

**FACTOR IX MODIFICADO, Y COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS PARA
LA TRANSFERENCIA DE GENES A CÉLULAS, ÓRGANOS Y TEJIDOS**

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente de los Estados Unidos 62/183,599, presentada el 23 de junio de 2015, solicitud No. 62/315,453, presentada el 30 de marzo de 2016, solicitud No. 62/338,315, presentada el 18 de mayo de 2016, solicitud No. 62/348,781, presentada el 10 de junio de 2016 y la solicitud No. 62/349,572, presentada el 13 de junio de 2016, todas las solicitudes se incorporan expresamente aquí como referencia en su totalidad.

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 (ganancia de función) conducen a una variedad de enfermedades. Un ejemplo de trastorno de pérdida de la función genética es la hemofilia, un trastorno hemorrágico hereditario causado por deficiencia en el factor de coagulación VIII (FVIII, hemofilia A) o factor IX (FIX, hemofilia B). Un ejemplo de ganancia del trastorno genético funcional es la enfermedad de Huntington, una enfermedad causada por un gen patológico "HTT" (que codifica la proteína huntingtina) que codifica una proteína mutada que se acumula dentro y provoca

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 del factor de coagulación recombinante a demanda, en caso de que se produzca una hemorragia, o profilácticamente. Sin embargo, este enfoque terapéutico tiene varios inconvenientes tales como la necesidad de infusiones repetidas, el costo del tratamiento, el riesgo de desarrollar respuestas inmunes del factor antiterapéutico y el riesgo de hemorragias potencialmente fatales. Estas limitaciones han impulsado el desarrollo de terapias basadas en genes para la hemofilia. Con este fin, la hemofilia es ideal para la terapia basada en la transferencia genética ya que 1) la ventana terapéutica es muy amplia, ya que los niveles justo por encima del 1% de lo normal ya pueden provocar un cambio en el fenotipo de severo a moderado, y los niveles del 100% no están asociados a efectos secundarios; 2) la expresión específica del tejido del transgén terapéutico no es estrictamente requerida; y 3) hay una experiencia considerable en la medición de los puntos finales de la eficacia terapéutica.

Actualmente, los vectores de virus adenoasociados (AAV) se reconocen como los vectores de transferencia genética de elección ya que tienen el mejor perfil de seguridad y eficacia para el suministro de genes *in vivo*. De los serotipos de AAV aislados hasta el momento, AAV2 y AAV8 se han utilizado para tener como objetivo el hígado de humanos afectados por hemofilia B severa.

RESUMEN

La invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos, vectores de expresión (por ejemplo, genomas de vectores) y plásmidos, composiciones y vectores virales en los que el ácido nucleico codifica el Factor IX (por ejemplo, Factor IX humano). El ácido nucleico que codifica el Factor IX se modifica para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosina-guanina) con respecto a una secuencia de codificación de comparación FIX. En una modalidad particular, un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX tiene un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con una secuencia natural o nativa que codifica el Factor IX humano.

Los ácidos nucleicos modificados que codifican el Factor IX, tales como FIX modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosina-guanina), se pueden incluir en vectores, tales como vectores virales. Los vectores virales representativos incluyen vectores lentivirales y parvovirales (por ejemplo, vectores de virus adenovírico o adeno-asociado (AAV)) que se dirigen, por ejemplo, a células de hepatocitos del hígado, entre otros tipos de células. Como vector para la administración de la secuencia de ácido nucleico, los vectores de AAV dirigen la expresión del polinucleótido en las células. Los polinucleótidos que codifican proteínas, tales como un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, pueden expresarse después de la administración, opcionalmente a niveles terapéuticos.

De acuerdo con esto, se proporcionan vectores de AAV recombinantes que incluyen (encapsidar, empaquetar) genomas vectoriales que incluyen un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX. En modalidades particulares, una partícula de AAV recombinante encapsida o empaqueta un genoma vectorial. Tales partículas recombinantes de AAV incluyen un genoma vectorial viral que incluye una secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosa-guanina)). En una modalidad, un genoma vectorial que incluye un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosa-guanina) se encapsida o se empaqueta mediante una cápside de AAV o una variante de cápside de AAV.

En los vectores de AAV recombinantes de la invención, la secuencia de polinucleótidos heterólogos se puede transcribir y posteriormente traducir en una proteína. En diversos aspectos, la secuencia de polinucleótidos heterólogos codifica una proteína terapéutica. En aspectos particulares, la proteína es un factor de coagulación de la sangre (por ejemplo, Factor IX, Factor XIII, Factor X, Factor VIII, Factor VIIa o proteína C). En aspectos más particulares, el vector incluye un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosa-guanina)).

