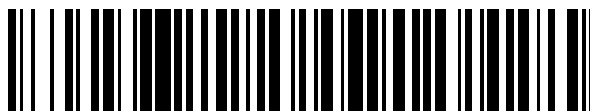


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 191**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2013** **PCT/US2013/026695**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13123503**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2013** **E 13749822 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019** **EP 2814958**

54 Título: **Composiciones y métodos con vectores de AAV para la transferencia de genes a células, órganos y tejidos**

30 Prioridad:

17.02.2012 US 201261600415 P

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

03.04.2020

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(100.0%)
3401 Civic Center Boulevard
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**HIGH, KATHERINE, A.;
MINGOZZI, FEDERICO;
SUN, JUNWEI y
JOHNSON, PHILIP**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 752 191 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

Composiciones y métodos con vectores de AAV para la transferencia de genes a células, órganos y tejidos

Introducción

Los trastornos genéticos, causados por la ausencia o un defecto en un gen deseable (pérdida de función) o la expresión de un gen indeseable o defectuoso o (ganancia de función) conducen a una variedad de enfermedades. Un ejemplo de trastorno genético por pérdida de función es la hemofilia, un trastorno hemorrágico hereditario causado por una deficiencia en el factor VIII de coagulación (FVIII, hemofilia A) o factor IX (FIX, hemofilia B). Un ejemplo de trastorno genético por ganancia de función es la enfermedad de Huntington, una enfermedad causada por un gen "HTT" patológico (que codifica la proteína huntingtina) que codifica una proteína mutada que se acumula y conduce a la destrucción gradual de las neuronas, particularmente en los ganglios basales y la corteza cerebral.

El tratamiento actual para la hemofilia consiste en la administración intravenosa de factor de coagulación recombinante ya sea a petición, en caso de hemorragia, o profilácticamente. Sin embargo, este enfoque terapéutico tiene varios inconvenientes, como la necesidad de infusiones repetidas, el costo del tratamiento, el riesgo de desarrollar respuestas inmunes anti-factor terapéutico y el riesgo de hemorragias potencialmente mortales. Estas limitaciones han provocado el desarrollo de terapias basadas en genes para la hemofilia. Con este fin, la hemofilia es ideal para la terapia basada en la transferencia de genes, ya que 1) la ventana terapéutica es muy amplia, ya que niveles solamente por encima del 1% de lo normal ya pueden provocar un cambio en el fenotipo de grave a moderado, y los niveles del 100% no están asociados a ningún efecto secundario; 2) la expresión específica de tejido del transgén terapéutico no es estrictamente necesaria; y 3) existe una experiencia considerable en la medición de los criterios de valoración de la eficacia terapéutica. Además, se ha demostrado que la expresión hepática del factor de coagulación induce tolerancia inmunológica hacia el propio factor de coagulación, lo que reduce la probabilidad de respuestas inmunes potencialmente dañinas contra el factor de coagulación.

Actualmente, los vectores de virus adenoasociados (AAV) se reconocen como los vectores de transferencia de genes de elección, ya que tienen el mejor perfil de seguridad y eficacia para la administración de genes *in vivo*. De los serotipos de AAV aislados hasta ahora, AAV2 y AAV8 se han utilizado para seleccionar como objetivo el hígado de seres humanos afectados por hemofilia B grave. Ambos vectores funcionaron eficientemente, y en el caso de AAV8 se documentó la expresión a largo plazo del transgén terapéutico. Los datos recientes en seres humanos mostraron que seleccionar como objetivo el hígado con un vector de AAV logra la expresión a largo plazo del transgén FIX a niveles terapéuticos.

Martin et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2008, 296: C476-C488 describe la sobreexpresión de *Galgt2* en el músculo esquelético para evitar las lesiones resultantes de contracciones excéntricas en ratones mdx y de tipo natural.

El documento WO2011/133890 se refiere a virus adenoasociados recombinantes para dirigir transgenes al tejido del SNC.

El documento WO2007/120542 se refiere a proteínas de la cápside de virus adenoasociados (AAV) recombinantes.

Si bien estos datos son prometedores, la identificación de serotipos de AAV con alto tropismo hacia el hígado y baja seroprevalencia en humanos (un huésped natural para el AAV de tipo natural) es fundamental para 1) lograr niveles terapéuticos de expresión transgénica en el hígado a la dosis de vector más baja posible para disminuir el riesgo de desencadenar respuestas inmunitarias anti-cápside de AAV; y 2) los serotipos de AAV alternativos con seroprevalencia única permitirán tratar a aquellas poblaciones de pacientes que de otro modo no serían elegibles para la transferencia génica con AAV debido a la inmunidad humoral preexistente hacia AAV. La invención aborda estas necesidades y proporciona beneficios adicionales.

Resumen

La invención proporciona una composición para el uso en un método de tratamiento de un trastorno hemorrágico en un mamífero, en donde la composición comprende un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia VP1, VP2 y VP3 de AAV-Rh74 expuestas en SEQ ID N°: 1, 3 y 4, respectivamente, como se muestra en la Figura 3, y dicho vector comprende además una secuencia polinucleotídica heteróloga que comprende un gen que codifica un factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea, en donde la secuencia polinucleotídica heteróloga está unida de forma operable a un elemento de control de la expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia polinucleotídica heteróloga, en donde el elemento de control de la expresión es un promotor activo en el hígado, y en donde el método comprende administrar el vector de virus adenoasociado (AAV) a dicho mamífero, por lo que se administra o transfiere la secuencia polinucleotídica heteróloga al mamífero.

AAV-Rh74 selecciona como objetivo los hepatocitos del hígado, entre otros tipos de células. Como vector para la administración de la secuencia polinucleotídica, AAV-Rh74 y los vectores de AAV relacionados controlan la expresión del polinucleótido en las células. Los polinucleótidos que codifican proteínas, como las proteínas para aplicaciones terapéuticas, pueden expresarse a niveles terapéuticos después de la administración. Además, AAV-Rh74 y la transferencia de polinucleótidos mediada por el vector de AAV relacionado produjeron niveles de expresión de proteínas que fueron significativamente más altos que varios otros serotipos estudiados actualmente en entornos

preclínicos y clínicos (véanse, por ejemplo, las Figuras 1 y 2). En particular, AAV-Rh74 podría dirigir los polinucleótidos al hígado con una eficiencia al menos comparable o superior al método de referencia para la transducción hepática, AAV8, tanto en ratones como en perros con hemofilia B. Por lo tanto, AAV-Rh74 puede usarse para administrar polinucleótidos, como secuencias codificantes de genes, para expresar proteínas que proporcionan un beneficio deseable o terapéutico, así como para nucleótidos inhibidores que reducen o inhiben la expresión de un gen indeseable o defectuoso, tratando así una variedad de enfermedades. Por ejemplo, se puede usar AAV-Rh74 para administrar genes terapéuticos (p. ej., FIX, FVIII) para tratar la hemofilia A, B y para administrar genes para una amplia gama de otras deficiencias metabólicas o de proteínas plasmáticas, o para eliminar genes para otros fines terapéuticos, tales como, entre otros, genes que codifican nucleasas de dedos de zinc para llevar a cabo la edición del genoma en el hígado, y para la administración local (hígado) de agentes inmunomoduladores como interferón alfa para el tratamiento de infecciones por el virus de la hepatitis, o para tratar prácticamente cualquier enfermedad que requiera la transducción hepática o la presencia del producto transgénico terapéutico en el torrente sanguíneo (que se puede lograr dirigiendo los transgenes para la expresión hepática).

Además de la administración eficiente de polinucleótidos mediante AAV-Rh74 y vectores relacionados a las células *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, la prevalencia de anticuerpos anti-AAV-Rh74 en humanos es menor que la de los anticuerpos anti-AAV2, y difiere de la de los anticuerpos anti-AAV8 (Tabla 1). Debido a la baja seroprevalencia, el AAV-Rh74 y los vectores relacionados se pueden usar en un mayor porcentaje de humanos, que de otro modo no serían elegibles para la transferencia de genes, por ejemplo, humanos que podrían ser seropositivos para otros serotipos de AAV (p. ej., AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, etc.). Además, el AAV-Rh74 se puede producir de manera eficiente a títulos altos (Tabla 2). Por lo tanto, se puede producir AAV-Rh74 y vectores relacionados en grandes cantidades para las enfermedades clínicas más prevalentes.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método *in vitro* para administrar o transferir una secuencia polinucleotídica heteróloga en células aisladas de un mamífero. El método comprende administrar un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia VP1, VP2 y VP3 de AAV-Rh74 expuesta en SEQ ID N°: 1, 3 y 4, respectivamente, como se muestra en la Figura 3, y dicho vector comprende además un polinucleótido heterólogo que comprende un gen que codifica un factor de coagulación sanguínea (formación de coágulos), en el que la secuencia polinucleotídica heteróloga está unida de forma operable a un elemento de control de la expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia polinucleotídica heteróloga, en el que el elemento de control de la expresión es un promotor activo en el hígado, a dichas células aisladas. En una realización, el método comprende además la transcripción posterior del polinucleótido heterólogo, por lo que se forma un transcrito. En una realización adicional, el método comprende además la transcripción posterior para formar un transcrito, y la traducción posterior para formar un producto génico (proteína). En particular, por ejemplo, en las dos últimas realizaciones, el elemento de control de la expresión al que está unida de forma operable la secuencia polinucleotídica heteróloga puede conferir la transcripción de la secuencia polinucleotídica heteróloga, y la traducción posterior del transcrito.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los niveles plasmáticos de factor IX humano (FIX) en ratones C57BL/6 (n = 5 por grupo) a los que se inyectaron a través de la vena de la cola vectores de AAV que expresaban el transgén FIX bajo control de un promotor específico de hígado. Dosis de vector 2,5¹⁰ genomas de vector por ratón. Los niveles plasmáticos del producto del transgén FIX (proteína FIX) se midieron mediante ELISA en las semanas 1, 2 y 4 tras la transferencia génica. AAV-Rh74 confirió los niveles más altos de expresión del transgén FIX.

La Figura 2 muestra los niveles plasmáticos de FIX canino en perros con hemofilia B después de la administración de 3¹² genomas de vectores por kilogramo (kg) de peso. Los vectores de AAV se infundieron por vía intravenosa (IV) a través de la vena safena, y se monitorizaron los niveles de FIX mediante ELISA. La expresión del transgén terapéutico FIX estaba controlada por un promotor específico de hígado. Los vectores AAV8 y AAV-Rh74 tuvieron un rendimiento similar en perros con hemofilia B, y fueron superiores a AAV6.

La Figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos de VP1, VP2 y VP3 de AAV-Rh74 y, para VP1, la secuencia de polinucleótidos (ADN) (SEQ ID N°s: 1-4).

La Figura 4 muestra la administración del vector AAV8 y AAVrh74 que expresaba el Factor IX humano (FIX) (bajo control de un promotor específico de hígado) a macacos rhesus, un primate no humano, y la expresión de FIX en los animales. Los animales que recibieron los vectores AAVrh74-FIX (las últimas dos barras en el margen derecho) expresaron el transgén FIX a niveles más altos en comparación con los otros grupos de animales inyectados a la misma dosis.

Descripción detallada

La invención se basa, al menos en parte, en datos que indican que el serotipo AAV-Rh74 del virus adenoasociado (AAV) tiene un alto tropismo hacia los hepatocitos, que son las células del hígado. Como vector para la transferencia/administración de polinucleótidos (p. ej. genes, ácido nucleico inhibidor, etc.) a las células, el AAV-Rh74 puede controlar los niveles terapéuticos de expresión en el hígado después de la administración intravenosa. Además, la transferencia/administración de genes mediada por AAV-Rh74 produjo niveles de expresión de proteínas que fueron

significativamente más altos que varios otros serotipos (véanse, por ejemplo, las Figuras 1 y 2). En particular, AAV-Rh74 dirige los genes para la administración en el hígado con una eficiencia al menos comparable o superior al método de referencia para la transducción hepática, AAV8, tanto en ratones como en perros con hemofilia B. Por lo tanto, AAV-Rh74 se puede usar para transferir/administrar polinucleótidos, tales como secuencias codificantes (genes) para proteínas que proporcionan un beneficio deseable o terapéutico, así como un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, inverso) que reduce o inhibe la expresión de un gen indeseable o defectuoso (p. ej., patológico), por lo que se trata una variedad de enfermedades. Por ejemplo, el AAV-Rh74 se puede usar para transferir/administrar genes terapéuticos para tratar la hemofilia A, B y para transferir/administrar genes para una amplia gama de otras deficiencias metabólicas o de proteínas plasmáticas, o para otros fines terapéuticos, tal como, pero sin limitación, genes que codifican nucleasas de dedos de zinc para llevar a cabo la edición del genoma en el hígado, y para la administración local (hígado) de agentes inmunomoduladores como interferón alfa para el tratamiento de infecciones por el virus de la hepatitis y para tratar prácticamente cualquier enfermedad que requiera la transducción hepática o la presencia del producto transgénico terapéutico en el torrente sanguíneo (que puede lograrse dirigiendo los transgenes para la expresión en el hígado).

