler, R. J. *et al.*, "AAV2 vector harboring a titer-restricted promoter facilitates sustained expression of therapeutic levels of alpha-galactosidase and the induction of immune tolerance in Fabry mice", *Mol. Therap.* 9(2): 231-240 (Feb. 2004); Miao, C. H. *et al.*, "Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression *in vivo* but not *in vitro*", *Mol. Ther.* 1 (6): 522-32 (2000). El documento WO0198482 describe construcciones de expresión génica de Factor IX.

Por lo tanto sigue existiendo una necesidad de potenciar la producción de Factor IX humano *in vivo* usando vectores de terapia génica para conseguir niveles terapéuticamente eficaces.

50 **Sumario de la invención**

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones. La presente invención comprende un componente básico útil para mejorar la expresión del Factor IX en vectores de terapia génica.

Este componente es una región de control reguladora transcripcional útil para regular la expresión selectiva de genes incluyendo pero sin limitación Factor IX humano en células hepáticas. Esta región de control reguladora transcripcional consiste básicamente en una versión más pequeña de un potenciador específico de hígado conocido y un promotor conocido, los cuales ambos se han reducido de tamaño por el inventor a la vez que conservan su función. La secuencia de nucleótidos de esta región de control reguladora transcripcional se proporciona en SEC ID N°: 3, con los nucleótidos 1-192 representando la región potenciadora y los nucleótidos 193-447 que representan la región promotora. Estas regiones potenciadora y promotora se pueden usar por separado o en conjunto para regular la expresión de una secuencia de nucleótidos unida operativamente tal como un gen de interés o una molécula antisentido. Esta región de control reguladora transcripcional se puede usar en vectores con capacidad limitada de inserciones, tales como en vectores de terapia génica autocomplementarios. El uso de esta región en un vector autocomplementario permite que este tipo de vector se use para expresar Factor IX humano. Los casetes de expresión y los vectores de terapia génica que contienen este componente también se proporcionan.

Descripción de la lista de secuencias

SEC ID N°: 1 es la secuencia codificante de nucleótidos del Factor IX humano optimizado para expresión.

5 SEC ID N°: 2 es la secuencia de aminoácidos del Factor IX humano codificado por SEC ID N°: 1.

SEC ID N°: 3 es la secuencia de nucleótidos de la región reguladora útil para regular la expresión del Factor IX. Los nucleótidos 1-192 se obtienen a partir de una región de control hepática de Apolipoproteína E que actúa como un potenciador específico de hígado. Los nucleótidos 193-447 se obtienen a partir de una región promotora de alfa-1 antitripsina humana. Véase Miao, C. H. *et al.*, "Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression *in vivo* but not *in vitro*", *Mol. Ther.* 1 (6): 522-32 (2000).

10

Descripción de la Figura

15 **Figura 1. Estructura de vectores FIXh AAVr.** Los vectores descritos en el Ejemplo 1 se muestran esquemáticamente como los mismos se empaquetan en el virión, mostrando los vectores AAVsc como dímeros. AAVss-HCR-AATH-FIX que consiste en la región de control humana de apolipoproteína E/locus del gen C-I (HCR) y el promotor de $\alpha 1$ antitripsina humana (AATH), un intrón compuesto de β actina de pollo/ β globina de conejo (IVS), ADNc de FIX humano de 1,6 kb (FIXh) y una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGpA) flanqueada por las repeticiones terminales internas de AAV (ITR mostradas como un bucle de horquilla). El vector scAAV-LP1-hFIXco autocomplementario que contiene (i) el promotor LP1 que consiste en elementos de núcleo específicos de hígado a partir de HCR (pares de bases 134 a 442 del registro de Genbank HSU32510) y AATH (pares de bases 1747 a 2001 del registro de Genbank K02212) (ii) intrón de antígeno t pequeño de SV40 modificado (pares de bases 4644 a 4552, registro de Genbank J02400) (iii) FIXh optimizado con codón (hFIXco) y (iv) poliA tardío de SV40 (SV40 LpA, pares de bases 2600 a 2733 de GenBank J02400) y (v) un *trs* 3' suprimido (Δtrs). scAAV-LP1-hFIX contiene el ADNc de FIX humano de tipo silvestre a partir del cual se ha suprimido la región no traducida 3' ($\Delta hFIX$) en lugar de hFIXco. AAVss-LP1-hFIXcoS tiene ITR 5' y 3' intactas y además contiene 760 pb de secuencia de relleno no codificante a partir de la β -lactamasa (Δbla).

20

25

30

Descripción detallada de la invenciónDefiniciones:

35 "Potenciador" significa un polinucleótido que puede estimular la actividad promotora y de ese modo aumentar el nivel de expresión de un gen de interés unido operativamente, secuencia antisentido, etc. con relación al nivel de expresión que se produce en ausencia de potenciador. Los potenciadores pueden aumentar la expresión de secuencias unidas operativamente de una manera específica de tejido o temporal.

40 "Casete de expresión" significa un conjunto completo de secuencias de control incluyendo secuencias de inicio, promotoras y de terminación que funcionan en una célula cuando las mismas flanquean a una secuencia codificante en el marco de lectura apropiado. Los casetes de expresión frecuentemente y preferentemente contienen una variedad de sitios de restricción adecuados para escisión e inserción de cualquier secuencia codificante deseada.

45 "Gen de interés" significa cualquier secuencia codificante que se tiene que transcribir o transcribir y traducir dentro de un organismo hospedador. Un gen de interés de este tipo puede incluir, pero sin limitación, un gen que codifica una proteína farmacéuticamente activa, por ejemplo factores del crecimiento, reguladores del crecimiento, anticuerpos, antígenos, sus derivados útiles para inmunización o vacunación y similares. Tales proteínas incluyen, pero sin limitación, interleuquinas, insulina, G-CSF, GM-CSF, hPG-CSF, M-CSF o combinaciones de los mismos, interferones, por ejemplo, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-pi, factores de coagulación sanguíneos, por ejemplo, Factor VIII, Factor IX, o tPA o combinaciones de los mismos. Un gen de interés de este tipo puede también incluir, pero sin limitación una molécula de ADN antisentido u otro elemento de ADN que tiene por objeto transcribirse pero no traducirse.

50

55 "Terapia génica" significa transcripción o transcripción y traducción de ácido nucleico suministrado de forma exógena para prevenir, paliar y/o curar una enfermedad o enfermedades.

"Vector de terapia génica" significa un vector útil para terapia génica. Los vectores de terapia génica portan un gen de interés que es útil para terapia génica. Los vectores de terapia génica son capaces de transferirse a las células de un animal, por ejemplo, un ser humano y son capaces de expresar el gen de interés en tales células de forma de lograr la terapia génica. El vector puede ser, por ejemplo, cromosómico, no cromosómico o sintético. El mismo puede ser, por ejemplo, ARN o ADN. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, un virus o un fago. Los vectores preferidos incluyen, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores adenoasociados, vectores de herpes virus y vector de virus del Bosque de Semliki. Un vector retroviral preferido es el Virus de Célula Madre Murina (MSCV), que es una variante del Virus de Leucemia Murina de Moloney (MoMLV).

60

65

“Unido operativamente” significa que una secuencia de ADN que codifica un polipéptido y secuencia o secuencias reguladoras (por ejemplo, promotor, terminador, sitio de poliadenilación, etc.) está conectada de una forma que permite la expresión del ADN que codifica la secuencia controlada por la secuencia o secuencias reguladoras cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras transcripcionales) se unen a la secuencia o secuencias reguladoras.

“Promotor” significa una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción de un gen de interés unido operativamente, secuencia antisentido, etc. Los promotores proporcionan el reconocimiento de ARN polimerasa y otros factores transcripcionales necesarios para la transcripción eficaz.

“Gen recombinante” significa una combinación de una secuencia codificante de ADN y regiones reguladoras transcripcionales unidas operativamente que no están presentes de forma natural.

“Región reguladora transcripcional” significa una secuencia de ADN que induce o controla la transcripción de secuencias de nucleótidos, particularmente incluyendo secuencias codificantes de proteína, con las cuales la misma está unida operativamente.

Descripción de la invención:

La invención en su sentido más amplio se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona polinucleótidos que actúan como regiones de control reguladoras transcripcionales para nucleótidos unidos operativamente, particularmente incluyendo nucleótidos antisentido y secuencias codificantes de proteína. Las regiones de control reguladoras transcripcionales de la invención incluyen la secuencia contigua expuesta en SEC ID N°: 3 así como también nucleótidos 1 -192 de SEC ID N°: 3 y nucleótidos 193-447 de SEC ID N°: 3.