El AAV y las variantes de AAV tales como las variantes de la cápside pueden proporcionar polinucleótidos y/o proteínas que proporcionan un beneficio deseable o terapéutico, tratando de ese modo una variedad de enfermedades. Por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, y variantes de los mismos y variantes de la cápside de AAV (por ejemplo, 4-1) son vectores útiles para administrar a las células, tejidos y órganos, genes terapéuticos (por ejemplo, Factor IX) para tratar la hemofilia A, B, etc.

En la invención, los vectores virales y AAV recombinantes que incluyen (encapsidar, empacar) el genoma vectorial (viral o AAV) incluyen elementos adicionales que funcionan en cis o en trans. En modalidades particulares, un vector viral recombinante (por ejemplo, AAV) que incluye (encapsidar, empaquetar) un genoma vectorial también tiene: una o más secuencias de repetición terminal invertida (ITR por sus siglas en inglés) que flanquean el extremo 5' o 3' de la secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosina-guanina)); un elemento de control de expresión que impulsa la transcripción (por ejemplo, un promotor o potenciador) de la secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosina-guanina), tales como un elemento de control constitutivo o regulable, o un elemento de control de expresión específico de tejido; una secuencia de intrón, una secuencia de

polinucleótidos de relleno o relleno; y/o una secuencia de poli-adenilación localizada en 3' de la secuencia de polinucleótidos heterólogos.

Por consiguiente, los vectores pueden incluir además un intrón, un elemento de control de expresión (por ejemplo, un elemento de control constitutivo o regulable, o un elemento de control de expresión específico de tejido o promotor tal como para la expresión de hígado, por ejemplo, un Promotor α -1-anti-tripsina humano (hAAT) y/o apolipoproteína E (ApoE) HCR-1 y/o HCR-2 potenciador), una o más repeticiones de terminal invertido (ITRs) de virus adenoasociados (AAV) (por ejemplo, una secuencia ITR de cualquier de: serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 AAV) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno. La posición de tales elementos adicionales puede variar. En aspectos particulares, un intrón está dentro de la secuencia que codifica la proteína FIX humana, y/o el elemento de control de expresión está unido operativamente a la secuencia que codifica la proteína FIX humana, y/o ITR(s) de AAV flanquean el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica la proteína FIX humana, y/o en el que la secuencia de polinucleótidos de relleno flanquea el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica la proteína FIX humana.

En diversas modalidades, un ácido nucleico FIX modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosina-guanina) puede tener 1-5 menos, 5-10 menos, 10-15 menos, 15-20 menos, 20-25 menos, 25-30 menos, 30-40 menos, 40-55, 55-75, menos, 75-100, 100-150 menos, 150-200 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa o de tipo natural que codifica el

Factor IX humano. En aspectos particulares, un ácido nucleico de FIX modificado como se establece en la presente memoria codifica una proteína FIX humana que se expresa a niveles superiores o comparables con una secuencia de tipo natural o nativa que codifica un factor IX humano que no tiene un número reducido de dinucleótidos CpG.

En modalidades adicionales, un intrón, un elemento de control de expresión (por ejemplo, un elemento de control constitutivo o regulable, o un elemento de control de expresión específico de tejido o promotor tal como para la expresión de hígado, por ejemplo, un Promotor y/o apolipoproteína E (ApoE) de α_1 -anti-tripsina humana (hAAT) HCR-1 y/o potenciador de HCR-2), una o más repeticiones de terminal invertido (ITRs) de virus adenoasociado (AAV) (por ejemplo, una secuencia ITR de cualquiera de: serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 AAV10) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno puede modificarse para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosa-guanina) en comparación con un elemento de control de expresión nativo o de tipo natural de contraparte, repeticiones de terminal invertido (ITRs) de virus adenoasociado (AAV) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno. En aspectos particulares, un elemento de control de la expresión, una repetición de terminal invertido (ITR) del virus adenoasociado (AAV) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 1-5 menos, 5-10 menos, 10-15 menos, 15-20 menos, 20-25 menos, 25-30 menos, 30-40 menos, 40-55, 55-75, menos, 75-100, 100-150 menos, 150-200 menos dinucleótidos CpG que la secuencia de contraparte nativa o de tipo natural.