Como se establece en la presente memoria, el serotipo de virus adenoasociado (AAV) AAV-Rh74 y los vectores de AAV relacionados proporcionan la administración de secuencias polinucleotídicas a células *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*. Dichas secuencias polinucleotídicas pueden codificar proteínas, de manera que las células en las que se administran los polinucleótidos expresan las proteínas codificadas. Por ejemplo, AAV-Rh74 y los vectores de AAV relacionados pueden incluir polinucleótidos que codifican una proteína o péptido deseado, o un polinucleótido que cuando se transcribe comprende una secuencia inhibidora (por ejemplo, ARN), por ejemplo, una secuencia que selecciona como objetivo un gen para la inhibición de la expresión. La administración del vector a un sujeto (p. ej., un mamífero), por lo tanto, proporciona no solo polinucleótidos que codifican proteínas y péptidos al sujeto, sino también ácidos nucleicos inhibidores que seleccionan como objetivo genes para la inhibición de la expresión o función en el sujeto.

Por lo tanto, de acuerdo con la descripción, se proporcionan el serotipo de virus adenoasociado (AAV) AAV-Rh74 y los vectores de AAV relacionados, incluidas las secuencias polinucleotídicas que codifican péptidos y proteínas, así como las secuencias polinucleotídicas que directamente o cuando se transcriben comprenden ácidos nucleicos inhibidores que seleccionan como objetivo genes para la inhibición de la expresión o función. Tales AAV-Rh74 y los serotipos de vectores de AAV relacionados (por ejemplo, secuencias VP1, VP2 y/o VP3) son distintos de otros serotipos de AAV, incluidos, por ejemplo, AAV1-AAV11 o Rh10 (por ejemplo, distintos de las secuencias VP1, VP2, y/o VP3 de cualquiera de los serotipos AAV1-AAV11 o Rh10).

Como se usa en la presente memoria, el término "serotipo" es una distinción utilizada para referirse a un AAV que tiene una cápside que es serológicamente distinta de otros serotipos de AAV. La distinción serológica se determina basándose en la falta de reactividad cruzada entre los anticuerpos contra un AAV en comparación con otro AAV. Dichas diferencias de reactividad cruzada generalmente se deben a diferencias en las secuencias de proteínas de la cápside/determinantes antigénicos (p. ej., debido a las diferencias en las secuencias VP1, VP2 y/o VP3 de los serotipos de AAV).

AAV-Rh74 tiene secuencias de genes/proteínas idénticas a las secuencias características de AAV-Rh74 (véanse, por ejemplo, VP1, VP2, VP3 de la Figura 3). Como se usa en la presente memoria, un "vector de AAV relacionado con AAV-Rh74" y las variaciones gramaticales del mismo se refieren a una o más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias VP1, VP2 y/o VP3) que tienen una identidad de secuencia sustancial con una o más secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas que comprenden AAV-Rh74. Tales vectores de AAV relacionados con AAV-Rh74 pueden tener, por lo tanto, una o más secuencias distintas de AAV-Rh74, pero pueden exhibir una identidad de secuencia sustancial con uno o más genes y/o tener una o más características funcionales de AAV-Rh74 (por ejemplo, tales como tropismo celular/tisular). Las secuencias ejemplares de AAV-Rh74 incluyen VP1, VP2 y/o VP3 expuestas en la Figura 3. También se describe en la presente memoria un vector de AAV relacionado con AAV-Rh74 que tiene un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia de los mismos que incluye o consiste en una secuencia al menos un 80% o más (por ejemplo, 85%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98%, 99%, 99,5%, etc.) idéntica a una o más secuencias de AAV-Rh74 VP1, VP2 y/o VP3 expuestas en la Figura 3.

En la presente memoria se describen métodos y usos que incluyen secuencias de AAV-Rh74 (polipéptidos y nucleótidos) y subsecuencias de las mismas que exhiben menos del 100% de identidad de secuencia con un gen de AAV-Rh74 o una secuencia de una proteína de referencia (por ejemplo, las secuencias VP1, VP2 y/o VP3 expuestas en la Figura 3), pero son distintas y no idénticas a los genes o proteínas de AAV conocidos, tales como genes o proteínas de AAV1-AAV11, AAV-Rh10, etc. En un ejemplo, un polipéptido de AAV-Rh74 o una subsecuencia del mismo incluye o consiste en una secuencia al menos un 80% o más idéntica, por ejemplo, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, etc., es decir, hasta un 100% idéntica a cualquier secuencia de AAV-Rh74 de referencia o subsecuencia de la misma (por ejemplo, las secuencias VP1, VP2 y/o VP3 expuestas en la Figura 3).

Los vectores de AAV, incluidos los vectores relacionados con AAV-Rh74 y AAV-Rh74, pueden construirse usando técnicas recombinantes que conoce el experto en la técnica, para incluir una o más secuencias polinucleotídicas heterólogas flanqueadas con ITRs de AAV funcionales. La incorporación de un polinucleótido heterólogo define el AAV como un vector recombinante, o un "vector rAAV". Dichos vectores pueden tener uno o más de los genes de AAV de

tipo natural delecionados completamente o en parte, por ejemplo, un gen rep y/o cap, pero conservan al menos una secuencia ITR flanqueante funcional, según sea necesario para el rescate, la replicación y el empaquetamiento de la partícula de AAV. Por lo tanto, un vector de AAV incluye las secuencias requeridas en cis para la replicación viral y el empaquetamiento (por ejemplo, ITRs funcionales).

- 5 Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a todas las formas de ácido nucleico, oligonucleótidos, que incluyen el ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los polinucleótidos incluyen ADN genómico, cADN y ADN inverso, y mRNA sometido o no a corte y empalme, rARN, tARN y ADN o ARN inhibidor (ARNi, p. ej., (sh)ARN en horquilla pequeña o corta, microARN, (si)ARN de interferencia pequeño o corto, ARN de corte y empalme en trans o ARN inverso). Los polinucleótidos incluyen
- 10 polinucleótidos de origen natural, sintéticos y alterados o modificados intencionadamente, así como análogos y derivados. Los polinucleótidos pueden ser simples, dobles o triples, lineales o circulares, y pueden tener cualquier longitud.

- Un polinucleótido "heterólogo" simplemente se refiere a un polinucleótido insertado en AAV para fines de transferencia/administración mediada por AAV del polinucleótido en una célula. Los polinucleótidos heterólogos son típicamente distintos del ácido nucleico de AAV. Una vez transferido/administrado a la célula, se puede expresar un polinucleótido heterólogo, contenido dentro del virión de rAAV (p. ej., transcrito y traducido, si es apropiado). Alternativamente, un polinucleótido heterólogo transferido/administrado en una célula, contenido dentro del virión de rAAV, no necesita expresarse. Aunque el término "heterólogo" no siempre se usa en la presente memoria en referencia a los polinucleótidos, la referencia a un polinucleótido incluso en ausencia del modificador "heterólogo" incluye los
- 15 polinucleótidos heterólogos a pesar de la omisión.
- 20

- Los "polipéptidos", "proteínas" y "péptidos" codificados por las "secuencias polinucleotídicas" incluyen secuencias nativas de longitud completa, como con las proteínas naturales, así como subsecuencias funcionales, formas modificadas o variantes de secuencia siempre que la subsecuencia, la forma o variante modificada conserve cierto grado de funcionalidad de la proteína nativa de longitud completa. En los métodos y usos de la invención, dichos
- 25 polipéptidos, proteínas y péptidos codificados por las secuencias polinucleotídicas pueden ser, pero no es necesario, idénticos a la proteína endógena que es defectuosa, o cuya expresión es insuficiente o deficiente en el mamífero tratado.

- El serotipo AAV-Rh74 del virus adenoasociado (AAV) y los vectores de AAV relacionados pueden usarse para introducir/administrar polinucleótidos de forma estable o transitoria en las células y la progenie de las mismas. El término "transgén" se usa para referirse convenientemente al polinucleótido heterólogo que se ha introducido en una célula u organismo. Los transgenes incluyen cualquier polinucleótido, como un gen que codifica un polipéptido o una proteína, un polinucleótido que se transcribe hasta un polinucleótido inhibidor o un polinucleótido que no se transcribe (por ejemplo, carece de un elemento de control de la expresión, como un promotor que controla la transcripción). Por ejemplo, en una célula que tiene un transgén, el transgén se ha introducido/transferido por la "transformación" con
- 30 AAV de la célula. Una célula o progenie de la misma en la que se ha introducido el transgén se denomina "célula transformada" o "transformante". Típicamente, un transgén se incluye en la progenie del transformante o se convierte en una parte del organismo que se desarrolla a partir de la célula. Por consiguiente, una célula "transformada" o "transfectada" (p. ej., en un mamífero, como una célula o tejido o célula de un órgano), significa un cambio genético en una célula después de la incorporación de una molécula exógena, por ejemplo, un polinucleótido o proteína (p. ej., un transgén) en la célula. Por lo tanto, una célula "transfectada" o "transformada" es una célula, o una progenie de la misma, en la que se ha introducido una molécula exógena, por ejemplo. La(s) célula(s) puede(n) propagarse, y la proteína introducida se puede expresar, o el ácido nucleico se puede transcribir.
- 35
- 40

- Los ejemplos no limitantes particulares de polinucleótidos que codifican productos génicos (proteínas) que son útiles de acuerdo con la descripción incluyen, pero sin limitación: genes que comprenden o codifican CFTR (proteína reguladora transmembrana de fibrosis quística), un factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea (Factor XIII, Factor IX, Factor X, Factor VIII, Factor VIIa, proteína C, etc.) que incluye la ganancia de función de los factores de coagulación sanguínea, un anticuerpo, proteína específica del epitelio pigmentario de la retina de 65 kDa (RPE65), eritropoyetina, receptor de LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metales (ATP7A o ATP7), sulfamidasa,
- 45 una enzima involucrada en la enfermedad de almacenamiento lisosómico (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento (p. ej., factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado de cerebro, factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento transformante α y β , etc.), una citocina (p. ej., interferón α , interferón β , interferón γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, linfotoxina, etc.), un producto de gen suicida (p. ej., timidina quinasa del virus herpes simple, citosina desaminasa, toxina de la difteria, citocromo P450, desoxicitidina quinasa, factor de necrosis tumoral, etc.), una proteína de resistencia a medicamentos (por ejemplo, que proporciona resistencia a un medicamento utilizado en la terapia contra el cáncer), una proteína supresora de tumores (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), poliposis coli adenomatosa (APC), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un péptido o proteína tolerogénica o inmunogénica Tregitopes [de Groot et al., Blood, 15 de oct. de 2008; 112(8): 3303], o hCDR1 [Sharabi et al., Proc Natl Acad Sci USA. 6 de junio de
- 50
- 55
- 60

2006; 103 (23): 8810-5], insulina, glucoquinasa, guanilato ciclasa 2D (LCA-GUCY2D), proteína de acompañamiento Rab 1 (coroideremia), LCA 5 (LCA-lebercilina), aminotransferasa de cetoadido de ornitina (atrofia girata), Retinosquiasis 1 (retinosquiasis ligada al cromosoma X), USH1C (síndrome de Usher 1C), GTPasa de la retinitis pigmentaria ligada al X (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentaria), DFNB1 (sordera asociada a conexina 26), ACHM 2, 3 y 4 (Acromatopsia), PKD-1 o PKD-2 (enfermedad renal poliquística), TPP1, CLN2, deficiencias genéticas causales de enfermedades de almacenamiento lisosómico (p. ej., sulfatasas, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP, NPC1, VPC2, proteínas activadoras de esfingolípidos, etc.), una o más nucleasas de dedos de zinc para la edición del genoma, o secuencias donantes utilizadas como moldes de reparación para la edición del genoma.

Todas las formas mamíferas y no mamíferas de polinucleótidos que codifican productos génicos, incluidos los genes y proteínas no limitantes descritos en la presente memoria, están expresamente incluidos, ya sean conocidos o desconocidos. Por lo tanto, la descripción incluye genes y proteínas de animales no mamíferos, mamíferos que no son humanos y humanos, cuyos genes y proteínas funcionan de manera sustancialmente similar a los genes y proteínas humanos descritos en la presente memoria. Un ejemplo no limitante de gen no mamífero es un dominio de nucleasa Fok, que es de origen bacteriano. Los ejemplos no limitantes de secuencias FIX de mamíferos no humanos se describen en Yoshitake et al., 1985, anteriormente mencionado; Kurachi et al., 1995, anteriormente mencionado; Jallat et al., 1990, anteriormente mencionado; Kurachi et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6461-6464; Jaye et al., 1983, Nucl. Acids Res. 11:2325-2335; Anson et al., 1984, EMBO J. 3: 1053-1060; Wu et al., 1990, Gene 86:275-278; Evans et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:10095 (1989), Blood 74:207-212; Pendurthi et al., 1992, Thromb. Res. 65:177-186; Sakar et al., 1990, Genomics 1990, 6:133-143; y Katayama et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4990-4994.