Los nucleótidos 1 -192 de SEC ID N°: 3 se obtienen a partir de una región de control hepática de la apolipoproteína E de 320 nucleótidos que se conoce que actúa como un potenciador específico de hígado. Véase Miao, C. H. *et al.*, "Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression *in vivo* but not *in vitro*", *Mol. Ther.* 1 (6): 522-32 (2000). Este polinucleótido 192 de la invención puede potenciar expresión específica de hígado de un polinucleótido unido operativamente de la misma manera que la región de control hepática de Apolipoproteína E del polinucleótido 320 más grande. Este aspecto de la invención incluye una región de control reguladora transcripcional aislada que consiste en los nucleótidos 1-192 de SEC ID N°: 3 así como también casetes de expresión y vectores que tienen una región potenciadora específica de hígado que consiste básicamente en los nucleótidos 1 -192 de SEC ID N°: 3.

Los nucleótidos 193-447 de SEC ID N°: 3 se obtienen a partir de un promotor de alfa-1 antitripsina humana de 408 nucleótidos. Véase Miao, C. B. *et al.*, *Id.* Este polinucleótido 255 de la invención puede promover la expresión de un polinucleótido unido operativamente de la misma manera que el promotor de alfa-1 antitripsina humano de polinucleótido 408 más grande. Este aspecto de la invención incluye una región de control reguladora transcripcional aislada que consiste en los nucleótidos 193-447 de SEC ID N°: 3 así como también casetes de expresión y vectores que tienen una región promotora que consiste básicamente en los nucleótidos 193-447 de SEC ID N°: 3.

SEC ID N°: 3 representa una fusión del potenciador específico de hígado obtenido a partir de la región de control hepática de apolipoproteína E y el promotor obtenido a partir del promotor de alfa-1-antitripsina humana. Esta región de control reguladora transcripcional de potenciador-promotor fusionada de la invención es significativamente más pequeña que la fusión de la región de control hepática de apolipoproteína E y el promotor de alfa-1 antitripsina humano divulgado en Miao, C. H. *et al.*, *Id.*

Las regiones de control reguladoras transcripcionales de la invención se pueden usar para regular la expresión de cualquier nucleótido o gen de interés unido operativamente en una célula de mamífero, preferentemente en una célula humana. Éste incluye cualquier gen de interés para el cual se desea la expresión específica de hígado tal como Factor IX humano, Factor VIII humano y genes asociados con trastornos de almacenamiento lisosomal [Véase la Tabla 1 de la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0077292] tal como proteína protectora/catepsina A (PPCA), α -galactosidasa, α -glucosidasa, etc. Las regiones de control reguladoras transcripcionales de la invención se pueden combinar con otras regiones de control reguladoras en un casete de expresión para conseguir un patrón deseado y un nivel de expresión de un gen de interés unido operativamente.

Ya que esta región reguladora es más pequeña que los elementos conocidos usados para conseguir el mismo patrón y nivel de expresión, la misma se puede usar en lugar de tales elementos en aquellas situaciones en las que se imponen limitaciones de tamaño. Por ejemplo vectores adenoasociados autocomplementarios (AAVsc), que se pueden usar para conseguir expresión más elevada de los genes heterólogos que los mismos contienen en el contexto de terapia génica, pueden únicamente alojar genes recombinantes o casetes de expresión de un tamaño limitado de aproximadamente 2,5 kb. Mediante el uso de la región reguladora de la invención en el casete de expresión, las secuencias codificantes más grandes se pueden alojar en el AAVsc. En particular, la región

reguladora de la invención es lo suficientemente pequeña para permitir la expresión del Factor IX humano a partir de un AAVsc (véase el Ejemplo 1).

Ejemplos

5 **Ejemplo 1: Vectores de virus adenoasociado autocomplementarios que contienen un casete de expresión de factor IX humano específico de hígado novedosos posibilitan la transducción altamente eficaz de hígado murino y de primate no humano.**

10 Sumario

La transducción con vectores de virus adenoasociados recombinantes (AAV) está limitada por la necesidad de convertir su genoma monocatenario (ss) en formas bicatenarias transcripcionalmente activas (ds). Para terapia génica de hemofilia B (HB) mediada por AAV, hemos superado este obstáculo construyendo un mini casete de expresión de factor IX humano limitado a hígado (FIXh) que se puede empaquetar como dímeros complementarios dentro de partículas de AAV individuales. Estos genomas autocomplementarios (sc) se hibridan rápidamente después de eliminar el recubrimiento para formar moléculas lineales ds (bicatenarias) estables y activas. Esta propiedad única dio como resultado una mejora de 20 veces en la expresión de FIXh en ratones con respecto a AAVss comparable. La administración de únicamente 1×10^{10} partículas AAVsc conduce a la expresión de FIXh biológicamente activo a niveles suprafisiológicos (8 UI/ml) y corrección de la diátesis hemorrágica en ratones HB. De forma importante, niveles terapéuticos de FIX (del 3-30% de lo normal) se consiguieron en primates no humanos usando una dosis significativamente menor de AAVsc que la necesaria con AAVss, incluso en macacos con inmunidad preexistente a AAV. Por lo tanto, este vector novedoso representa un avance importante para la terapia génica de HB.

25 Introducción

El hígado es una diana importante para terapia génica de una diversidad de trastornos genéticos, uno de los cuales es HB, un trastorno hemorrágico con peligro para la vida que surge a partir de mutaciones en el gen del factor IX de coagulación sanguínea (FIX). Mediante el mantenimiento de los niveles de FIX en plasma por encima del 1% de lo normal ($>0,05 \mu\text{g/ml}$) la frecuencia de hemorragia espontánea se reduce de forma espectacular y por lo tanto el punto final terapéutico de la terapia génica de HB es modesto (Nathwani. A. C. & Tuddenham. E. G., "Epidemiology of coagulation disorders", Baillieres Clin. Haematol. 5: 383-439 (1992)). Actualmente, los vectores de virus adenoasociado (AAV) son los más prometedores para terapia génica de HB y han sido el centro de dos ensayos clínicos recientes (Nathwani. A. C. *et al.*, "Prospects for gene therapy of haemophilia", Haemophilia. 10: 309-318 (2004)).

Sin embargo la transducción eficaz con AAV está limitada por la necesidad de convertir su genoma monocatenario (ss) en formas bicatenarias (ds) transcripcionalmente activas en células diana debido a su dependencia de la síntesis de ADN mediada por célula hospedadora de la cadena anterior (Fisher. K. J. *et al.*, "Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis", J. Virol. 70: 520-532 (1996)) o hibridación de genomas complementarios obtenidos a partir de viriones separados (Nakai. H. *et al.*, "Annealing of complementary single stranded genomes and subsequent intermolecular joining is the mechanism of stable *in vivo* liver transduction by recombinant adeno-associated virus vectors", Mol. Tfer. 1 [5]: S125-S126 (2000)(Resumen)). La coinfección con adenovirus (Weitzman. M. D. *et al.*, "Recruitment of wild-type and recombinant adeno-associated virus into adenovirus replication centers" J. Virol. 70: 1845-1854 (1996)) o la sensibilización de tejidos diana con agentes genotóxicos (Alexander, I. E. *et al.*, "DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors", J. Virol. 68: 8282-8287 (1994); Mah. C. *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in Transgene expression", J. Virol. 72: 9835-9843 (1998)) puede potenciar la formación de transgén ds pero la utilidad clínica de estos enfoques está limitada por la toxicidad potencial.

La eliminación rápida del recubrimiento del genoma viral, como se ha descrito recientemente con vectores de AAV8, permite la hibridación eficaz del provirus de AAVss para formar genomas bicatenarios. Esta propiedad biológica única es responsable de la transducción elevada en más de 10-100 veces del hígado con rAAV8 en comparación con vectores AAV2 en modelos murinos (Davidoff. A. M. *et al.* Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5 and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. Mol. Ther. 11(6): 875-888 (2005); Gao. G. P. *et al.*, "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99: 11854-11859 (2002); Thomas, C. E. *et al.*, "Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors", J. Virol. 78: 3110-3122 (2004)). Sin embargo, casi 10^{13} partículas de vector de AAV8 son necesarias para conseguir el 100% de transducción de hepatocitos en ratones, un nivel que es necesario para terapia génica satisfactoria de algunos trastornos metabólicos del hígado (Nakai. H. *et al.*, "Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice", J. Virol. 79: 214-224 (2005)).

65

Esta dosis de vector elevada es problemática debido a que la misma puede: 1) causar toxicidad hepatocelular en seres humanos según se ha observado en el estudio de Fase I/III concluido recientemente (High. K. *et al.*, "Human Immune Responses to AAV-2 Capsid May Limit Duration of Expression in Liver-Directed Gene Transfer in Humans with Hemophilia B", *Blood* 104:121a(2004; Resumen)), 2) da como resultado una distribución de tejido más amplia del vector (Nathwani. A. C. *et al.*, "Factors influencing in-vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA", *Blood* 97: 1258-1265 (2001)), 3) provoca inmunidad anticápside más fuerte debido a la carga viral grande y 4) pone una carga tremenda sobre la producción de vector. Por lo tanto, se necesitan estrategias novedosas que puedan potenciar la eficacia de transducción hepática más allá de lo conseguido con vectores de rAAV8, permitiendo de este modo el uso de dosis de vector más bajas para conseguir puntos finales terapéuticos.