Los polinucleótidos, polipéptidos y subsecuencias de los mismos incluyen las formas modificadas y las variantes. Como se usan en la presente memoria, los términos "modificar" o "variante", y las variaciones gramaticales de los mismos, significan que un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia del mismo se desvía de una secuencia de referencia. Por lo tanto, las secuencias modificadas y las variantes pueden tener sustancialmente la misma, mayor o menor actividad o función que una secuencia de referencia, pero al menos conservan una actividad o función parcial de la secuencia de referencia.

Por consiguiente, la descripción también incluye variantes naturales y no naturales. Dichas variantes incluyen las variantes con ganancia y pérdida de función. Por ejemplo, las secuencias de ADN de FIX humano de tipo natural, cuyas variantes proteicas o mutantes conservan la actividad, o son terapéuticamente efectivas, o son comparativamente o incluso más terapéuticamente activas que el FIX humano invariable en los métodos y usos de la descripción. En un ejemplo particular, el colágeno IV sirve para atrapar FIX, lo que significa que cuando se introduce en el tejido muscular de un mamífero, parte del FIX no está disponible para participar en la coagulación sanguínea porque se retiene en los espacios intersticiales en el tejido muscular. Una mutación en la secuencia de FIX que da como resultado una proteína con una unión reducida al colágeno IV (por ejemplo, pérdida de la función) es un mutante útil en los métodos de la descripción, por ejemplo, para el tratamiento de la hemofilia. Un ejemplo de dicho gen FIX humano mutante codifica una proteína FIX humana con el aminoácido alanina en lugar de lisina en la posición del quinto aminoácido desde el comienzo de la proteína madura.

Los ejemplos no limitantes de modificaciones incluyen una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50 o más residuos), adiciones (p. ej., inserciones o 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, o más residuos) y deleciones (p. ej., subsecuencias o fragmentos) de una secuencia de referencia. En realizaciones particulares, una secuencia modificada o variante conserva al menos parte de una función o una actividad de la secuencia sin modificar. Dichas formas y variantes modificadas pueden tener menos, igual o más, pero al menos una parte, de una función o actividad de una secuencia de referencia, por ejemplo, como se describe en la presente memoria.

Una variante puede tener una o más diferencias o modificaciones de secuencia de aminoácidos no conservativas o conservativas, o ambas. Una "sustitución conservativa" es la sustitución de un aminoácido por un residuo biológico, químico o estructuralmente similar. Biológicamente similar significa que la sustitución no destruye una actividad biológica. Estructuralmente similar significa que los aminoácidos tienen cadenas laterales con una longitud similar, como alanina, glicina y serina, o un tamaño similar. La similitud química significa que los residuos tienen la misma carga o son hidrofílicos o hidrofóbicos. Los ejemplos particulares incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico, como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina, serina por treonina, y similares. Los ejemplos particulares de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina y similares. Por ejemplo, las sustituciones conservativas de aminoácidos típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Una "sustitución conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido.

Por consiguiente, la descripción incluye variantes de genes y proteínas (por ejemplo, de polinucleótidos que codifican las proteínas descritas en la presente memoria) que conservan una o más actividades biológicas (por ejemplo, la función en la coagulación sanguínea, etc.). Dichas variantes de proteínas o polipéptidos incluyen proteínas o

polipéptidos que se han modificado o pueden modificarse usando la tecnología de ADN recombinante, de modo que la proteína o el polipéptido posea propiedades alteradas o adicionales, por ejemplo, las variantes que confieren una mayor estabilidad de la proteína en el plasma o una mayor actividad de la proteína. Las variantes pueden diferir de una secuencia de referencia, como los polinucleótidos, las proteínas o los péptidos naturales.

- 5 A nivel de la secuencia de nucleótidos, un gen variante natural y no natural serán típicamente al menos aproximadamente un 50% idénticos, más típicamente aproximadamente un 70% idénticos, incluso más típicamente aproximadamente un 80% idénticos (90% o más de identidad) al gen de referencia. A nivel de la secuencia de aminoácidos, una proteína variante natural y no natural serán típicamente al menos aproximadamente un 70% idénticas, más típicamente aproximadamente un 80% idénticas, incluso más típicamente aproximadamente un 90% o más de identidad con la proteína de referencia, aunque se permiten regiones sustanciales de ausencia de identidad en las regiones no conservadas (por ejemplo, menos del 70% idénticas, como menos del 60%, 50% o incluso 40%). En otras realizaciones, las secuencias tienen al menos un 60%, 70%, 75% o más de identidad (por ejemplo, 80%, 85% 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad) respecto de una secuencia de referencia. Los expertos en la técnica conocen los procedimientos para la introducción de cambios de nucleótidos y aminoácidos en un polinucleótido, proteína o polipéptido (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989)).

El término "identidad", "homología" y sus variaciones gramaticales significan que dos o más entidades referenciadas son iguales, cuando son secuencias "alineadas". Así, a modo de ejemplo, cuando dos secuencias de polipéptidos son idénticas, tienen la misma secuencia de aminoácidos, al menos dentro de la región o porción referenciada. Cuando dos secuencias polinucleotídicas son idénticas, tienen la misma secuencia de polinucleótidos, al menos dentro de la región o porción referenciada. La identidad puede estar en un área definida (región o dominio) de la secuencia. Un "área" o "región" de identidad se refiere a una porción de dos o más entidades referenciadas que son iguales. Por lo tanto, cuando dos secuencias de proteína o ácido nucleico son idénticas en una o más áreas o regiones de la secuencia, comparten identidad dentro de esa región. Una secuencia "alineada" se refiere a múltiples secuencias de polinucleótidos o proteínas (aminoácidos), que a menudo contienen correcciones para bases o aminoácidos ausentes o adicionales (huecos) en comparación con una secuencia de referencia.

La identidad puede extenderse a lo largo de toda la secuencia o una parte de la secuencia. En aspectos particulares, la longitud de la secuencia que comparte el porcentaje de identidad es 2, 3, 4, 5 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. aminoácidos contiguos. En aspectos particulares adicionales, la longitud de la identidad de secuencia compartida es de 20 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, etc. aminoácidos contiguos. En otros aspectos particulares, la longitud de la secuencia que comparte identidad es 35 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, etc., aminoácidos contiguos. En otros aspectos particulares adicionales, la longitud de la secuencia que comparte identidad es 50 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-100, 100-110, etc. polinucleótidos o aminoácidos contiguos.

Los términos "homólogo" u "homología" significan que dos o más entidades referenciadas comparten al menos una identidad parcial a lo largo de una región o porción dada. "Áreas, regiones o dominios" de homología o identidad significan que una porción de dos o más entidades referenciadas comparte homología o son iguales. Por lo tanto, cuando dos secuencias son idénticas en una o más regiones de secuencia, comparten identidad en estas regiones. "Homología sustancial" significa que una molécula se conserva estructural o funcionalmente de modo que tiene o se predice que tiene al menos una estructura o función parcial de una o más de las estructuras o funciones (por ejemplo, una función o actividad biológica) de la molécula de referencia, o la región o porción relevante/correspondiente de la molécula de referencia con la que comparte homología.

El alcance de la identidad (homología) entre dos secuencias se puede determinar utilizando un programa informático y un algoritmo matemático. Tales algoritmos que calculan el porcentaje de identidad de secuencia (homología) generalmente explican los huecos en la secuencia y las coincidencias incorrectas en la región o área de comparación. Por ejemplo, un algoritmo de búsqueda BLAST (por ejemplo, BLAST 2.0) (véase, por ejemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990), disponible públicamente a través del NCBI) tiene parámetros de búsqueda ejemplares de la siguiente manera: Coincidencia incorrecta -2; apertura de hueco 5; extensión de hueco 2. Para las comparaciones de secuencias de polipéptidos, se usa un algoritmo BLASTP típicamente en combinación con una matriz de puntuación, como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 o BLOSUM 50. Los programas de comparación de secuencias FASTA (p. ej., FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH también se utilizan para cuantificar el alcance de la identidad (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988); Pearson, Methods Mol Biol. 132: 185 (2000) y Smith et al., J. Mol. Biol. 147: 195 (1981)). También se han desarrollado programas para cuantificar la similitud estructural de proteínas utilizando la cartografía topológica basada en Delaunay (Bostick et al., Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003)).

Los polinucleótidos incluyen adiciones e inserciones, por ejemplo, dominios heterólogos. Una adición (p. ej., dominio heterólogo) puede ser una unión covalente o no covalente de cualquier tipo de molécula a una composición. Típicamente, las adiciones e inserciones (por ejemplo, un dominio heterólogo) confieren una función o actividad complementaria o distinta.

Las adiciones e inserciones incluyen secuencias quiméricas y de fusión, que es una secuencia de polinucleótidos o

proteínas que tiene una o más moléculas que normalmente no están presentes en una secuencia nativa de referencia (de tipo natural) unida covalentemente a la secuencia. Los términos "fusión" o "quimérico" y las variaciones gramaticales de los mismos, cuando se usan respecto de una molécula, significan que una porción o parte de la molécula contiene una entidad diferente distinta (heteróloga) de la molécula, ya que no suelen existir juntas en la naturaleza. Es decir, por ejemplo, una porción de la fusión o quimera incluye o consiste en una porción que no existe en la naturaleza, y es estructuralmente distinta.

También se describen en la presente memoria secuencias polinucleotídicas que son secuencias de ácido nucleico inhibitoras e inversas. Los ácidos nucleicos inhibidores, inversos, miARN, shARN y ARNi pueden modular la expresión de un gen objetivo. Una molécula inversa incluye los polinucleótidos monocatenarios, bicatenarios o tricatenarios, y los ácidos nucleicos peptídicos (APNs) que se unen a transcritos de ARN o ADN (por ejemplo, ADN genómico). Los oligonucleótidos derivados del sitio de inicio de la transcripción de un gen objetivo, p. ej., entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de inicio, son otro ejemplo particular. Las moléculas inversas que forman moléculas triples puede unirse al ADN bicatenario, inhibiendo así la transcripción del gen. "ARNi" es el uso de secuencias de ARN monocatenarias o bicatenarias para inhibir la expresión génica (véase, por ejemplo, Kennerdell et al., *Cell* 95: 1017 (1998); y Fire et al., *Nature*, 391: 806 (1998)). Las secuencias de ARN bicatenario de una región codificante de genes objetivo pueden usarse, por lo tanto, para inhibir o impedir la expresión/transcripción de genes. Las moléculas inversas y el ARNi pueden producirse basándose en ácidos nucleicos que codifican secuencias de genes objetivo (por ejemplo, HTT), tales como ácido nucleico que codifica HTT de mamífero y humano. Por ejemplo, un ácido nucleico monocatenario o bicatenario (p. ej., ARN) puede seleccionar como objetivo la transcripción de HTT (p. ej., mARN).

Los ejemplos particulares no limitantes de genes (p. ej., ADN genómico) o la transcripción de un gen patógeno (p. ej., ARN o mARN) que se pueden seleccionar como objetivo con las secuencias inhibitoras de ácido nucleico descritas en la presente memoria incluyen, pero sin limitación: genes patogénicos asociados con enfermedades de repetición de polinucleótidos como el gen huntingtina (HTT), un gen asociado con la atropia dentatorubropalidoluisiana (p. ej., atrofina 1, ATN1); el receptor de andrógenos del cromosoma X en la atrofia muscular espinobulbar, ataxina-1, -2, -3 y -7 humana, el canal de calcio dependiente de voltaje Ca_v2.1 P/Q codificado por la proteína de unión a TATA (CACNA1A), cadena opuesta de Ataxina 8, también conocida como ATXN8OS, isoforma de la subunidad B beta reguladora de 55 kDa de serina/treonina-proteína fosfatasa 2A en la ataxia espinocerebelosa (tipo 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12, 17), *FMR1* (retraso mental por X frágil 1) en el síndrome X frágil, *FMR1* (retraso mental por X frágil 1) en el síndrome de ataxia/temblor asociado a X frágil, *FMR1* (retraso mental por X frágil 2) o miembro 2 de la familia AF4/FMR2 en retraso mental por XE frágil; Miotonina proteína quinasa (MT-PK) en distrofia miotónica; Frataxina en la ataxia de Friedreich; un mutante del gen de superóxido dismutasa 1 (SOD1) en la esclerosis lateral amiotrófica; un gen involucrado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y/o la enfermedad de Alzheimer; apolipoproteína B (APOB) y proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), hipercolesterolemia; Tat de HIV, transactivador del virus de la inmunodeficiencia humana del gen de transcripción, en la infección por VIH; TAR de HIV, gen del elemento de respuesta del transactivador del virus de inmunodeficiencia humana, en la infección por VIH; receptor de quimiocina C-C (CCR5) en la infección por VIH; proteína de la nucleocápside del virus del sarcoma de Rous (RSV) en la infección por el RSV, microARN específico de hígado (miR-122) en la infección por el virus de la hepatitis C; p53, lesión renal aguda o retraso de la función del injerto en el trasplante renal o lesión renal en la insuficiencia renal aguda; proteína quinasa N3 (PKN3) en tumores malignos sólidos metastásicos o recurrentes avanzados; LMP2, LMP2 también conocidas como subunidad proteasómica beta-tipo 9 (PSMB 9), melanoma metastásico; LMP7, también conocida como subunidad proteasómica tipo beta 8 (PSMB 8), melanoma metastásico; MECL1 también conocida como subunidad proteasoma beta-tipo 10 (PSMB 10), melanoma metastásico; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en tumores sólidos; proteína del huso de quinesina en tumores sólidos, supresor de la apoptosis de células B/linfoma (BCL-2) en leucemia mieloide crónica; ribonucleótido reductasa M2 (RRM2) en tumores sólidos; Furina en tumores sólidos; quinasa tipo polo 1 (PLK1) en tumores hepáticos, diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) en la infección por hepatitis C, beta-catenina en poliposis adenomatosa familiar; receptor adrenérgico beta2, glaucoma; RTP801/Redd1 también conocida como proteína 4 de transcrito inducible por daño en el ADN, en la edema macular diabético (DME) o la degeneración macular relacionada con la edad; receptor I del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1) en la degeneración macular relacionada con la edad o la neovascularización coroidea, la caspasa 2 en la neuropatía óptica isquémica no arterítica; proteína mutante queratina 6A N17K en paquioniquia congénita; secuencias del genoma/génicas del virus de la gripe A en la infección por gripe; secuencias del genoma/génicas del coronavirus en el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) en la infección por SARS; secuencias del genoma/génicas del virus sincitial respiratorio en la infección por virus sincitial respiratorio; secuencia del genoma/génica del filovirus del Ébola en la infección por Ébola; secuencias del genoma/génicas del virus de la hepatitis B y C en la infección por hepatitis B y C; secuencias del genoma/génicas del virus del herpes simple (HSV) en la infección por HSV, secuencias del genoma/génicas del coxsackievirus B3 en la infección por coxsackievirus B3; silenciamiento de un alelo patogénico de un gen (silenciamiento específico de alelo) como torsina A (TOR1A) en la distonía primaria, alelo pan-clase I y alelo específico de HLA en un trasplante; o gen de la rodopsina mutante (RHO) en la retinitis pigmentaria hereditaria autosómica dominante (adRP).

Como se usa en la presente memoria, el término "recombinante", como un modificador de AAV, tal como AAV-Rh74 recombinante y vectores de AAV relacionados, así como un modificador de secuencias como polinucleótidos y polipéptidos recombinantes, significa que las composiciones han sido manipuladas (es decir, diseñadas) de una manera que generalmente no se da en la naturaleza. Un ejemplo particular de un AAV recombinante sería cuando un

polinucleótido que normalmente no está presente en el AAV de tipo natural está dentro de la partícula y/o genoma del AAV. Por ejemplo, un ejemplo particular de un polinucleótido recombinante sería cuando un polinucleótido (p. ej., un gen) que codifica una proteína se clona en un vector, con o sin regiones 5', 3' y/o intrónicas con las que el gen está normalmente asociado dentro del genoma de AAV. Aunque el término "recombinante" no siempre se usa en la presente memoria en referencia al AAV, tal como AAV-Rh74 y vectores de AAV relacionados, así como secuencias tales como polinucleótidos y polipéptidos, las formas recombinantes de AAV, AAV-Rh74 y vectores de AAV relacionados, y las secuencias que incluyen los polinucleótidos y polipéptidos, se incluyen expresamente a pesar de tal omisión.

Las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la descripción pueden insertarse en un vector. El término "vector" se refiere a un plásmido, virus (p. ej., AAV) u otro vehículo que puede manipularse mediante la inserción o incorporación de un polinucleótido. Dichos vectores se pueden usar para la manipulación genética (es decir, "vectores de clonación"), para introducir/transferir polinucleótidos a las células y para transcribir o traducir el polinucleótido insertado en las células. Un vector generalmente contiene al menos un origen de replicación para la propagación en una célula y un elemento de control de la expresión (por ejemplo, un promotor). Los elementos de control, incluidos los elementos de control de la expresión tal como se exponen en la presente memoria, presentes dentro de un vector se incluyen para facilitar la transcripción adecuada y, si es apropiado, la traducción (por ejemplo, señal de corte y empalme de intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción en el marco de lectura del mRNA, y codones de parada, etc.).

Los vectores que incluyen AAV-Rh74 y los vectores de AAV relacionados de la descripción pueden incluir uno o más "elementos de control de la expresión". Típicamente, los elementos de control de la expresión son secuencias de ácido nucleico, tales como promotores y potenciadores, que influyen en la expresión de un polinucleótido unido de forma operable. Tales elementos típicamente actúan en cis, pero también pueden actuar en trans.

El control de la expresión puede efectuarse a nivel de la transcripción, traducción, corte y empalme, estabilidad del mensajero, etc. Normalmente, un elemento de control de la expresión que modula la transcripción se yuxtapone cerca del extremo 5' del polinucleótido transcrito (es decir, "en posición anterior"). Los elementos de control de la expresión también se pueden ubicar en el extremo 3' de la secuencia transcrita (es decir, en posición posterior) o dentro del transcrito (p. ej., en un intrón). Los elementos de control de la expresión pueden ubicarse a una distancia de la secuencia transcrita (por ejemplo, 100 a 500, 500 a 1000, 2000 a 5000, 5000 a 10,000 o más nucleótidos del polinucleótido), incluso a distancias considerables. Sin embargo, debido a las limitaciones de longitud del polinucleótido, para AAV-Rh74 y los vectores de AAV relacionados, dichos elementos de control de la expresión estarán típicamente dentro de 1 a 1000 nucleótidos del polinucleótido.

Funcionalmente, la expresión del polinucleótido unido de forma operable es controlable al menos en parte mediante el elemento (por ejemplo, promotor), de modo que el elemento modula la transcripción del polinucleótido y, según corresponda, la traducción del transcrito. Un ejemplo específico de un elemento de control de la expresión es un promotor, que generalmente se encuentra en 5' de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de un elemento de control de la expresión es un potenciador, que puede ubicarse en 5', 3' de la secuencia transcrita, o dentro de la secuencia transcrita.

Los elementos y promotores de control de la expresión incluyen aquellos activos en un tipo particular de tejido o célula, denominados en la presente memoria "elementos/promotores de control de la expresión específicos de tejido". Los elementos de control de la expresión específicos de tejido son típicamente activos en células o tejidos específicos (por ejemplo, hígado, cerebro, sistema nervioso central, médula espinal, ojo, retina o pulmón). Los elementos de control de la expresión son típicamente activos en estas células, tejidos u órganos porque son reconocidos por las proteínas activadoras de la transcripción u otros reguladores de la transcripción, que son exclusivos de un tipo específico de célula, tejido u órgano.

Los elementos de control de la expresión también incluyen promotores/potenciadores ubicuos o promiscuos que son capaces de controlar la expresión de un polinucleótido en muchos tipos de células diferentes. Dichos elementos incluyen, entre otros, las secuencias promotoras/potenciadoras tempranas inmediatas del citomegalovirus (CMV), las secuencias promotoras/potenciadoras del virus del sarcoma de Rous (RSV) y los otros promotores/potenciadores virales activos en una variedad de tipos de células de mamíferos, o elementos sintéticos que no están presentes en la naturaleza.

Los elementos de control de la expresión también pueden conferir una expresión que sea regulable, es decir, una señal o estímulo aumenta o disminuye la expresión del polinucleótido unido de forma operable. Un elemento regulable que aumenta la expresión del polinucleótido unido de forma operable en respuesta a una señal o estímulos también se denomina "elemento inducible" (es decir, es inducido por una señal). Los ejemplos particulares incluyen, pero sin limitación, un promotor inducible por hormonas (por ejemplo, esteroides). Un elemento regulable que disminuye la expresión del polinucleótido unido de forma operable en respuesta a una señal o estímulo se denomina "elemento reprimible" (es decir, la señal disminuye la expresión de tal manera que cuando la señal se elimina o está ausente, la expresión aumenta). Típicamente, la cantidad de aumento o disminución conferida por tales elementos es proporcional a la cantidad de señal o estímulo presente; cuanto mayor es la cantidad de señal o estímulo, mayor es el aumento o la disminución de la expresión.

Como se usa en la presente memoria, el término "unión operable" o "unido de manera operable" se refiere a una yuxtaposición física o funcional de los componentes así descritos para permitirles funcionar de la manera prevista. En el ejemplo de un elemento de control de la expresión en unión operable con un polinucleótido, la relación es tal que el elemento de control modula la expresión del ácido nucleico. Más específicamente, por ejemplo, dos secuencias de ADN unidas de forma operable significa que los dos ADN están dispuestos (en *cis* o *trans*) en una relación tal que al menos una de las secuencias de ADN puede ejercer un efecto fisiológico sobre la otra secuencia.

Los vectores que incluyen AAV-Rh74 y los vectores de AAV relacionados de la descripción pueden incluir elementos adicionales de ácido nucleico. Estos elementos incluyen, sin limitación, una o más copias de una secuencia ITR de AAV, un elemento promotor/potenciador, una señal de terminación de la transcripción, regiones no traducidas en 5' o 3' (por ejemplo, secuencias de poliadenilación) que flanquean una secuencia de polinucleótidos, o todo o una parte del intrón I. Tales elementos también incluyen opcionalmente una señal de terminación de la transcripción. Un ejemplo particular no limitante de una señal de terminación de la transcripción es la señal de terminación de la transcripción de SV40.

La inclusión de un elemento intrónico puede mejorar la expresión en comparación con la expresión en ausencia del elemento intrónico (Kurachi et al., 1995, anteriormente mencionado). Los vectores de AAV generalmente aceptan insertos de ADN que tienen un rango definido de tamaños que generalmente es de aproximadamente 4 kb a aproximadamente 5,2 kb, o un poco más. Por lo tanto, para las secuencias más cortas, puede ser necesario incluir un ácido nucleico adicional en el fragmento del inserto para lograr la longitud requerida que sea aceptable para el vector de AAV. Los intrones y los fragmentos intrónicos (por ejemplo, la porción del intrón I de FIX) cumplen este requisito, al mismo tiempo que mejoran la expresión. Por lo tanto, la invención no se limita a la inclusión de secuencias de intrón I en el vector de AAV, e incluye otros intrones u otras secuencias de ADN en lugar de porciones del intrón I. En consecuencia, se pueden usar otras regiones de ácido nucleico no traducidas de 5' y 3' en lugar de las citadas para FIX humano, particularmente cuando se usan polinucleótidos que codifican proteínas distintas de FIX humano en el AAV-Rh74 y los vectores de AAV relacionados de la descripción.

Una "porción del intrón I", como se usa en la presente memoria, significa una región del intrón I que tiene una longitud de nucleótidos de aproximadamente 0,1 kb a aproximadamente 1,7 kb, cuya región mejora la expresión de FIX, típicamente en aproximadamente 1,5 veces o más en un plásmido o molde de vector viral en comparación con la expresión de FIX en ausencia de una porción del intrón I. Una porción más específica es una porción de 1,3 kb del intrón 1.

Los polinucleótidos y polipéptidos que incluyen formas modificadas pueden prepararse usando diversas técnicas de clonación estándar, ADN recombinante, mediante expresión celular o traducción *in vitro* y técnicas de síntesis química. La pureza de los polinucleótidos se puede determinar mediante secuenciación, electroforesis en gel y similares. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden aislarse usando hibridación o técnicas de cribado de bases de datos informáticas. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación: (1) hibridación de bibliotecas de ADN genómico o cADN con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogas; (2) detección de anticuerpos para detectar polipéptidos que tienen características estructurales compartidas, por ejemplo, usando una biblioteca de expresión; (3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ADN genómico o cADN usando cebadores capaces de hibridarse con una secuencia de ácido nucleico de interés; (4) búsquedas informáticas en bases de datos de secuencias para secuencias relacionadas; y (5) cribado diferencial de una biblioteca de ácido nucleico sustraída.

Los polinucleótidos y polipéptidos que incluyen formas modificadas también se pueden producir mediante síntesis química usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, un aparato de síntesis automatizado (véase, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA). Los péptidos se pueden sintetizar, completamente o parcialmente, utilizando métodos químicos (véase, por ejemplo, Caruthers (1980). Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215; Horn (1980); y Banga, A.K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA). La síntesis de péptidos puede realizarse usando diversas técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Roberge Science 269: 202 (1995); Merrifield, Methods Enzymol. 289: 3 (1997)), y se puede lograr la síntesis automatizada, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 431A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El término "aislado", cuando se usa como modificador de una composición, significa que las composiciones están hechas por la mano del hombre o están separadas, completamente o al menos en parte, de su entorno natural *in vivo*. Generalmente, las composiciones aisladas están sustancialmente exentas de uno o más materiales con los que normalmente están asociadas en la naturaleza, por ejemplo, una o más proteínas, ácido nucleico, lípidos, carbohidratos, membrana celular. El término "aislado" no excluye las formas físicas alternativas de la composición, tales como fusiones/quimeras, multímeros/oligómeros, modificaciones (por ejemplo, fosforilación, glicosilación, lipidación) o formas derivatizadas, o formas expresadas en células huésped producidas por la mano del hombre.