La capacidad de empaquetar ADN proviral bicatenario en partículas de AAV individuales ofrece una oportunidad de este tipo y esto superaría una limitación principal de este sistema de vector. Varios grupos han demostrado, usando pequeños genes informadores tales como fosfatasa alcalina o proteína fluorescente verde, que provirus en replicación que tienen la mitad del tamaño del genoma de tipo silvestre se empaquetan de forma natural como dos cadenas complementarias dentro de una partícula de AAV única (McCarty, D. M. *et al.*, "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*", *Gene Ther.* 10: 2112-2118 (2003); Wang. Z. *et al.*, "Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*", *Gene Ther.* 10: 2105-2111 (2003); Hirata. R. K. & Russell, D. W., "Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors", *J. Virol.* 74: 4612-4620 (2000); Yang, G. S. *et al.*, "Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size", *J. Virol.* 76:7651-7660 (2002)). Esto potencia la eficacia con la cual se forman las moléculas ds transcripcionalmente activas y ha demostrado aumentar la eficacia de transducción de hepatocitos, músculo y retina en 10-100 veces.

Sin embargo los vectores de AAVsc permanecen en su mayoría no ensayados en modelos animales exogámicos grandes con respecto a la eficacia y la toxicidad. Adicionalmente, su capacidad de empaquetamiento más pequeña (~2,5 kb) han limitado su uso para terapia génica clínica a pesar de esfuerzos recientes para mejorar la eficacia con lo cual el genoma de AAV se empaqueta como dímeros (McCarty. D. M. *et al.*, Wang. Z. *et al.*, mencionado más adelante).

Usando la terapia génica de hemofilia B como un modelo, hemos superado este obstáculo construyendo un minicasete de expresión de FIXh novedoso en una estructura de vector de AAV2 modificada que se puede empaquetar eficazmente como un dímero cola a cola en vectores AAVsc. Estos vectores cuando se evaluaron críticamente en un modelo murino de HB y en primates no humanos exogámicos grandes demostraron una potencia significativamente más elevada que sus homólogos monocatenarios. De hecho, la expresión de FIXh a niveles terapéuticos se observó en primates no humanos usando dosis de vectores que demostraban ser subterapéuticas en el estudio de Fase I/II conducido recientemente de vectores AAV2 en pacientes con HB severa (High. K. *et al.* mencionado más adelante). Por lo tanto los vectores de AAVsc proporcionan un enfoque prometedor para terapia génica de HB y otros trastornos que afectan el hígado.

Resultados

Construcción y caracterización de minicassetes de expresión de FIXh

El casete de expresión limitado a hígado AAVss-HCR-AATH-hFIX de 4123 pb descrito previamente se modificó (Figura 1) para crear un casete de expresión de FIXh más compacto (2,1 kb) (scAAV-LP1-hFIXco) que satisfacía los requerimientos de empaquetamiento de AAVsc, a la vez que mantenía la expresión limitada a hígado (Miao. C. H. *et al.*, "Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression *in vivo* but not *in vitro*", *Mol. Ther.* 1: 522-532 (2000); Davidoff. A. M. *et al.*, "Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock", *Journal of Virological Methods* 121 [2]: 209-215 (2004)). Las modificaciones incluían supresiones dirigidas a partir de los elementos de HCR y AATH en base a análisis de sitios de unión de factor de transcripción de hígado (Transfac, www.gene-regulation.com), cambiando a secuencias intrónicas y de poliadenilación de SV40 más pequeñas y supresión de las secuencias no traducidas 3' de FIX (UTR 3') como mutaciones en esta región no se han descrito en pacientes con HB (Green, P. M. *et al.*, "Mutation rates in humans. I. Overall and sex-specific rates obtained from a population study of hemophilia B" *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1572-1579 (1999)). Adicionalmente, la secuencia codificante de FIXh se modificó usando un subconjunto de codones encontrados con mayor frecuencia en genes eucariotas expresados de forma elevada ("optimización de codón") y después se ajustaron para reducir el potencial de corte y empalme inapropiado y la metilación de CpG para aumentar la expresión transgénica. Se preparó una segunda construcción en la cual se usó la secuencia codificante de FIXh de tipo silvestre sin la UTR 3' (scAAV-LP1-hFIX).

En ambos de estos vectores el sitio de resolución terminal cadena abajo (*trs*) se suprimió para potenciar la formación de dímeros autocomplementarios cola a cola (Wang. Z. *et al.* mencionado más adelante.). Para comparación, se preparó un vector monocatenario casi idéntico (AAVss-LP1-hFIXcoS) en el cual ambos *trs* estaban intactos. Este

vector contenía, adicionalmente, 760 pb de secuencia de relleno no codificante en el extremo 3' superando de ese modo el límite de empaquetamiento para AAVsc. De forma importante, la capacidad de estas nuevas construcciones para activar la expresión de FIXh a partir de células HuH7 transfectadas fue similar a la del plásmido de vector parental, AAV-HCR-AATH-hFIX. Adicionalmente, la producción de vectores de AAVsc, cuando se seudotipificaba con proteína de cápside de serotipo 5 u 8, estaba en el intervalo de $1-3 \times 10^4$ partículas/célula, lo cual es comparable a sus homólogos monocatenarios, confirmando de ese modo que la supresión de un *trs* único no compromete la replicación o el empaquetamiento viral (Wang, Z. *et al.* mencionado más adelante. Samulski, R. J. *et al.*, "Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV", Cell 33: 135-143 (1983)). La electroforesis en gel de agarosa alcalina confirmó que el genoma de scAAV2/8-LP1-hFIXco se empaquetaba de forma consistente como un dímero de ~4,6 kb mientras que ssAAV2/8-LP1-hFIXcoS y ssAAV2/8-HCR-AATH-hFIX se empaquetaban predominantemente como genomas ss.

Los vectores de AAVsc median sustancialmente transducción más elevada del hígado murino

Para establecer la relación entre eficacia de transducción y dosis de vector, se administraron diferentes dosis de los vectores scAAV2/8-LP1-hFIXco o ssAAV2/8-HCR-AATH-hFIX a través de la vena de la cola a ratones macho C57B1/6 y los niveles de FIXh en plasma se evaluaron a las 6 semanas. Se observó un perfil relativamente lineal de dosis de vector-expresión de transgén con ambos tipos de vectores sin evidencia de cinética de saturación a las dosis examinadas. Esto es coherente con informes previos con vectores de serotipo 8 monocatenarios (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005); Nakai, H. *et al.*, 2005 mencionado más adelante). A todas las dosis de vector evaluadas, los niveles de FIXh de estado continuo eran consistentemente más elevados para scAAV2/8-LP1-hFIXco en aproximadamente 20 veces por encima de sus homólogos monocatenarios. Cuando se inyectaron 1×10^{11} partículas de vector scAAV2/8-LP1 hFIXco en la vena de la cola de ratones, se observaron niveles suprafisiológicos de FIXh ($151 \pm 43 \mu\text{g/ml}$), en comparación con $5 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ con una dosis equivalente de ssAAV2/8-HCR-AATH-hFIX.

A continuación se comparó la eficacia de transducción del presente AAVsc con AAV-hF.1X16, el vector monocatenario que se usó en el ensayo clínico reciente (High, K. *et al.*, "Immune response to AAV and to factor IX in a Phase I study of AAV-mediated liver directed gene transfer for hemophilia B", Mol. Ther. 9: S383-S384 (2004)(Resumen)). Este vector, que además del complejo regulador HCR-AATH también contiene una región de 1,4 kb a partir del primer intrón del gen de FIXh y ha demostrado mediar niveles elevados de FIXh en modelos animales después de administración dirigida a hígado (High, K. *et al.*, Blood, mencionado más adelante; McCarty, D. M. *et al.*, mencionado más adelante.; High, K. *et al.* Mol. Ther., mencionado más adelante). En nuestra comparación directa, la expresión de FIXh de estado continuo después de la administración en la vena de la cola de $2,5 \times 10^{10}$ partículas de AAV-hF.1X16 seudotipificado de serotipo 8 fue $10 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ que es 3 veces más baja que la conseguida con una dosis equivalente de scAAV2/8-LP1-hFIXco ($29 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ $P < 0,001$ mediante ensayo t de Student). Por lo tanto, a pesar de la ingeniería sustancial y la reducción de tamaño, nuestro vector scAAV-FIX parece ofrecer una ventaja con respecto al vector AAVss-FIX más optimizado en ratones.