De acuerdo con la descripción, se proporcionan métodos y usos de tratamiento, que incluyen los métodos y usos terapéuticos. Los métodos y usos de la descripción son ampliamente aplicables a las enfermedades susceptibles de tratamiento mediante la introducción de un gen que codifica una proteína, o aumentando o estimulando la expresión o función del gen, por ejemplo, la adición o sustitución de genes. Los métodos y usos de la descripción también son ampliamente aplicables a enfermedades susceptibles de tratamiento mediante la reducción o disminución de la

expresión o función génica, por ejemplo, la inactivación génica o la reducción de la expresión génica.

Los ejemplos particulares no limitantes de enfermedades tratables de acuerdo con la descripción incluyen las expuestas en la presente memoria, así como una enfermedad pulmonar (por ejemplo, fibrosis quística), un trastorno de la coagulación sanguínea o hemorrágico (por ejemplo, hemofilia A o hemofilia B con o sin inhibidores), talasemia, un trastorno sanguíneo (p. ej., anemia), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), epilepsia, enfermedades de almacenamiento lisosómico, trastornos de acumulación de cobre o hierro (p. ej., enfermedad de Wilson o de Menkes), deficiencia de lipasa ácida lisosómica, un trastorno neurológico o neurodegenerativo, cáncer, diabetes tipo 1 o tipo 2, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina desaminasa, un defecto metabólico (p. ej., enfermedades del almacenamiento de glucógeno), una enfermedad degenerativa de la retina (como deficiencia de RPE65, coroideremia y otras enfermedades oculares) y una enfermedad de un órgano sólido (p. ej., cerebro, hígado, riñón, corazón).

Por lo tanto, en la presente memoria se describe un método que incluye: (a) proporcionar un vector de virus adenoasociado (AAV), y dicho vector comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína, en el que la secuencia polinucleotídica heteróloga está unida de forma operable a un elemento de control de la expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia polinucleotídica; y (b) administrar una cantidad del vector de AAV al mamífero, en el que dicha proteína se expresa en el mamífero. En los ejemplos particulares, la expresión de la proteína proporciona un beneficio terapéutico al mamífero.

Los métodos de la descripción incluyen los métodos de tratamiento, que dan como resultado cualquier efecto terapéutico o beneficioso. En varios ejemplos de los métodos, los métodos de la descripción incluyen además inhibir, disminuir o reducir uno o más síntomas adversos (p. ej., físicos), trastornos, enfermedades, enfermedades o complicaciones causadas o asociadas con la enfermedad, tal como tiempo reducido de coagulación sanguínea, dosis reducida de administración de proteína suplementaria de factor de coagulación.

Por lo tanto, un efecto terapéutico o beneficioso del tratamiento como se describe en la presente memoria es cualquier mejora o beneficio objetivo o subjetivo medible o detectable proporcionado a un sujeto particular. Un efecto terapéutico o beneficioso puede ser, pero no necesariamente, la eliminación completa de todos o cualquier síntoma adverso particular, trastorno, enfermedad o complicación de una enfermedad. Por lo tanto, se alcanza un resultado clínico satisfactorio cuando hay una mejora creciente o una reducción parcial de un síntoma adverso, trastorno, enfermedad o complicación causada o asociada con una enfermedad, o una inhibición, disminución, reducción, supresión, prevención, límite o control del empeoramiento o la progresión de uno o más síntomas adversos, trastornos, enfermedades o complicaciones causadas o asociadas con la enfermedad, durante un período corto o largo (horas, días, semanas, meses, etc.).

Las composiciones para el uso de acuerdo con la invención pueden administrarse en una cantidad suficiente o efectiva a un sujeto que lo necesite. Una "cantidad efectiva" o "cantidad suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona, en dosis únicas o múltiples, sola o en combinación con otra u otras composiciones (agentes terapéuticos, como un fármaco), tratamientos, protocolos o agentes de regímenes terapéuticos, una respuesta detectable de cualquier duración de tiempo (a largo o corto plazo), un resultado esperado o deseado o un beneficio para un sujeto de cualquier grado medible o detectable o de cualquier duración de tiempo (por ejemplo, durante minutos, horas, días, meses, años, o curación).

La dosis del vector de AAV para lograr un efecto terapéutico, p. ej., la dosis en genomas de vector/por kilogramo de peso corporal (vg/kg), variará en función de varios factores que incluyen, entre otros: la vía de administración, el nivel de expresión de los polinucleótidos heterólogos requerido para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad específica tratada, cualquier respuesta inmune del huésped al vector de AAV, una respuesta inmune del huésped al polinucleótido heterólogo o al producto de expresión (proteína), y la estabilidad de la proteína expresada. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un rango de dosis de viriones de AAV para tratar a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno particular basándose en los factores mencionados anteriormente, así como otros factores. En general, las dosis variarán en al menos 1×10^8 o más, por ejemplo, 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} o 1×10^{14} , o más, genomas de vector por kilogramo (vg/kg) de peso del sujeto, para lograr un efecto terapéutico.

Usando la hemofilia como ejemplo, en términos generales, se cree que, para lograr un efecto terapéutico, se necesita una concentración de factor de coagulación sanguínea que sea mayor que el 1% de la concentración de factor encontrada en un individuo normal para cambiar un fenotipo de enfermedad grave por uno moderado. Un fenotipo grave se caracteriza por daño articular y hemorragias potencialmente mortales. Para convertir un fenotipo de enfermedad moderada en uno leve, se cree que se necesita una concentración de factor de coagulación sanguínea superior al 5% de lo normal. Con respecto al tratamiento de un sujeto hemofílico de este tipo, una dosis típica es de al menos 1×10^{10} genomas de vector (vg) por kilogramo (vg/kg) de peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{10} y 1×10^{11} vg/kg de peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{11} y 1×10^{12} vg/kg de peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{12} y 1×10^{13} vg/kg de peso del sujeto, para lograr un efecto terapéutico deseado.

Las dosis de una "cantidad efectiva" o "cantidad suficiente" para el tratamiento (p. ej., para mejorar o proporcionar un beneficio o mejora terapéutica) generalmente son efectivas para proporcionar una respuesta a uno, varios o todos los síntomas adversos, consecuencias o complicaciones de la enfermedad, uno o más síntomas adversos, trastornos,

enfermedades, patologías o complicaciones, por ejemplo, causadas o asociadas con la enfermedad, en un grado medible, aunque disminuir, reducir, inhibir, suprimir, limitar o controlar la progresión o el empeoramiento de la enfermedad es un resultado satisfactorio.

Una cantidad efectiva o una cantidad suficiente puede proporcionarse, pero no necesariamente, en una sola administración, puede requerir múltiples administraciones y puede administrarse, pero no necesariamente, sola o en combinación con otra composición (por ejemplo, agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico. Por ejemplo, la cantidad puede aumentarse proporcionalmente según lo indique la necesidad del sujeto, el tipo, el estado y la gravedad de la enfermedad tratada o los efectos secundarios (si los hay) del tratamiento. Además, una cantidad efectiva o una cantidad suficiente no necesita ser efectiva o suficiente si se administra en dosis únicas o múltiples sin una segunda composición (por ejemplo, otro fármaco o agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico, ya que pueden incluirse dosis adicionales, cantidades o duración por encima y más allá de tales dosis, o composiciones adicionales (p. ej., fármacos o agentes), tratamientos, protocolos o regímenes terapéuticos para considerarlas efectivas o suficientes en un sujeto dado. Las cantidades consideradas efectivas también incluyen cantidades que dan como resultado una reducción del uso de otro tratamiento, régimen terapéutico o protocolo, como la administración de una proteína de factor de coagulación recombinante para el tratamiento de un trastorno de la coagulación (p. ej., hemofilia A o B).

No es necesario que una cantidad efectiva o una cantidad suficiente sea efectiva en todos y cada uno de los sujetos tratados, ni en la mayoría de los sujetos tratados en un grupo o población dada. Una cantidad efectiva o una cantidad suficiente significa efectividad o suficiencia en un sujeto en particular, no en un grupo o en la población general. Como es típico para tales métodos, algunos sujetos exhibirán una mayor respuesta, o una respuesta menor o nula a un método o uso de tratamiento dado. Por lo tanto, las cantidades apropiadas dependerán de la afección tratada, el efecto terapéutico deseado, así como del sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad dentro del sujeto, género, edad, etc.).

El término "mejorar" significa una mejora detectable o medible en la enfermedad de un sujeto o un síntoma de la misma, o una respuesta celular subyacente. Una mejora detectable o medible incluye una disminución, reducción, inhibición, supresión, límite o control subjetivo u objetivo de la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración de la enfermedad, o una complicación causada o asociada con la enfermedad, o una mejora en un síntoma o una causa subyacente o una consecuencia de la enfermedad, o una reversión de la enfermedad.

Por lo tanto, un resultado eficaz del tratamiento puede conducir a un "efecto terapéutico" o "beneficio" de disminuir, reducir, inhibir, suprimir, limitar, controlar o prevenir la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración de una enfermedad, o uno o más síntomas adversos o causas subyacentes o consecuencias de la enfermedad en un sujeto. Por lo tanto, los métodos de tratamiento y los usos que afectan a una o más causas subyacentes de la enfermedad o síntomas adversos se consideran beneficiosos. Una disminución o reducción en el empeoramiento, como la estabilización de la enfermedad, o un síntoma adverso de la misma, también es un resultado eficaz del tratamiento.

Por lo tanto, no es necesario que un beneficio o mejora terapéutica sea la eliminación completa de la enfermedad, o cualquiera, la mayoría o todos los síntomas adversos, complicaciones, consecuencias o causas subyacentes asociadas con la enfermedad. Por lo tanto, se logra un resultado satisfactorio cuando hay una mejora creciente en una enfermedad de un sujeto, o una disminución, reducción, inhibición, supresión, límite, control o prevención parcial de la ocurrencia, frecuencia, gravedad, progresión o duración, o la inhibición o reversión de la enfermedad (p. ej., estabilizando uno o más síntomas o complicaciones), durante un período de tiempo corto o largo (horas, días, semanas, meses, etc.). La eficacia de un método o uso, como un tratamiento que proporciona un beneficio terapéutico potencial o una mejora de una enfermedad, puede determinarse mediante varios métodos.

Las composiciones para el uso de acuerdo con la invención se pueden combinar con cualquier compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen o protocolo terapéutico que tenga una actividad o efecto terapéutico, beneficioso, aditivo, sinérgico o complementario deseado. Las composiciones combinadas ejemplares incluyen segundos agentes activos, tales como productos biológicos (proteínas), agentes y fármacos. Solo a modo de ilustración, dichos productos biológicos (proteínas), agentes, medicamentos, tratamientos y terapias se pueden administrar o realizar antes, sustancialmente de forma contemporánea o siguiendo cualquier otro método o uso descrito en la presente memoria, por ejemplo, un método terapéutico para tratar en un sujeto una enfermedad de la coagulación sanguínea.

Solo a modo de ilustración, el compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen terapéutico o protocolo puede administrarse como una composición combinada, o administrarse por separado, tal como concurrentemente o en serie o secuencialmente (antes o después) de un vector de AAV descrito en la presente memoria. Por lo tanto, la invención proporciona combinaciones en las que la composición para el uso de la invención está en combinación con cualquier compuesto, agente, fármaco, remedio o composición, expuestos en la presente memoria o conocidos por un experto en la técnica.

Los métodos y usos descritos en la presente memoria también incluyen, entre otras cosas, métodos y usos que dan como resultado una menor necesidad o uso de otro compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso o remedio. Por lo tanto, para una enfermedad de la coagulación sanguínea, una composición para el uso de la invención tiene un beneficio terapéutico si en un sujeto dado una dosis menos frecuente o reducida o la eliminación de la administración de una proteína de factor de coagulación recombinante suplementa el factor de

coagulación endógeno deficiente o defectuoso (anormal o mutante) en el sujeto. Por lo tanto, las composiciones para el uso de la invención pueden usarse adicionalmente para reducir la necesidad o el uso de otro tratamiento o terapia.

El término "sujeto" se refiere a un animal, típicamente un mamífero, como humanos, primates no humanos (simios, gibones, gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (aves de corral como pollos y patos, caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos) y animales de experimentación (ratón, rata, conejo, conejillo de Indias). Los sujetos incluyen modelos de enfermedades animales, por ejemplo, ratones y otros modelos animales de enfermedades de la coagulación sanguínea y otros conocidos por los expertos en la técnica.