La tinción inmunohistoquímica de hígado murino después de la administración en la vena de la cola de 1×10^{11} scAAV2/8-LP1-hFIXco mostró expresión de FIXh en el 25% de los hepatocitos el día 7 la cual aumentó hasta por encima del 90% en 6 semanas. Esto es sustancialmente superior que lo observado con una dosis equivalente de vector ssAAV2/8 (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005); Nakai, H. *et al.*, 2005 mencionado más adelante). La administración en la vena de la cola de 1×10^{11} partículas de scAAV-LP1-hFIXco seudotipificado con cápside de serotipo 5 dio como resultado niveles de FIXh pico de $8,3 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ en ratones macho C57B1/6, lo cual es aproximadamente 2 logs mayor que lo que se ha informado previamente para vectores ssAAV2/5-HCR-AATH-hFIX (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005)), pero ~20 veces menor que los niveles conseguidos con una dosis equivalente de vectores scAAV2/8. Se han observado diferencias similares previamente con vectores de AAVss indicando por tanto que las proteínas de la cápside y la conformación no genómica son principalmente responsables de la transducción inferior observada con vectores AAV5 en modelos murinos (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005)).

El perfil de expresión transgénica se evaluó a continuación después de la administración en la vena de la cola de 2×10^9 genomas de vector (gv), una dosis por debajo del umbral de transducción para los vectores ssAAV2 (Nathwani, A. C. *et al.*, "Factors influencing in-vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA", Blood 97: 1258-1265 (2001); Nakai, H. *et al.*, "A limited number of transducible hepatocytes restricts a wide-range linear vector dose response in recombinant adeno-associated virus-mediated liver transduction", J. Virol. 76: 11343-11349 (2002)). De forma sorprendente, no hubo diferencia en la cinética de expresión entre vectores que contenían los genomas ssAAV2/8 (HCR-h AAT-h FIX y LP1 -h FIXcoS) o scAAV2/8 (LP1 -hFIXco y LP1 -hFIX), detectándose FIXh dentro de una semana pero alcanzando los niveles pico después de una fase de latencia de 4 semanas. A partir de entonces continuó un descenso en la expresión transgénica en las 4 cohortes de entre el 40-70% a lo largo de un periodo de 20 semanas antes de la estabilización, similar a lo que se había observado previamente con los vectores ssAAV2/8 (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005); Nakai, H. *et al.*, 2005 mencionado más adelante). Los niveles pico de FIX en ratones transducidos con ssAAV2/8-HCR-AATH-hFIX fueron $0,052 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$, consistentes con nuestro informe anterior (Davidoff, A. M. *et al.*

mencionado más adelante. (2005)). Se consiguieron niveles similares de FIXh ($0,076 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) en la cohorte de scAAV2/8-LP1-hFIXcoS. Por el contrario, la administración en la vena de la cola de 2×10^9 partículas de vector scAAV2/8-LP1-hFIXco dio como resultado la expresión de FIXh a casi el 100% de los niveles fisiológicos ($3,2 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$). Esta diferencia en la expresión transgénica entre AAVsc monocatenario y bicatenario fue altamente significativa ($p < 0,001$, mediante análisis de ANOVA de una vía). La expresión de FIXh en la cohorte de scAAV2/8-LP1-hFIX fue cuatro veces menor ($0,77 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$). El número de copias transgénicas en el hígado de animales seleccionados a partir de las cohortes de scAAV2/8-LP1-hFIXco y scAAV2/8-LP1-hFIX fue similar (7,3 y 6,2 copias por genoma diploide [c/dg] respectivamente) indicando que la expresión del gen de FIXh en ratones parece estar influenciada por el uso de codón, cuando se elimina su UTR 3'.

Para confirmar la corrección del fenotipo con este vector, se inyectaron 1×10^{10} (cohorte de dosis baja, $n=6$) o 5×10^{10} (cohorte de dosis alta, $n=4$) scAAV2/8 LP1-hFIXco en la vena de la cola de 129/sv ratones HB que tienen una supresión grande dentro del exón 8 del gen de FIX murino (Wang, L *et al.*, "A factor IX-deficient mouse model for hemophilia B gene therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94: 11563-11566 (1997)). Los niveles de FIXh:C pico determinados mediante un ensayo de coagulación de una etapa fueron $8 \pm 0,7$ y 27 ± 6 UI/ml en las cohortes de dosis baja y alta respectivamente, significativamente superiores a los niveles de FIXh:C de fondo ($0,03$ UI/ml) en ratones hemofílicos no tratados. Hubo concordancia completa entre los niveles de FIXh:C y antígeno de FIXh y ambas cohortes de ratones en todos los puntos de tiempo examinados. Los niveles en plasma humano normales de FIX:C se definen como 1 UI/ml. De forma importante los 6 ratones HB no tratados requirieron cauterización de la herida después de punción en la vena de la cola para conseguir hemostasis mientras que esto no fue necesario en los ratones tratados con AAVsc. De forma importante, los niveles de complejos trombina-antitrombina en plasma ($2,2 \pm 0,2 \mu\text{g/l}$) no estaban elevados, indicando que los niveles suprafisiológicos de FIXh biológicamente activo no inducen un estado hipercoagulable observable en ratones HB. Finalmente, no se detectaron anticuerpos anti-FIXh en los ratones HB tratados con AAVsc en ninguna etapa después de la transferencia génica.

Configuración molecular y biodistribución del vector de AAVsc

El análisis de transferencia de Southern de ADN Hirt extraído a partir del hígado 1 y 42 días después de la administración en la vena de la cola de 1×10^{11} viriones se realizó para comprender los mecanismos para la potencia más elevada de los vectores AAVsc. A las 24 horas, la mayoría del genoma scAAV2/8-LP1-FIXco estuvo presente como un monómero lineal de 2,1 kbp bicatenario, según se confirmó mediante digestión con *Pst* I la cual corta ~500 pb desde el Δ ITR3' para liberar un producto de 1,8 kbp. Incluso en este punto de tiempo temprano, aparte de círculos superenrollados, se observó una serie de formas moleculares más grandes incluyendo concatémicos de peso molecular elevado (HMWC~5%). A los 42 días, las formas circulares superenrolladas y concatémicas predominaron. La digestión con *Pst* I generó tamaño de fragmento de concatémico tanto cabeza-a-cabeza como cabeza-a-cola en una proporción de 3:1 respectivamente. Las formas circulares, según se esperaba, fueron resistentes a la digestión con ADNasa segura para plásmido.

Para distinguir entre expresión transgénica de vector integrado y extracromosómico se indujo regeneración hepatocelular realizando una hepatectomía de dos tercios en ratones HB 16 semanas después de la administración de 1×10^{10} scAAV2/8-LP1-hFIXco. Aunque la hemostasis se consiguió fácilmente, hubo un descenso sostenido (~90%) en los niveles de FIXh:C los cuales no se recuperaron a pesar de la restauración completa de la masa de células hepáticas a las 4 semanas de la cirugía. Además, también se observó un descenso concomitante en el número de copias de vector (~86%) después de la hepatectomía indicando que los genomas extracromosómicos y no integrados de AAVsc son principalmente responsables de la expresión transgénica.

Finalmente usando un ensayo de PCR semicuantitativa los genomas de AAVsc se pudieron detectar en todos los tejidos examinados 6 semanas después de la administración en la vena de la cola de scAAV2/8-LP1-hFIXco, con niveles desproporcionadamente más elevados del transgén en el hígado, como se había informado previamente (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005); Nakai, H. *et al.*, 2005 mencionado más adelante). Sin embargo la expresión de ARNm de FIXh únicamente se detectó en el hígado mediante análisis de RT-PCR. La especificidad del elemento regulador LP1 se evaluó adicionalmente mediante inyección intramuscular directa de 3×10^{10} scAAV2/8-LP1-hFIXco. A pesar de la transducción eficaz, el ARNm de FIXh estuvo ausente mediante análisis de RT-PCR del músculo esquelético sugiriendo que el elemento regulador LP1 no es eficaz para dirigir la expresión transgénica en tejidos murinos no hepáticos.

Administración dirigida a hígado de dosis más bajas de AAVsc median la expresión de FIXh a niveles terapéuticos en primates no humanos

En base a extrapolación a partir de estudios murinos, se ha efectuado previamente la transducción eficaz del hígado de macaco con una dosis convencional de 4×10^{12} de vector AAVss/kg pseudotipificado con cápside de serotipo 2, 5 u 8 (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005); Nathwani, A. C. *et al.*, "Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques", Blood 100: 1662-1669 (2002)). Una dosis similar de AAV-hFIX16 mediaba la expresión transitoria de FIXh a continuación de administración dirigida a hígado de vector de serotipo 2 en pacientes con HB

severa (High. K. *et al.*, Mol.Ther. mencionado más adelante). Dosis más bajas de AAV2ss (2×10^{11} ó 1×10^{12} vg/kg) fueron ineficaces en seres humanos y generaron expresión consistente en animales (Davidoff. A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005); High. K. *et al.*, Mol. Ther. Mencionado más adelante.; Nathwani. A. C. *et al.*, *id.*).

5 La potencia más elevada de AAVsc en ratones incitó la evaluación de dos dosis más bajas de scAAV2/8-LP1 -hFIXco en macacos. El primer grupo de macacos (M1-sc y M2-sc) recibió 1×10^{12} vp/kg de vector que se administró mediante infusión en la vena mesentérica. scAAV2/8-LP1 -hFIXco se toleró bien sin alteración de los niveles de interleuquina 6 en suero (< 3 pg/ml) o transaminasas hepáticas (alanina aminotransferasa < 65 U/l) a lo largo de un periodo de 6 semanas después de la transferencia génica. A las 24 horas de la administración de vector, FIXh era detectable a 0,25 y 1,2 μ g/ml y continuó elevándose a lo largo de un periodo de 2 semanas antes de alcanzar valores pico de aproximadamente el 12% y el 30% de los fisiológicos en M1-sc y M2-sc respectivamente. En M1-sc, estos niveles se mantuvieron de forma estable durante 9 semanas antes de anularse mediante anticuerpos anti-FIXh cuyo título aumentó rápidamente a lo largo de un periodo de 4 semanas para alcanzar un nivel estable de 15 BIAU/ml. La exploración de coagulación en este animal fue normal lo cual era consistente con la dirección selectiva de FIXh y no su afín de rhesus mediante este anticuerpo. Los estudios de cartografía de epítipo detallada demostraron reactividad específica con el dominio de serina proteasa en la hendidura de unión a sustrato de la proteína de FIXh, una región que porta 6 de las 12 diferencias de aminoácidos entre FIXh y su afín de rhesus. El tratamiento con Rituximab y ciclosporina oral diariamente se comenzó para erradicar el anticuerpo anti-FIXh neutralizante. 4 semanas después del inicio de este régimen el inhibidor se volvió indetectable y FIXh fue una vez más detectable en plasma a los niveles pico previos de $0,8 \pm 0,1$ μ g/ml.

25 Dos macacos adicionales (M3-sc y M4-sc) recibieron 4×10^{11} p/kg de scAAV2/8-LP1 -hFIXco, que representa una reducción log de nuestra dosis convencional. Los niveles de FIXh de estado continuo de 0,19 μ g/ml (el 3,75% de lo normal) se consiguieron a las 2 semanas de la administración dirigida al hígado de vector en M3-sc. La expresión transgénica en este animal se ha mantenido de forma estable durante la duración del estudio (>6 meses). El segundo macaco en este grupo (M4-sc) tenía un título de anticuerpo anti-AAV8 bajo, pero detectable preexistente (3,4 en comparación con un intervalo de 0,6-1,0 unidades relativas respectivamente en M1, M2 y M3-sc). Este macaco no se transduce de forma satisfactoria después de la administración dirigida a hígado de 4×10^{11} vg/kg, sugiriendo que incluso niveles modestos de inmunidad preexistentes eran suficientes para bloquear la transducción satisfactoria del hígado. Sin embargo, el cambio de proteínas de cápside dio como resultado transducción satisfactoria en este animal cuando se expuso a 1×10^{12} vg/kg de scAAV2/5-LP1-hFIXco, a pesar de títulos elevados de anticuerpos anti-AAV8 (>27 unidades relativas) en el momento de la administración del vector. La cinética de expresión de FIXh fue idéntica a la observada en M1 y 2sc a los que se proporcionó scAAV-2/8 con un aumento rápido en la expresión hasta niveles pico del 20% de lo normal 2 semanas después de la administración del vector. Esto contrasta con el hallazgo en ratones en el que ssAAV2/5 era 20 veces menos activo que scAAV2/8.

40 El número de copias de transgenes en hígado de rhesus 1 mes después de la administración dirigida a hígado de 1×10^{12} vg/kg de scAAV2/8-LP1-hFIXco o scAAV2/5-LP1-hFIXco fue de 61 y 49 c/dg respectivamente. Esto se compara de forma favorable con nuestra experiencia previa en macacos a los que se proporcionó una dosis cuatro veces más elevada (4×10^{12} vg/kg) de AAVssr donde el número de copias de transgén variaba entre 2-40 c/dg (Davidoff. AM. *et al.* mencionado más adelante. (2005); Nathwani. A. C. *et al.*, "Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver- targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques", Blood 100: 1662-1669(2002)). En M3-sc que se transdujo con 4×10^{11} vg/kg de scAAV2/8-LP1-hFIXco el número de copias de transgén en el hígado fue 34 c/dg en M3-sc a un mes pero después declinó hasta 16 c/dg en 6 meses. Sin embargo la expresión de FIXh se mantuvo de forma estable al 2-3% de lo normal a lo largo de este periodo mostrando una vez más la discordancia entre la expresión transgénica y el número de copias informado por nosotros anteriormente (Davidoff. A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005); Nathwani, A. C. *et al.*, *id.*). El análisis de PCR semicuantitativa demostró la presencia del provirus en todos los tejidos examinados incluyendo el testículo, aunque no existía una relación clara entre desbordamiento de vector y dosis de vector fuera del hígado y el bazo. El análisis adicional de la distribución de genoma de vector a los 6 meses reveló una disminución sustancial en el número de copias en todos los tejidos no hepáticos incluyendo el testículo en M3-sc implicando que no hay transducción en células germinales. El análisis de RT-PCR reveló la presencia de la ARNm de FIXh únicamente en el hígado confirmando nuevamente la fidelidad del casete de expresión.

55 **Análisis**

En este estudio informamos el diseño y la evaluación sistemática de un mini-casete de expresión de FIXh novedoso que se empaqueta de forma eficaz como dímeros autocomplementarios en un virión de AAV único. Estos vectores novedosos han demostrado ser seguros y altamente potentes tanto en modelos murinos como de primates no humanos, resaltando la importancia de la configuración de genoma viral para mediar la transducción eficaz del hígado. En ratones, el vector de AAVsc que codifica FIXh medió niveles sustancialmente más elevados de FIXh que lo posible con AAVss conteniendo una diversidad de casetes de expresión cuidadosamente optimizados diferentes. Los niveles terapéuticos de FIXh (3-30% del fisiológico) se consiguieron en primates no humanos exogámicos grandes usando dosis de vector previamente consideradas subterapéuticas en modelos humanos y animales de hemofilia. La superioridad de AAVsc se produce como resultado de su destino molecular diferente dentro del hígado ya que después de eliminar el recubrimiento el genoma de AAVsc forma rápidamente moléculas lineales

bicatenarias estables que se convierten de forma eficaz en HMWC. Usando un modelo de regeneración hepatocelular demostramos que la mayoría de los genomas de AAVsc, como AAVss, se mantienen en el hígado como formas extracromosómicas no integradas. Por lo tanto el riesgo de mutagénesis insercional con este sistema de vector que es una consideración importante para todas las estrategias de terapia génica probablemente sea bajo y comparable con el de AAVss.

El mantenimiento de la expresión de FIXh en el intervalo terapéutico a lo largo del tiempo de vida de un paciente con HB puede necesitar administración repetida de AAVsc para compensar la pérdida de genomas virales episomales como una consecuencia de renovación de hepatocitos natural. De hecho, se observó una disminución en los transgenes de AAVsc en el hígado de uno de nuestros macacos (M3-sc) a lo largo de un periodo de 6 meses después de la administración dirigida a hígado de 4×10^{11} vg/kg. La transducción repetida con vectores en base al mismo serotipo, sin embargo, se bloqueará mediante anticuerpo específico de cápside incluso cuando se usa el sistema de vector de AAVsc más potente. Demostramos que este obstáculo se puede evadir con vectores de AAVsc seudotipificados con proteína de cápside de un serotipo alternativo, extendiendo de ese modo nuestra observación previa en macacos con AAVss (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005)). Una observación importante en este contexto es la eficacia de transducción elevada similar observada con vectores de AAVsc seudotipificados con cápside de serotipo 5 u 8 en macacos. Previamente hemos observado transducción similar eficaz con vector de AAVss seudotipificado con proteínas de cápside 2, 5 u 8 en primates no humanos (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005)). Nuestra experiencia en macacos con AAVsc contrasta de forma marcada con la eficacia de transducción dispar observada con estos serotipos en ratones donde la selección de proteínas de la cápside influye de forma marcada sobre la eficacia de transferencia génica de hepatocitos. Estas diferencias específicas de especies en las propiedades biológicas de AAV que se pueden deber a diferencias en la distribución de receptor de AAV o procesamiento intracelular de vector resaltan una vez más la importancia de evaluar nuevos sistemas de vector en un contexto pertinente a seres humanos.