Los sujetos apropiados para el tratamiento con una composición para el uso de acuerdo con la invención incluyen aquellos que tienen o corren el riesgo de producir una cantidad insuficiente o que tienen una deficiencia en un producto génico funcional (proteína), o producen un producto génico anormal, parcialmente funcional o no funcional (proteína), que puede conducir a la enfermedad. Por lo tanto, los sujetos de interés incluyen los sujetos que tienen tales defectos, independientemente del tipo de enfermedad, el momento o el grado de inicio, la progresión, la gravedad, la frecuencia o el tipo o duración de los síntomas.

Los sujetos apropiados para el tratamiento con una composición para el uso según la invención también incluyen aquellos que tienen o corren el riesgo de producir anticuerpos contra el AAV. Los vectores de AAV pueden administrarse a tales sujetos usando varias técnicas. Por ejemplo, el AAV con cápside vacía (es decir, el AAV que carece de un polinucleótido heterólogo) puede administrarse para unirse a los anticuerpos hacia el AAV, permitiendo así que el vector de AAV que porta el polinucleótido heterólogo transforme las células del sujeto. Las cantidades de AAV con cápside vacía a administrar pueden calibrarse en función de la cantidad de anticuerpos contra AAV producidos en un sujeto particular. Alternativamente o además, el vector de AAV puede administrarse mediante inyección intramuscular directa (por ejemplo, una o más fibras de contracción lenta de un músculo). En otra alternativa, se puede usar un catéter introducido en la arteria femoral para administrar los vectores de AAV en el hígado a través de la arteria hepática. También se pueden emplear medios no quirúrgicos, como la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), para administrar vectores de AAV directamente en el hígado, evitando así el torrente sanguíneo y los anticuerpos hacia AAV. Otros sistemas ductales, como los conductos de la glándula submandibular, también pueden usarse como portales para administrar los vectores de AAV a un sujeto con anticuerpos anti-AAV preexistentes.

La "profilaxis" y las variaciones gramaticales de la misma significan un método en el que el contacto, la administración o la administración *in vivo* a un sujeto es anterior a la enfermedad. La administración *in vivo* a un sujeto se puede realizar antes del desarrollo de un síntoma adverso, afección, complicación, etc. causada o asociada con la enfermedad. Por ejemplo, se puede usar un cribado (por ejemplo, genético) para identificar a tales sujetos como candidatos para el tratamiento con una composición para el uso de acuerdo con la invención, pero el sujeto puede no manifestar la enfermedad. Tales sujetos, por lo tanto, incluyen aquellos seleccionados como positivos para una cantidad insuficiente o una deficiencia en un producto génico funcional (proteína), o que producen un producto génico (proteína) anormal, parcialmente funcional o no funcional, que puede conducir a la enfermedad; y los sujetos que dan positivo para un producto génico (proteína) anormal o defectuoso (mutante) que conduce a la enfermedad, a pesar de que dichos sujetos no manifiestan los síntomas de la enfermedad.

Solo a modo de ejemplo, la administración pueden ser sistémica, regional o local, o por cualquier vía, por ejemplo, mediante inyección, infusión, por vía oral (p. ej., ingestión o inhalación) o tópica (p. ej., transdérmica). Dicha administración incluye la vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intracavitaria, intracraneal, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo, transmucosa o rectal. Las vías de administración ejemplares incluyen la intravenosa (iv), intraperitoneal (ip), intraarterial, intramuscular, parenteral, subcutánea, intrapleur, tópica, dérmica, intradérmica, transdérmica, parenteral, por ejemplo, transmucosa, intracraneal, intraespinal, oral (alimentaria), mucosa, por la respiración, intranasal, mediante intubación, intrapulmonar, mediante instilación intrapulmonar, bucal, sublingual, intravascular, intratecal, intracavitaria, iontoforética, intraocular, oftálmica, óptica, intraglandular, intraorgánica, intralinfática.

Las dosis para la administración pueden basarse en protocolos existentes en la actualidad, determinados empíricamente, utilizando modelos de enfermedades animales u opcionalmente en ensayos clínicos en humanos. Las dosis iniciales del estudio se pueden basar en los estudios en animales expuestos en la presente memoria, para un ratón o perro, por ejemplo.

Las dosis pueden variar y dependen de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, el tipo, el inicio, la progresión, la gravedad, la frecuencia, la duración o la probabilidad de la enfermedad a la que se dirige el tratamiento, el resultado clínico deseado, los tratamientos previos o simultáneos, la salud general, la edad, el sexo, la raza o la competencia inmunológica del sujeto y otros factores que apreciará el experto en la técnica. La cantidad, el número, la frecuencia o la duración de la dosis pueden aumentarse o reducirse proporcionalmente, según lo indicado por cualquier efecto secundario adverso, las complicaciones u otros factores de riesgo del tratamiento o la terapia y el estado del sujeto. El experto en la técnica apreciará los factores que pueden influir en la dosis y el tiempo requeridos para proporcionar una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico.

Los métodos y usos descritos en la presente memoria se pueden poner en práctica dentro de 1-2, 2-4, 4-12, 12-24 o

24-72 horas después de que se haya identificado que un sujeto tiene la enfermedad seleccionada como objetivo para el tratamiento, tiene uno o más síntomas de la enfermedad, o se haya sometido a cribado e identificado como positivo, tal como se establece en la presente memoria, aunque el sujeto no tenga uno o más síntomas de la enfermedad. Por supuesto, los métodos y usos descritos en la presente memoria se pueden poner en práctica 1-7, 7-14, 14-21, 21-48 o más días, meses o años después de que un sujeto se haya identificado por tener la enfermedad seleccionada como objetivo para el tratamiento, tenga uno o más síntomas de la enfermedad, o se haya examinado e identificado como positivo, como se establece en la presente memoria.

Los vectores de AAV y otras composiciones, agentes, fármacos, productos biológicos (proteínas) pueden incorporarse en las composiciones farmacéuticas, p. ej., un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas son útiles, entre otras cosas, para la administración a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

Como se usan en la presente memoria, las expresiones "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" significan una formulación biológicamente aceptable, gaseosa, líquida o sólida, o una mezcla de las mismas, que es adecuada para una o más vías de administración, administración o contacto *in vivo*. Dichas formulaciones incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), disoluciones (acuosas o no acuosas), emulsiones (p. ej., aceite en agua o agua en aceite), suspensiones, jarabes, elixires, medios de dispersión y suspensión, recubrimientos, agentes isotónicos y promotores o retardadores de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica o el contacto o administración *in vivo*. Los disolventes, disoluciones y suspensiones acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen comprimidos (recubiertos o no recubiertos), cápsulas (duras o blandas), microesferas, polvos, gránulos y cristales. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios (por ejemplo, conservantes, agentes antibacterianos, antivirales y antifúngicos) a las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para que sean compatibles con una ruta particular de administración, como se establece en la presente memoria o como conoce un experto en la técnica. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas incluyen vehículos, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por diversas rutas.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden disoluciones, suspensiones o emulsiones acuosas y no acuosas del compuesto activo, cuyas preparaciones son típicamente estériles y pueden ser isotónicas con la sangre del receptor deseado. Los ejemplos ilustrativos no limitantes incluyen agua, solución salina, dextrosa, fructosa, etanol, aceites animales, vegetales o sintéticos.

Para la administración transmucosa o transdérmica (por ejemplo, contacto tópico), se pueden incluir agentes penetrantes en la composición farmacéutica. Los agentes penetrantes se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Para la administración transdérmica, el ingrediente activo puede formularse en aerosoles, esprays, pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Para el contacto con la piel, las composiciones farmacéuticas incluyen típicamente pomadas, cremas, lociones, pastas, geles, esprays, aerosoles o aceites. Los vehículos que pueden usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos y combinaciones de los mismos.

Se pueden añadir codisolventes y adyuvantes a la formulación. Los ejemplos no limitantes de codisolventes contienen grupos hidroxilo u otros grupos polares, por ejemplo, alcoholes, tales como alcohol isopropílico; glicoles, tales como propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, éter de glicol; glicerol; polialcoholes de oxietileno y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno. Los adyuvantes incluyen, por ejemplo, tensioactivos tales como lecitina de soja y ácido oleico; ésteres de sorbitán tales como trioleato de sorbitán; y polivinilpirrolidona.

Las formulaciones farmacéuticas y los sistemas de administración apropiados para las composiciones para el uso de la invención se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12ª ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel y Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; y Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., págs. 253-315).

Una "forma farmacéutica unitaria", como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada opcionalmente en asociación con un vehículo farmacéutico (excipiente, diluyente, vehículo o agente de relleno) que, cuando se administra en una o más dosis, se calcula que produzca un efecto deseado (por ejemplo, efecto profiláctico o terapéutico). Las formas farmacéuticas unitarias pueden estar, por ejemplo, en ampollas y viales, que pueden incluir una composición líquida, o una composición en estado liofilizado; se puede añadir un vehículo líquido estéril, por ejemplo, antes de la administración *in vivo*. Las formas farmacéuticas unitarias individuales se pueden incluir en kits o envases multidosis. Las formulaciones farmacéuticas pueden envasarse en una forma farmacéutica unitaria o múltiple para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación.

También se describen en la presente memoria kits con un material de embalaje y uno o más componentes en el mismo. Un kit normalmente incluye una etiqueta o un prospecto que incluye una descripción de los componentes o instrucciones para el uso *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* de los componentes que contiene. Un kit puede contener una colección de dichos componentes, p. ej., un vector de AAV y opcionalmente un segundo ingrediente activo, tal como otro compuesto, agente, fármaco o composición.

El término "material de embalaje" se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de embalaje puede mantener los componentes de forma estéril, y puede estar hecho de un material comúnmente utilizado para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, viales, tubos, etc.).

Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información de identificación de uno o más componentes, cantidades de dosis, farmacología clínica de los ingredientes activos, incluido el mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinámica. Las etiquetas o prospectos pueden incluir información de identificación del fabricante, números de lote, ubicación y fecha de fabricación, fechas de caducidad. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información que identifique la información del fabricante, los números de lote, la ubicación y la fecha de fabricación. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre una enfermedad para la cual se puede usar un componente del kit. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir instrucciones para que el médico o el sujeto usen uno o más de los componentes del kit en un método, uso o protocolo de tratamiento o régimen terapéutico. Las instrucciones pueden incluir cantidades de dosis, frecuencia o duración, e instrucciones para poner en práctica cualquiera de los métodos, usos, protocolos de tratamiento o regímenes profilácticos o terapéuticos descritos en la presente memoria.

Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre cualquier beneficio que un componente pueda proporcionar, como un beneficio profiláctico o terapéutico. Las etiquetas o los prospectos pueden incluir información sobre posibles efectos secundarios adversos, complicaciones o reacciones, tales como advertencias al sujeto o al médico con respecto a las situaciones en las que no sería apropiado usar una composición en particular. Los efectos secundarios adversos o las complicaciones también pueden ocurrir cuando el sujeto tiene, tomará o esté tomando uno o más medicamentos que pueden ser incompatibles con la composición, o si el sujeto ha recibido o recibirá otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico que sería incompatible con la composición y, por lo tanto, las instrucciones podrían incluir información sobre tales incompatibilidades.

Las etiquetas o prospectos incluyen "material impreso", p. ej., papel o cartón, separado o fijado a un componente, un kit o material de embalaje (por ejemplo, una caja), o unido a una ampolla, tubo o vial que contiene un componente del kit. Las etiquetas o prospectos pueden incluir adicionalmente un medio legible por ordenador, como una etiqueta impresa con un código de barras, un disco, un disco óptico como un CD o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, cinta magnética o un medio de almacenamiento eléctrico como RAM y ROM o híbridos de estos, como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos, medios FLASH o tarjetas de memoria.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen en la presente memoria.

Todas las características descritas en la presente memoria pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica descrita en la memoria descriptiva se puede sustituir por una característica alternativa que tenga un mismo propósito, equivalente o similar. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, las características descritas (por ejemplo, estructuras de compuestos) son un ejemplo de un género de características equivalentes o similares.

Como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un(a)", "y" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un polinucleótido" incluye una pluralidad de tales polinucleótidos, tal como una pluralidad de genes.

Como se usan en la presente memoria, todos los valores numéricos o rangos numéricos incluyen los números enteros dentro de tales rangos y las fracciones de los valores o los números enteros dentro de los rangos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, como ilustración, la referencia al menos a un 90% de identidad incluye un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, 98%, 99%, etc., así como 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5%, etc., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5%, etc., y así sucesivamente.

La referencia a un número con más (mayor) o menos que incluye cualquier número mayor o menor que el número de referencia, respectivamente. Así, por ejemplo, una referencia a menos de 1.000 incluye 999, 998, 997, etc. hasta el número uno (1); y menos de 100, incluye 99, 98, 97, etc. hasta el número uno (1).