Uno de los macacos que recibió AAVsc(M1-sc) desarrolló anticuerpos neutralizantes a FIXh, pero esto no ocurrió en otros animales a los que se proporcionó la misma dosis y que expresaban transgén a un nivel más elevado (M2-sc y M3-sc). Hemos observado previamente anticuerpos neutralizantes en algunos macacos transducidos con AAVss (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005); Nathwani, A. C. *et al.*, *id.*). Aunque no está claro por qué aparecen anticuerpos en algunos animales y no en otros nuestro estudio muestra que las diferencias de epítipo relacionadas con especies probablemente contribuyen a esta respuesta humoral al producto transgénico y pueden no ser en definitiva un problema en seres humanos. Sin embargo el desarrollo de esta respuesta humoral es de preocupación y exige estrategias eficaces que superarían esta complicación en seres humanos. Por lo tanto, se ha evaluado un régimen basado en rituximab en nuestro macaco que desarrolló anticuerpos anti-FIXh neutralizantes debido a su eficacia para tratar enfermedades mediadas por autoanticuerpos tales como hemofilia adquirida (Stasi, R. *et al.*, "Selective B-cell depletion with rituximab for the treatment of patients with acquired hemophilia", *Blood* 103: 4424-4428 (2004)). La relación temporal marcada entre el inicio del tratamiento con rituximab/ciclosporina con el descenso rápido y la pérdida eventual del anticuerpo anti-FIXh neutralizante indica que este régimen puede ser útil para tratar respuestas humorales frente al producto transgénico que se desarrolla después de la transferencia génica mediada por AAV. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para sustentar esta observación interesante.

En resumen, los vectores de AAVsc que codifican FIXh representan un avance significativo para terapia génica de HB y generan nueva esperanza para otros trastornos que afectan el hígado. Éste, el primer estudio en evaluar sistemáticamente AAVsc que codifica un gen terapéuticamente relevante muestra que este sistema de vector es altamente eficaz para transducir el hígado en ratones y primates no humanos. La expresión transgénica terapéutica se observó en primates no humanos usando dosis de vector sustancialmente más bajas que favorecerán el impacto sobre la seguridad de este sistema de vector y adicionalmente facilitarán la presión sobre la producción de vector. Este enfoque novedoso probablemente tendrá utilidad amplia para el tratamiento de una diversidad de trastornos adquiridos y heredados.

Métodos y materiales

Producción y purificación de vector AAV-hFIX: Un plásmido de estructura principal de AAVsc se construyó ligando fragmentos de *Msc I* - *Bsa I* y *Bsa I* - *Tsp45 I* de AAV2-HCR-AATH-FIX (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005)) a poliA tardío de Virus de Simio 40 (SV40 LpA). El plásmido resultante contenía la estructura principal de AAV2 modificada con un sitio de resolución terminal 5' (*trs*) intacto y un *trs* 3' suprimido análogo al descrito previamente (McCarty, D. M. *et al.*, (2003) mencionado más adelante; Wang, Z. *et al.*, (2003) mencionado más adelante.). El potenciador/promotor de LP1 se construyó usando métodos de PCR convencionales con amplificación de segmentos consecutivos de la región de control hepática de apolipoproteína humana HCR (HCR) incluyendo el promotor del gen de alfa-1-antitripsina humano (AATH) la región no traducida 5' y se clonó cadena arriba de un intrón de antígeno t pequeño de SV40 modificado (intrón de SV40 modificado en las posiciones 4582 [g a c], 4580 [g a c], 4578 [a a c], y 4561 [a a t] en la estructura principal de AAV-2 modificada (Figura I). El ADNc de FIXh de tipo silvestre sin las regiones no traducidas 3' (UTR) se amplificó por PCR a partir de AAV-HCR-AATH-hFIX (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005)) y se insertó cadena abajo del intrón de SV40 modificado para preparar scAAV-LP1-hFIX. Se generó un FIXh optimizado con codón usando los codones encontrados de

manera más frecuente en genes eucariotas expresados de forma elevada (Haas, J. *et al.*, "Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein", *Curr. Biol.* 6: 315-324 (1996). Este FIXh optimizado con codón se sintetizó como oligonucleótidos, se ensambló mediante ligamiento, se amplificó por PCR y se secuenció antes de la clonación en la estructura principal de AAV-LP1 para crear scAAV-LP1-hFIXco. AAVss-LP1-hFIXcoS contenía un *trs* 3' normal reconstruido y 760 pb de secuencia no codificante de relleno a partir del gen de β -lactamasa insertado
 5 cadena abajo del SV40-LpA. Los vectores de AAVss y sc se prepararon mediante el método de transfección transitoria descrito anteriormente (Davidoff, A. M. *et al.*, (2004) mencionado más adelante) usando los plásmidos de empaquetamiento pAAV5-2 (Chiorini, J. A. *et al.*, "Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5", *J. Virol.* 73: 1309-1319 (1999)) o pAAVB-2 (Gao, G. P. *et al.*, mencionado más adelante) para generar vector
 10 recombinante de serotipo 5 y 8 respectivamente.

Los vectores de AAV2/5 se purificaron mediante las técnicas de cromatografía de afinidad de mucina descritas previamente (Auricchio, A. *et al.*, "A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors", *Mol. Ther.* 4: 372-374 (2001)). Los vectores de AAV2/8 se purificaron usando nuestro método de
 15 cromatografía de intercambio iónico descrito recientemente (Davidoff, A. M. *et al.*, (2004) mencionado más adelante). Los títulos de genoma de vector (vg) se determinaron mediante nuestro método de transferencia por ranura cuantitativa descrito previamente (Nathwani, A. C. *et al.*, (2001) mencionado más adelante). De forma importante, cada partícula de AAVsc se calculó que contenía dos copias de genomas virales ss. Las reservas de vector purificadas estaban consistentemente libres de contaminación con AAVwt y proteínas celulares y
 20 adenovirales según se evaluó mediante nuestros métodos descritos previamente ((Davidoff, A. M. *et al.*, (2004) mencionado más adelante; Nathwani, A. C. *et al.*, (2001) mencionado más adelante). Para determinar la configuración molecular de vectores de AAVsc, la reserva de vector se incubó con un volumen igual de tampón de carga de muestra (NaOH 60 mM, EDTA 2 mM, Ficoll al 20% y verde de Bromocresol al 0,06%) y se separaron en un gel de agarosa al 1% que contenía NaOH 30 mM y EDTA 1 mM, se transfirieron a nitrocelulosa mediante
 25 transferencia de Southern y se hibridaron con un fragmento *BstApl* de 842 pb marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ a partir del scAAV-LP1-FIXco a 42 °C. La intensidad de la hibridación se determinó usando un dispositivo de imagen fluorescente STORM phosphorimager (Amersham Biosciences, Amersham, RU).

Estudios animales: Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con directrices institucionales bajo
 30 protocolos aprobados por el Comité de Bioseguridad Institucional y el Comité de Cuidado y Uso Animal Institucional en St Jude Children's Research Hospital y Universidad de Tennessee, Menfis. Todo el trabajo animal llevado a cabo en el RU se realizó bajo la autoridad de las regulaciones de UK Home Office Project and Personal Licences y cumplía con las directrices del Comité de Revisión Ética del University College e Imperial College. La cepa de ratón HB, basada en ratones 129/sv con alteración del gen del factor IX, se obtuvo en Inder Verma (Salk Institute, La Jolla, CA) (Wang, L. *et al.*, "A factor IX-deficient mouse model for hemophilia B gene therapy", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 11563-11566 (1997)).
 35

La administración en la vena de la cola de partículas de vector de AAVr se realizó en ratones macho de 7-10 semanas de edad como se ha descrito anteriormente (Nathwani, A. C. *et al.*, (2001) mencionado más adelante). Se realizó hepatectomía parcial de dos tercios a las 16 semanas después de la administración en la vena de la cola de
 40 1×10^{10} scAAV2/8-LP1-hFIXco como se ha descrito previamente (Nakai, H. *et al.*, "Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*", *J. Virol.* 75: 6969-6976 (2001)). Cuatro semanas más tarde, en el momento en el que la masa hepática estaba completamente reconstituida, los ratones se sacrificaron para recoger el hígado. *Macaca mulatta* macho criados en cautividad de entre 2,5 y 6,6 años de edad y con un peso entre 1,6 y 7,6 kg se adquirieron en Covance Research Products, Inc. (Alice, IX) y se alojaron en la instalación dedicada a primates en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Tennessee. Las partículas de vector en solución salina tamponada con fosfato (PBS) se administraron mediante
 45 infusión en la circulación mesentérica de macacos machos, como se ha descrito anteriormente (Nathwani, A. C. *et al.*, "Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver- targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques", *Blood* 100: 1662-1669 (2002)). El perfil de CBC, química sérica y coagulación se realizó mediante ANTECH Diagnostics (Southaven, MS). Los niveles de IL-6 en suero se evaluaron usando un kit de inmunoensayo de IL-6 (R&D Systems, Oxford, RU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para erradicar anticuerpo anti-h1 X en tratamiento de M1-sc con Rituximab (250 mg/m², 2 dosis a intervalos de cada 3 semanas) y ciclosporina oral diariamente (ajuste de 30-100 mg/kg/día a niveles terapéuticos
 50 mínimos: -100-500 ng/ml) se inició aproximadamente 23 semanas después de la transferencia génica.
 55

Determinación de eficacia de transducción y biodistribución de vector: Los niveles de FIX humano en muestras murinas y de rhesus se determinaron mediante ELISA de acuerdo con los métodos descritos previamente (Nathwani, A. C. *et al.*, *id.*).
 60

La probabilidad de diferencia estadística entre grupos experimentales se determinó mediante ANOVA de una vía y ensayo t de student pareado usando software GraphPad Prizm versión 4.0 (GraphPad, San Diego, CA). Se realizó un ensayo de una etapa para FIXh:C como se ha descrito previamente (Waddington, S. N. *et al.*, "Permanent phenotypic correction of hemophilia B in immunocompetent mice by prenatal gene therapy", *Blood* 104: 2714-2721 (2004)). Los niveles de FIXh:C de fondo en ratones hemofílicos no tratados fueron como se esperaban por debajo de
 65 0,03 U/ml. El tiempo de coagulación de línea basal de ratones HB no tratados en este ensayo fue $87,2 \pm 3$ s y el de

ratones 129/sv normales fue de $74,8 \pm 3$ s. Los niveles de trombina-antitrombina se determinaron usando el kit EnzygnostTAT (Dade-Behring, Milton Keynes, R.U.). ARN Hirt de peso molecular bajo se extrajo a partir del ligado en puntos de tiempo variables después de la administración en la vena de la cola de vector scAAV-2/8 usando nuestro método descrito previamente (Davidoff, A. M. *et al.*, "Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway", *Blood* 102: 480-488 (2003)). ADN Hirt no digerido (10 μ g) o ADN digerido con *PstI* (que corta una vez dentro del casete de expresión de FIX) se separaron en gel de agarosa al 1%, se transfirieron a nitrocelulosa mediante transferencia de Southern y se hibridaron con un fragmento *BstAPI* LP1 de 842 pb marcado con α^{32} P a 42 °C. La intensidad de la hibridación se determinó usando el STORM phosphorimager y software ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Para determinar el número de copias de transgén de AAV, ADN genómico de peso molecular elevado (10 μ g) extraído a partir de muestras de tejidos murinos y de macaco, usando nuestro método previamente descrito (Nathwani, A. C. *et al* *Blood* 100: 1662-1669 (2002); Nathwani, A. C. *et al.*, *Blood* 97: 1258-1265 (2001)) se digirió con *BsrDI* o una combinación de *EcoRI* y *PstI* y se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa al 0,8% y se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N+; Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL y Amersham, R.U) y después se hibridó y cuantificó como se ha descrito anteriormente. Para evaluar la biodistribución de los vectores de AAV-FIX, 1 μ g de ADN genómico extraído a partir de diversos tejidos murinos y de macaco se sometió a PCR usando cebadores que amplificaron una región de 617 pb de hFIXco de la forma siguiente:

20 Cebador 5': 5' TTCCTGATGTGGACTATGT 3'
 Cebador 3': 5' TCATGGAAGCCAGCACAGAACATG 3')

Este proceso se ha descrito previamente (Nathwani, A. C. *et al.*, *Blood* 100: 1662-1669 (2002)). La integridad del ADN se determinó amplificando una región de 604 pb del gen de β -actina murino o de rhesus usando cebadores descritos previamente (Nathwani, A. C. *et al.*, *Blood* 97: 1258-1265 (2001)). Para determinar qué órganos expresaban hFIXco, el ARN total se aisló y se sometió a las condiciones de transcripción inversa en presencia o ausencia de transcriptasa inversa como se ha descrito antes (Nathwani, A. C. *et al.*, *id*). La expresión de FIX humano en diversas muestras de ensayo de tejido incrustadas en parafina fijadas con formalina se analizó mediante inmunohistoquímica como se ha descrito anteriormente (Davidoff, A. M. *et al.* mencionado más adelante. (2005)).

30 Detección de anticuerpos anti-FIX humano y anticuerpos anti-AAV: Muestras de plasma de macacos se exploraron para determinar la presencia de anticuerpos frente a FIXh usando un ELISA descrito previamente (Nathwani, A. C. *et al.*, *Blood* 100: 1662-1669 (2002)). Adicionalmente las muestras positivas se sometieron al ensayo de Bethesda como se ha descrito anteriormente (Nathwani, A. C. *et al.*, *Blood* 100: 1662-1669 (2002)). Se usó un ensayo de inmunocaptura para detectar anticuerpos específicos anti-AAV en plasma de rhesus como se ha descrito (Nathwani, A. C. *et al.*, *Blood* 100: 1662-1669 (2002)). Los títulos de anticuerpo neutralizantes se analizaron determinando la capacidad de suero de rhesus de inhibir la transducción de células 293T mediante vector AAVr seudotipificado que contenía el CMV-GIL como se ha descrito previamente (Nathwani, A. C. *et al.*, *Blood* 100:1662-1669(2002); Nathwani, A. C. *et al.*, "Efficient gene transfer into human cord blood CD34+ cells and the CD34+CD38- subset using highly purified recombinant adeno-associated viral vector preparations that are free of helper virus and wild-type AAV", *Gene Ther.* 7: 183-195(2000)).

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> St. Jude Children's Research Hospital Gray, John	
5	<120> Expresión mejorada de Factor IX en vectores de terapia génica	
	<130> SJ-04-0024	
	<160> 3	
10	<170> PatentIn versión 3.2	
	<210> 1	
	<211> 1386	
15	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> CDS	
20	<222> (1)..(1386)	
	<400> 1	
	atg cag agg gtg aac atg atc atg gct gag agc cct ggc ctg atc acc	48
	Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr	
	1 5 10 15	
	atc tgc ctg ctg ggc tac ctg ctg tct gct gag tgc act gtg ttc ctg	96
	Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu	
	20 25 30	
	gac cat gag aat gcc aac aag atc ctg aac agg ccc aag aga tac aac	144
	Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn	
	35 40 45	
	tct ggc aag ctg gag gag ttt gtg cag ggc aac ctg gag agg gag tgc	192
	Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys	
	50 55 60	
	atg gag gag aag tgc agc ttt gag gag gcc agg gag gtg ttt gag aac	240
	Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn	
	65 70 75 80	
	act gag agg acc act gag ttc tgg aag cag tat gtg gat ggg gac cag	288
	Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln	
	85 90 95	
	tgt gag agc aac ccc tgc ctg aat ggg ggc agc tgc aag gat gac atc	336
	Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile	
	100 105 110	
	aac agc tat gag tgc tgg tgc ccc ttt ggc ttt gag ggc aag aac tgt	384
	Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys	
	115 120 125	
	gag ctg gat gtg acc tgc aac atc aag aat ggc aga tgt gag cag ttc	432

Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe		
	130					135					140						
tgc	aag	aac	tct	gct	gac	aac	aag	gtg	gtg	tgc	agc	tgc	act	gag	ggc		480
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly		
145					150					155					160		
tac	agg	ctg	gct	gag	aac	cag	aag	agc	tgt	gag	cct	gct	gtg	cca	ttc		528
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe		
				165					170					175			
cca	tgt	ggc	aga	gtg	tct	gtg	agc	cag	acc	agc	aag	ctg	acc	agg	gct		576
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala		
			180					185					190				
gag	gct	gtg	ttc	cct	gat	gtg	gac	tat	gtg	aac	agc	act	gag	gct	gaa		624
Glu	Ala	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu		
		195				200						205					
acc	atc	ctg	gac	aac	atc	acc	cag	agc	acc	cag	agc	ttc	aat	gac	ttc		672
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe		
	210					215						220					
acc	agg	gtg	gtg	ggg	ggg	gag	gat	gcc	aag	cct	ggc	cag	ttc	ccc	tgg		720
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp		
225					230					235					240		
caa	gtg	gtg	ctg	aat	ggc	aag	gtg	gat	gcc	ttc	tgt	ggg	ggc	agc	att		768
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile		
				245					250					255			
gtg	aat	gag	aag	tgg	att	gtg	act	gct	gcc	cac	tgt	gtg	gag	act	ggg		816
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly		
			260					265					270				
gtg	aag	atc	act	gtg	gtg	gct	ggg	gag	cac	aac	att	gag	gag	act	gag		864
Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu		
		275					280					285					
cac	act	gag	cag	aag	agg	aat	gtg	atc	agg	atc	atc	ccc	cac	cac	aac		912
His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn		
	290					295					300						
tac	aat	gct	gcc	atc	aac	aag	tac	aac	cat	gac	att	gcc	ctg	ctg	gag		960
Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu		
305					310					315					320		
ctg	gat	gag	ccc	ctg	gtg	ctg	aac	agc	tat	gtg	acc	ccc	atc	tgc	att		1008
Leu	Asp	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Tyr	Val	Thr	Pro	Ile	Cys	Ile		
				325					330					335			
gct	gac	aag	gag	tac	acc	aac	atc	ttc	ctg	aag	ttt	ggc	tct	ggc	tat		1056
Ala	Asp	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ile	Phe	Leu	Lys	Phe	Gly	Ser	Gly	Tyr		
			340					345					350				
gtg	tct	ggc	tgg	ggc	agg	gtg	ttc	cac	aag	ggc	agg	tct	gcc	ctg	gtg		1104
Val	Ser	Gly	Trp	Gly	Arg	Val	Phe	His	Lys	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Val		