Como se usa en la presente memoria, todos los valores numéricos o rangos incluyen las fracciones de los valores y los enteros dentro de dichos rangos, y las fracciones de los enteros dentro de dichos rangos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, como ilustración, la referencia a un rango numérico, como un rango porcentual, 90-100%, incluye el 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, etc., así como 91,1%, 91,2%, 91,3%, 91,4%, 91,5%, etc., 92,1%, 92,2%, 92,3%, 92,4%, 92,5%, etc., y así sucesivamente. La referencia a un rango de 1-50, por lo tanto, incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc., así como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, etc.,

2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, etc., y así sucesivamente.

La referencia a una serie de rangos incluye los rangos que combinan los valores de los límites de los diferentes rangos dentro de la serie. Por lo tanto, como ilustración, la referencia a una serie de rangos de 2-72 horas, 2-48 horas, 4-24 horas, 4-18 horas y 6-12 horas, incluye los rangos de 2-6 horas, 2-12 horas, 2-18 horas, 2-24 horas, etc., y 4-27 horas, 4-48 horas, 4-6 horas, etc.

La invención se describe generalmente en la presente memoria usando un lenguaje afirmativo para describir las numerosas realizaciones y aspectos. La invención también incluye específicamente las realizaciones en las que se excluye la materia particular, en su totalidad o en parte, tales como sustancias o materiales, etapas y condiciones del método, protocolos o procedimientos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones o aspectos de la invención, se excluyen los materiales y/o etapas del método. Por lo tanto, aunque la invención generalmente no se expresa en la presente memoria en términos de lo que la invención no incluye, los aspectos que no están expresamente excluidos en la invención, sin embargo, se describen en la presente memoria.

Se han descrito varias realizaciones de la invención. Los siguientes ejemplos tienen la intención de ilustrar, pero no limitar, el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo incluye una descripción de varios materiales y métodos.

Ratones: Ratones C57BL/6J (TN) macho de 8-10 semanas de edad, n = 5 por grupo experimental. El perro es un perro HB de la colonia Chapel Hill de la Universidad de Carolina del Norte que porta una mutación sin sentido en el gen FIX (Evans et al., Proc Natl Acad Sci USA 86: 10095 (1989)).

Construcciones de vectores de AAV: Los estudios in vivo en ratones se realizaron usando una construcción que expresa FIX humano bajo control del promotor específico de hígado ApoE-hAAT. El estudio en perros utilizó un promotor casi idéntico y el transgén FIX canino.

Metodología de transferencia génica: Todos los vectores se administraron por vía intravenosa. En los ratones a través de la vena de la cola (se administró un volumen de 200 microlitros por ratón, el vector se diluyó en PBS). En los perros, el vector se administró a través de la vena safena.

Determinación de la expresión de FIX: Se utilizó un ELISA para medir los niveles de FIX. En ratones, el par de anticuerpos de ELISA de FIX humanos (captura y secundario) es de Affinity Biologicals. En perros, se usó un par de anticuerpos también de Affinity Biologicals como se describe en Haurigot et al. (Mol Ther 18: 1318 (2010)).

Análisis estadístico: El análisis estadístico se realizó con una prueba t bilateral para datos independientes. Los valores de p <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Mediciones de anticuerpos contra AAV: Se usó un ensayo de neutralización in vitro descrito en Manno et al., (Nat Med 12: 342 (2006)) y Mingozzi et al. (Nat Med 13: 419 (2007)) para la medición de anticuerpos. En resumen, se usaron dos construcciones de vectores de AAV en el ensayo, un vector monocatenario que expresaba β -galactosidasa bajo control del promotor de CMV (ssAAV-LacZ), o un vector autocomplementario que expresaba el gen indicador de Renilla, AAV-Rh74-CBA-Renilla, bajo control del promotor de β -actina de pollo (CBA). Para aumentar la eficiencia de la transducción de vectores de AAV *in vitro*, se usaron células 2V6.11 (ATCC), que expresaron el gen adenoviral E4 bajo control de un promotor inducible. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de $1,25 \times 10^4$ células/pocillo y se añadió una dilución 1:1000 de ponasterona A (Invitrogen) al medio para inducir la expresión de E4. El día del ensayo, las diluciones semilogarítmicas en serie del suero de ensayo inactivado térmicamente se mezclaron con medio que contenía virus. Para el vector ssAAV-LacZ, la concentración de virus utilizada en el ensayo fue de $\sim 1 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV2 y $\sim 5,5 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV5, 6 u 8. Para el vector scAAV-Luc, la concentración de virus en el ensayo fue entre -50 y 150 veces menor. La actividad residual del transgén indicador se midió usando un ensayo colorimétrico (ssAAV-LacZ) o un luminómetro (scAAV-Luc).

Las subclases de IgG o Ig total anti-cápside de AAV se midieron con un ensayo de captura; las placas de ELISA se recubrieron con 5×10^{10} partículas de cápside/ml de cápsides vacías de AAV. Las placas se bloquearon con BSA al 2%, Tween 20 al 0,05% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, y se cargaron diluciones en serie de las muestras en los pocillos y se incubaron durante la noche a 4 °C. Se utilizaron anticuerpos anti-IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM humana conjugados con biotina como anticuerpos de detección; se añadió estreptavidina-HRP para la detección del sustrato. La concentración de Ig se determinó frente a curvas patrón hechas con una dilución en serie de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM purificadas (Sigma).

Producción de AAV: El proceso para la producción de vectores se describe con detalle en Ayuso et al. (Gene Ther 17: 503 (2010)).

Ejemplo 2

Este ejemplo incluye una descripción de los estudios en animales de transferencia de genes FIX humanos (ratones) y la expresión de FIX después de la transferencia de los genes.

- 5 A los ratones C57BL/6 (n = 5 por grupo) se les inyectaron a través de la vena de la cola vectores de AAV que portaban el gen de Factor IX (FIX) (2,5¹⁰ genomas de vectores por ratón) bajo control de un promotor específico de hígado. Se determinaron los niveles plasmáticos del producto transgénico de FIX humano (proteína) en los ratones mediante ELISA en las semanas 1, 2 y 4 tras la transferencia génica, y se ilustran en la Figura 1. AAV-Rh74 mostró el nivel más alto de expresión transgénica en los animales.

Ejemplo 3

- 10 *Este ejemplo incluye una descripción de los estudios en animales y datos que demuestran la administración efectiva de FIX mediada por AAV-Rh74 a niveles terapéuticos en perros con hemofilia.*

- 15 En resumen, a los perros con hemofilia B se les infundieron por vía intravenosa (IV) a través de la vena safena 3 x 10¹² genomas de vectores por kg de peso. La expresión del transgén terapéutico FIX estaba controlada por un promotor específico de hígado. Los vectores y los niveles de FIX se monitorizaron mediante ELISA. Los niveles plasmáticos de FIX canino se muestran en la Figura 2. AAV-Rh74 y AAV8 tuvieron un rendimiento similar en los perros con hemofilia B, y ambos fueron superiores a AAV6.

Ejemplo 4

Este ejemplo incluye una descripción de los estudios que muestran la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-AAV (NAb) en humanos.

- 20 Los datos de la Tabla 1 muestran los anticuerpos neutralizantes anti-AAV (NAb) medidos en humanos con un ensayo *in vitro*. Los sujetos con un título de NAb de 1:1 se definen como no sensibilizados o de bajo título para los anticuerpos anti-AAV, y son elegibles para la transferencia génica para ese serotipo de AAV (resaltado en gris). AAV-Rh74 exhibió la menor prevalencia de NAb anti-AAV en comparación con AAV-2 y AAV-8.

Tabla 1

ID del sujeto	NAb de AAV2	NAb de AAV8	NAb de AAV-Rh74
Genlmm 005	<1:3,16	1:1	1:1
Genlmm 006	1:31,6-1:100	1:10-1:31,6	1:31,6-1:100
Genlmm 015	1:3,1-1:10	1:1	1:1
Genlmm 016	1:10-1:31,6	1:31,6-1:100	1:31,6-1:100
Genlmm 017	>1:3160	>3160	>1:3160
Genlmm 028	1:3,1-1:10	1:10-1:31,6	1:1
Genlmm 035	>1:3160	1:100-1:316	1:316-1:1000
Genlmm 040	1:1	1:1	1:1
Genlmm 049	1:1	1:3,1-1:10	1:3,1-1:10
Genlmm 053	1:3160	1:31,6-1:100	1:316-1:1000
Genlmm 054	1:1000-1:3160	1:10-1:31,6	1:31,6-1:100
Genlmm 055	1:1000-1:3160	1:31,6-1:100	1:100-1:316
Genlmm 056	1:10-1:31,6	1:10-1:31,6	1:3,1-1:10
Genlmm 058	1:3,1-1:10	1:1	1:1
Genlmm 060	>1:3160	1:1000-1:3160	1:1000-1:3160
Genlmm 068	1:3160	1:316-1:1000	1:316-1:1000
Genlmm 069	>1:3160	>1:3160	>1:3160
Genlmm 070	1:10-1:31,6	1:1	1:1
Genlmm 072	1:3,1-1:10	1:100-1:316	1:1
Genlmm 074	1:3160	1:100-1:316	1:316-1:1000
Genlmm 075	1:316-1:1000	1:31,6-1:100	1:31,6-1:100
Genlmm 080	1:10-1:31,6	1:1	1:1

GenImm 082	1:3,1-1:10	1:1	1:1
GenImm 083	1:1	1:1	1:1
GenImm 084	1:3,1-1:10	1:3,1-1:10	1:1
GenImm 087	1:3,1-1:10	1:1	1:1
GenImm 088			>1:3160
GenImm 095			1:1
GenImm 100	1:3,1-1:10	1:1	1:1

Ejemplo 5

Este ejemplo incluye una descripción de los datos que muestran las cantidades de producción de diferentes serotipos de AAV, incluido AAV-Rh74.

- 5 Los datos de la Tabla 2 muestran el rendimiento de producción de los diferentes serotipos de AAV. Se informa el tamaño del lote de virus en las botellas rotatorias, el rendimiento total del vector y el rendimiento por botella. Todos los serotipos se empaquetaron con el mismo casete de expresión. AAV-Rh74 tiene un rendimiento comparable o mayor que los otros serotipos evaluados, concretamente, AAV-8, AAV-dj y AAV-2.

Tabla 2

Serotipo	Tamaño del lote (número de botellas rotatorias)	Rendimiento total del vector (genomas de vector)	Rendimiento por botella rotatoria (genomas de vector)
AAV-Rh74	80	1,21E + 15	1,51E + 13
AAV-Rh74	10	1,23E + 14	1,23E + 13
AAV-8	30	2,54E + 14	8,47E + 12
AAV-dj	20	1,79E + 14	8,95E + 12
AAV-2	30	1,38E + 14	4,60E + 12

10

Ejemplo 6

Este ejemplo incluye una descripción de los datos que muestran que el vector AAVrh74 que expresa el Factor IX humano (FIX) bajo control de un promotor específico de hígado administrado a macacos rhesus condujo a cantidades de producción de FIX en los animales, y a niveles más altos que el vector AAV8 administrado en la misma cantidad.

- 15 En resumen, a los animales se les administró AAV8 o AAVrh74 a una dosis de 2×10^{12} genomas de vector (vg)/kg de peso. Los vectores se formularon en solución salina o en una mezcla de vector y cápside vacía de AAV (indicada EC).

20 La Figura 4 es un gráfico de histograma del promedio (semanas 2 a 8) y el error estándar o la media de FIX humana medida mediante un ELISA que detecta específicamente FIX humano en plasma de macaco rhesus. Los animales que recibieron el vector AAVrh74-FIX se muestran en las últimas dos barras en el margen derecho. Los datos muestran que los animales que recibieron los vectores AAVrh74 (las dos últimas barras en el margen derecho) expresaron el transgén FIX a niveles más altos en comparación con los otros grupos de animales inyectados a la misma dosis (barras negras y grises). Los niveles promedio se compararon mediante la prueba t de Student bilateral para datos independientes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el uso en un método de tratamiento de un trastorno hemorrágico en un mamífero, en la que la composición comprende un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia VP1, VP2 y VP3 de AAV-Rh74 expuestas en SEQ ID N°: 1, 3 y 4, respectivamente, como se muestra en la Figura 3, y dicho vector comprende además una secuencia polinucleotídica heteróloga que comprende un gen que codifica un factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea, en la que la secuencia polinucleotídica heteróloga está unida de forma operable a un elemento de control de la expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia polinucleotídica heteróloga, en la que el elemento de control de la expresión es un promotor activo en el hígado, y en la que el método comprende administrar el vector de virus adenoasociado (AAV) a dicho mamífero, por lo que se administra o transfiere la secuencia polinucleotídica heteróloga al mamífero.
2. Un método *in vitro* para administrar o transferir una secuencia polinucleotídica heteróloga a células aisladas de un mamífero, que comprende administrar un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia VP1, VP2 y VP3 de AAV-Rh74 expuestas en SEQ ID N°: 1, 3 y 4, respectivamente, como se muestra en la Figura 3, y dicho vector comprende además una secuencia polinucleotídica heteróloga que comprende un gen que codifica un factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea, en el que la secuencia polinucleotídica heteróloga está unida de forma operable a un elemento de control de la expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia polinucleotídica heteróloga, en la que el elemento de control de la expresión es un promotor activo en el hígado de dichas células aisladas.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde el mamífero tiene una deficiencia en la expresión o función del factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea, y en donde dicho vector comprende un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que puede corregir la expresión o función del factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea deficiente, y en donde dicho polipéptido se expresa en el mamífero.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 3, en donde dicho factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea se expresa en una célula, tejido u órgano de dicho mamífero.
5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde:
 - (a) la célula comprende una célula secretora; o
 - (b) la célula comprende una célula endocrina; o
 - (c) la célula comprende un hepatocito, una célula epitelial o una célula madre multipotente; o
 - (d) el tejido u órgano de dicho mamífero comprende el hígado.
6. El método de la reivindicación 2, en donde dicho factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea se expresa en las células aisladas de dicho mamífero.
7. El método de la reivindicación 6, en donde:
 - (a) las células aisladas comprenden células secretoras; o
 - (b) las células aisladas comprenden células endocrinas; o
 - (c) las células aisladas comprenden hepatocitos, células epiteliales o células madre multipotentes.
8. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 3 o el método de la reivindicación 2, en donde el mamífero produce una cantidad insuficiente de un factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea, o un factor de coagulación sanguínea defectuoso o anormal.
9. La composición para el uso o el método de la reivindicación 8, en donde el factor (de formación de coágulos) de coagulación sanguínea comprende Factor XIII, Factor IX, Factor X, Factor VIII, Factor VIIa o proteína C.
10. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 3 o el método de la reivindicación 2, en donde el gen comprende o codifica el Factor XIII, Factor IX, Factor X, Factor VII, Factor VIIa o proteína C.
11. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 3, en donde el trastorno hemorrágico es hemofilia A o hemofilia B con o sin inhibidores.
12. El método de la reivindicación 2, en donde el mamífero tiene hemofilia A o hemofilia B con o sin inhibidores.
13. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 3 o el método de la reivindicación 2, en donde:
 - (a) el elemento de control de la expresión comprende un elemento de control constitutivo o regulable; o

- (b) el elemento de control de la expresión comprende un elemento de control de la expresión o un promotor específico de tejido.

14. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 3 o el método de la reivindicación 2, en donde el mamífero es humano.

5 15. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición es una composición farmacéutica.

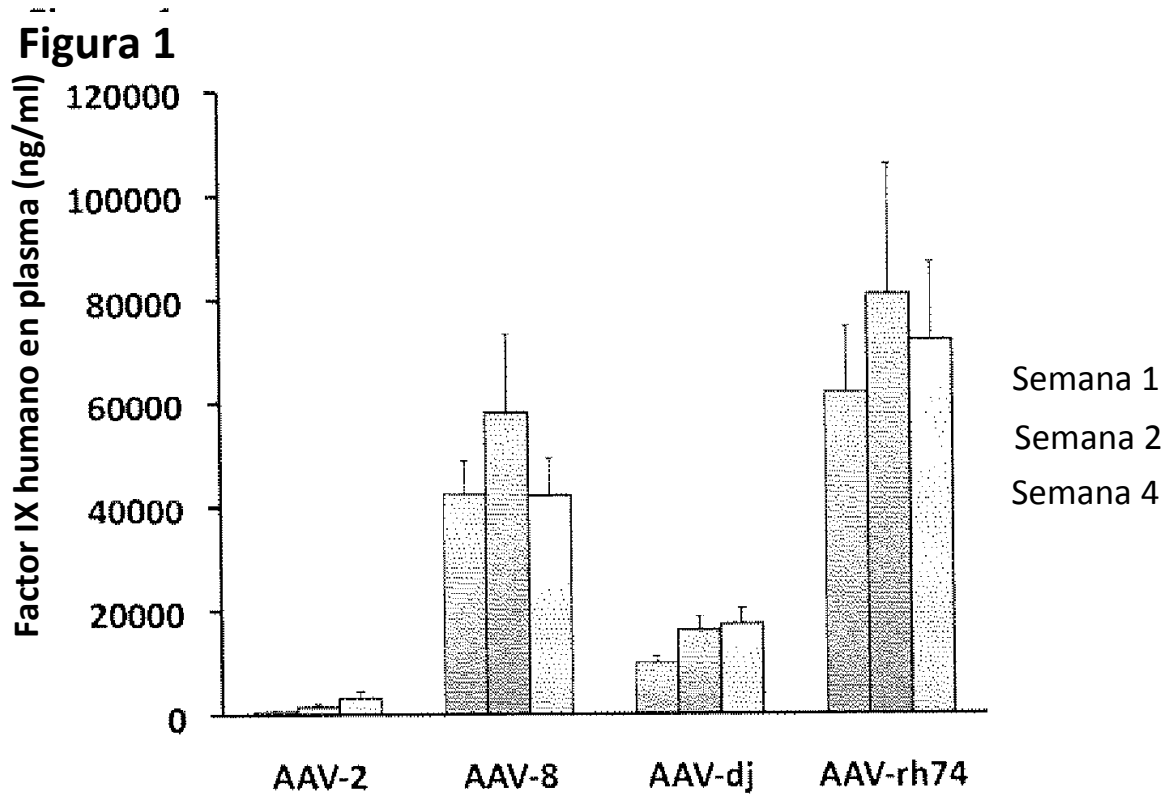


Figura 2

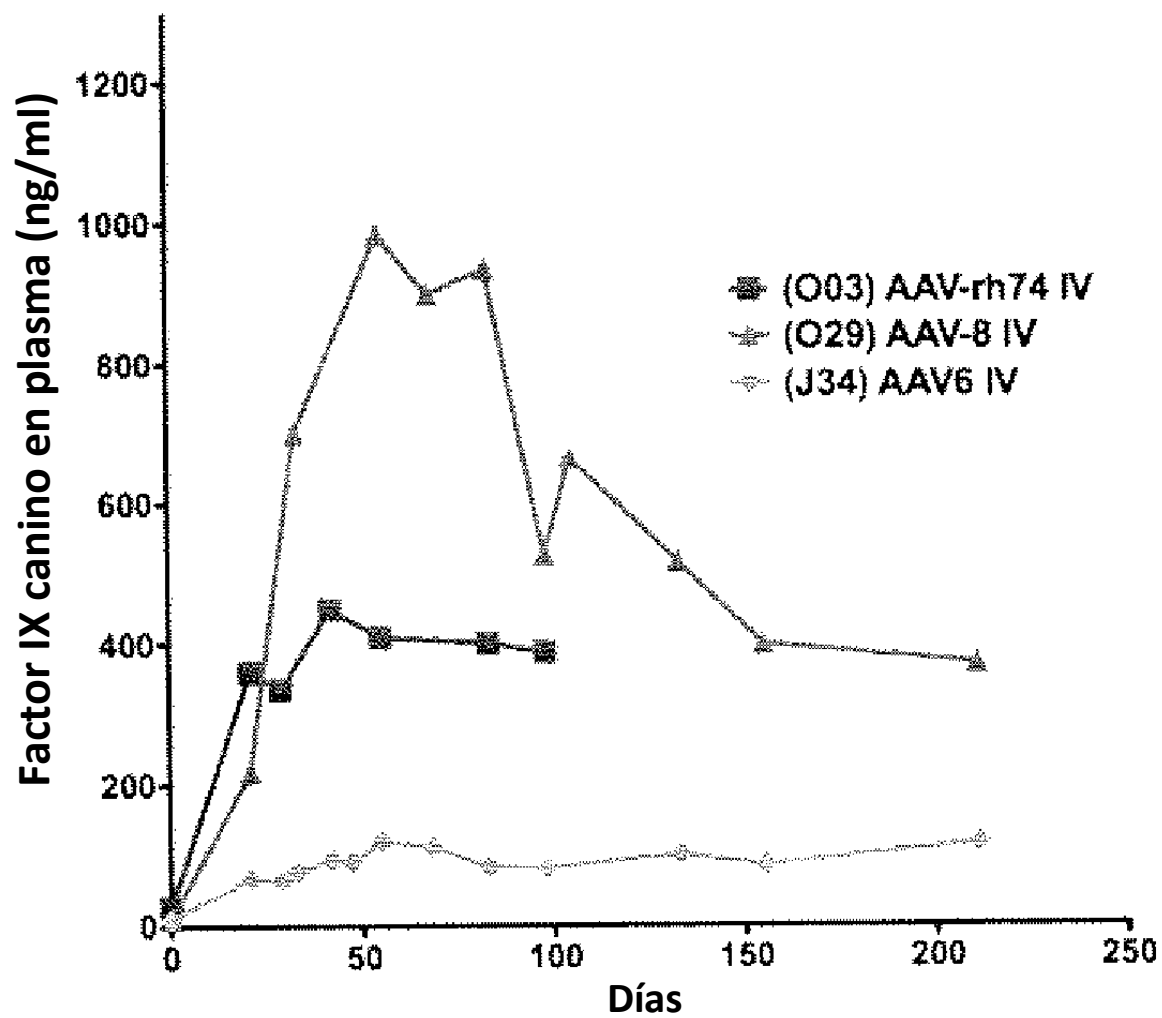


Figura 3 (SEQ ID N°s: 1-4)

Aminoácidos de VP1 de Rh74 (SEQ ID N°:1):

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLPKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAK
KRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQ
PIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDREVITSTRTWAL
PTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFPRKR
LNFKLFNIQVKEVTQNEGKTKIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQY
GYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ
YLYYLSRTQSTGGTAGTQQLFSQAGPNMMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAW
TGATKYHLNGRDSLNVNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEI
KTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGN
FHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKR
WNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRLN.

ADN de VP1 de Rh74 (SEQ ID N°: 2):

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGA
GTGGTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACAA
CGGCCGGGTCTGGTGCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGG
GGGAGCCCCGTCAACGCGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGC
AGCTCCAAGCGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAATCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGA
GCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAA
AAGCGGGTTCTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAATCGCCGGTTAAGACGGCTCCTGGAAAGA
AGAGACCGGTACAGCCATCACCCAGCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAA
AGGCCAGCAGCCCGCAAAAAGAGACTCAATTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTC
CCCGACCCTCAACCAATCGGAGAACCACCAGCAGGCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAA
TGGCTGCAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGT
GTTCTCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGC
ACCCGCACCTGGGCCCCTGCCACCTACAACAACCACCTCTACAAGCAAACTCTCAACGGGA
CCTCGGGAGGAAGCACCAACGACAACACCTACTTTCGGCTACAGCACCCCCTGGGGGTATTT
TGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACA
ACTGGGGATTCCGGCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGT
CACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGATTCAGGTCTTT
ACGGAATCGGAATACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTCGGCGCACCAGGGCTGCCTGCCTCC
GTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCTCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTC
AGGCTGTGGGCGGTCGTCTTCTACTGCCTGGAGTACTTTCTTCTCAAATGCTGAGAACG
GGCAACAACCTTTGAATTCAGCTACAACCTTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCTACGCGCA
CAGCCAGAGCCTGGACCGGTGATGAACCTCTCATCGACCAGTACTTGTACTACCTGTCCC
GGACTCAAAGCACGGGCGGTACTGCAGGAACCTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGGCC
TAACAACATGTCGGCTCAGGCCAAGAACTGGCTACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGC
GTCTCCACGACACTGTGCGAGAACAACAACAGCAACTTTGCCTGGACGGGTGCCACCAAGT
ATCATCTGAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTACCCACAAGGAC
GACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAGCGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGGGAGCTGGAA
AAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATGCTAACCCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACCA
ACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGGCCGATAACCTGCAACAGCAAAACGCCGC
TCCTATTGTAGGGGCCGTCATAGTCAAGGAGCCTTACCTGGCATGGTGTGGCAGAACCGG
GACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAGATTCTCATAACGACGGCAACTTTCATCC
CTCGCCGCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAGCATCCGCCCTCTCAGATCCTGATTAAAAACA
CACCTGTTCCCGCGGATCCTCCGACCACCTTCAATCAGGCCAAGCTGGCTTCTTTCATCACG
CAGTACAGTACCGGCCAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGC
AAACGCTGGAACCCAGAGATTCAGTACACTTCCAACCTACTACAAATCTACAAATGTGGACTT
TGCTGTCAATACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTACCC
GTAATCTGTAA

Aminoácidos de VP2 de Rh74 (SEQ ID N°:3):

TAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMAD
NNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFH
CHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPF
PADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYL
YYLSRTQSTGGTAGTQQLLSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVP
GVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNAAPIVGAVN
SQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQY
STGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Aminoácidos de VP3 de Rh74 (SEQ ID N°:4):

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYST
PWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVL
GSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPPHSSYAHSQSLD
RLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKY
HLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQ
QNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFN
QAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Figura 4