ES 2 381 796 T3

355		360		365		
ctg cag tac ctg agg gtg ccc ctg gtg gac agg gcc acc tgc ctg agg						1152
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg						
370		375		380		
agc acc aag ttc acc atc tac aac aac atg ttc tgt gct ggc ttc cat						1200
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His						
385		390		395		400
gag ggg ggc agg gac agc tgc cag ggg gac tct ggg ggc ccc cat gtg						1248
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val						
405		410		415		
act gag gtg gag ggc acc agc ttc ctg act ggc atc atc agc tgg ggg						1296
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly						
420		425		430		
gag gag tgt gcc atg aag ggc aag tat ggc atc tac acc aaa gtc tcc						1344
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser						
435		440		445		
aga tat gtg aac tgg atc aag gag aag acc aag ctg acc tga						1386
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr						
450		455		460		

<210> 2
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

5

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr																			
1				5					10								15		
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu																			
20									25								30		
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn																			
35									40								45		
Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys																			
50									55								60		
Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn																			
65									70								75		80
Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln																			
85									90								95		

10

ES 2 381 796 T3

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
 100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
 115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
 130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
 145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
 165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
 180 185 190

Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
 195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
 210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
 225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
 245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
 260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
 275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
 290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
 305 310 315 320

ES 2 381 796 T3

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
 325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
 340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
 355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
 370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
 385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
 405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
 420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
 435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
 450 455 460

<210> 3
 <211> 447
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

5

ccctaaaatg ggcaaacatt gcaagcagca aacagcaaac acacagccct cctgcctgc 60
 tgaccttga gctggggcag aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc 120
 cactcgacc cttggaattt cgggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt 180
 agtgtgagag gggaaatgact cctttcggtg agtgcagtgg aagctgtaca ctgcccagge 240
 aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatcccag ccagtggact tagcccctgt 300
 ttgctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct cccccgttgc 360
 ccctctggat ccaactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct cagcttcagg 420
 caccaccact gacctgggac agtgaat 447

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un gen recombinante que comprende una región de control reguladora transcripcional que comprende SEC ID N°: 3 o una región de control reguladora transcripcional que consiste en un polinucleótido que consiste en SEC ID N°: 3 o un potenciador que consiste en los nucleótidos 1-192 de SEC ID N°: 3 o un promotor que consiste en los nucleótidos 193-447 de SEC ID N°: 3, en el que dicha región de control reguladora transcripcional, dicho potenciador o dicho promotor pueden regular la expresión de una secuencia codificante unida operativamente cuando se introduce en una célula.
- 10 2. El gen recombinante de la reivindicación 1, en el que dicha región de control reguladora transcripcional está unida operativamente a una secuencia codificante del Factor IX humano.
3. El gen recombinante de la reivindicación 2, en el que dicha secuencia codificante se expone en SEC ID N°: 1.
- 15 4. Un vector de terapia génica que comprende una región de control reguladora transcripcional que tiene la secuencia expuesta en SEC ID N°: 3 unida operativamente a un polinucleótido que codifica Factor IX humano que comprende la secuencia expuesta en SEC ID N°: 1.
- 20 5. Un casete de expresión que comprende una región de control reguladora transcripcional diseñada para expresar un polinucleótido unido operativamente, en el que dicha región de control reguladora transcripcional consiste en SEC ID N°: 3.
6. Un vector que comprende el casete de expresión de la reivindicación 5.
- 25 7. Un casete de expresión que comprende un gen recombinante que tiene una región potenciadora diseñada para potenciar la expresión de un polinucleótido unido operativamente en tejido hepático, en el que dicha región potenciadora consiste en nucleótidos 1-192 de SEC ID N°: 3.
- 30 8. Un casete de expresión que comprende un gen recombinante que tiene una región promotora diseñada para promover la expresión de un polinucleótido unido operativamente en tejido hepático, en el que dicha región promotora consiste en nucleótidos 193-447 de SEC ID N°: 3.

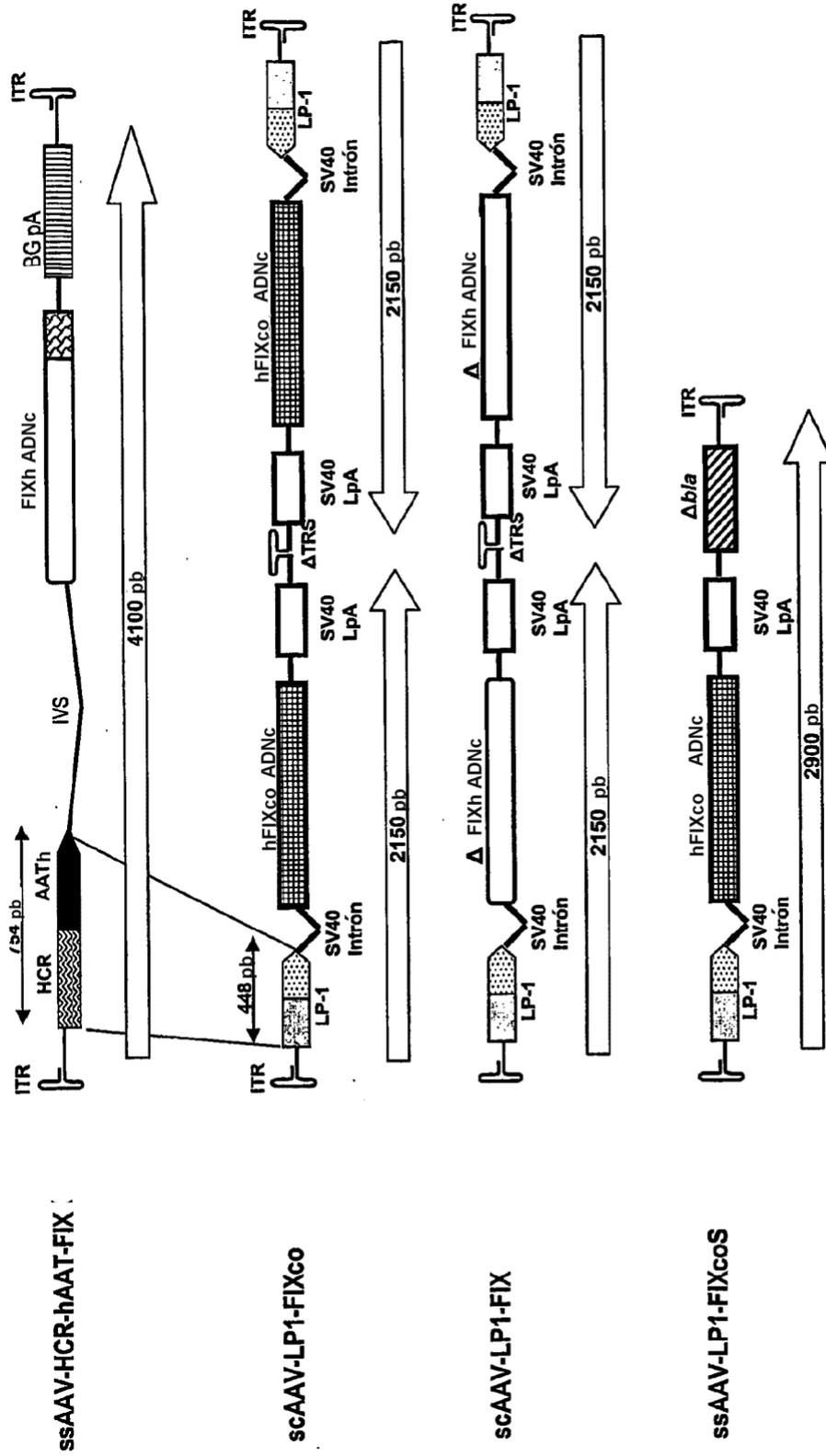


Figura 1