Los vectores de AAV ejemplares incluyen la secuencia de la cápside de AAV de cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, o una variante de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8. Las partículas de AAV recombinantes de la invención también incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, y sus variantes. Las variantes de cápside particulares incluyen variantes de cápside tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, tales como una secuencia de cápside con una sustitución de aminoácido, eliminación o inserción / adición. En aspectos particulares, se realiza una sustitución en la secuencia de la cápside de VP1 de Rh74 (SEC ID NO: 1), por ejemplo en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 o 202. En aspectos más particulares, los residuos sustituidos corresponden a un aminoácido A, V, P o N en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 o 202 de la secuencia de la cápside de VP4 de Rh74. En aspectos particulares adicionales, la secuencia de la cápside tiene un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de la cápside de VP1 de Rh74. En aspectos particulares adicionales, la secuencia de la cápside tiene dos, tres o los cuatro de los siguientes: un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo

P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de la cápside de VP1 de Rh74.

En aspectos más particulares, una variante de cápside comprende cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-9. En modalidades adicionales, un vector de AAV tiene una secuencia de cápside con una secuencia de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV que tiene 90% o más de identidad de secuencia con cualquier VP1, VP2 y/o VP3 de cualquier serotipo de AAV. En aspectos particulares, un vector de AAV tiene una secuencia de cápside con una secuencia de cápside VP1, VP2 y/o VP3 que tiene una identidad del 90% o más con AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 VP1, VP2 y/o secuencias VP3. En aspectos más particulares, un vector de AAV tiene una secuencia de cápside con una secuencia de cápside VP1, VP2 o VP3 seleccionada de cualquiera de: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o serotipos de AAV-2i8 AAV.

En modalidades adicionales, un genoma vectorial recombinante incluye un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG (citosina-guanina) y una secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno. En aspectos particulares, el ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX tiene una longitud inferior a aproximadamente 4.7 kb. En aspectos particulares adicionales, el ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX tiene una longitud menor que 4.7 kb y está flanqueado por una o más ITRs de AAV, o posicionado dentro de dos secuencias de ITR de virus adenoasociados (AAV). En aspectos particulares

adicionales, una secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno tiene una longitud que cuando se combina con ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, la longitud combinada total del Factor IX que codifica la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno se encuentra entre aproximadamente 3.0-5.5 kb, o entre aproximadamente 4.0-5.0kb, o entre aproximadamente 4.3kb - 4.8kb.

Las secuencias de polinucleótidos de relleno o relleno pueden ubicarse en la secuencia del vector en cualquier posición deseada de manera que no impida una función o actividad del vector. En un aspecto, una secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno se sitúa entre ITR 5' y/o 3' (por ejemplo, una ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, y sus variantes) que flanquean los extremos 5' y/o 3' respectivos de un Factor IX que codifica una secuencia de ácido nucleico, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG (citosa-guanina). En otro aspecto, una secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno se coloca dentro de una ITR 5' y/o 3' que flanquea los extremos 5' y/o 3' respectivos de un Factor IX que codifica una secuencia de ácido nucleico, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG. En un aspecto adicional, una secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno se coloca adyacente a ITR 5' y/o 3' que flanquea los extremos 5' y/o 3' respectivos de una secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG. En un aspecto adicional, una secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno se coloca dentro de un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX

con un número reducido de dinucleótidos CpG, por ejemplo, análogo a un intrón dentro de un ácido nucleico genómico.

En consecuencia, en diversas modalidades, una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado se coloca adyacente a una secuencia de AAV ITR; se coloca dentro de dos secuencias de ITR de virus adenoasociado (AAV); se coloca fuera de dos secuencias de ITR de virus adenoasociado (AAV); o hay dos secuencias de polinucleótidos de relleno o rellenado, una primera secuencia de polinucleótidos de relleno o de rellenado posicionada dentro de dos secuencias de ITR de virus adenoasociado (AAV) y una segunda secuencia de polinucleótidos de relleno o de rellenado posicionada fuera de dos secuencias de ITR de virus adenoasociados (AAV).

En aspectos más particulares, una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado tiene una longitud que cuando se combina con un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, la longitud total combinada de la secuencia de polinucleótidos heterólogos y la secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado está entre aproximadamente 3.0 kb – 5.5 kb, entre aproximadamente 4.0 – 5.0 kb, o entre aproximadamente 4.3 kb – 4.8 kb, cuando se coloca dentro de dos secuencias de ITR de virus adenoasociados (AAV). En otros aspectos más particulares, una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado tiene una longitud superior a 4.7 kb, entre aproximadamente 5.0-10.0 kb, o entre aproximadamente 6.0-8.0 kb, cuando se coloca fuera de dos secuencias de ITR de virus adenoasociados (AAV).

Típicamente, una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado es inerte o inocua y no tiene función o actividad. En varios aspectos particulares, una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado no es una secuencia de polinucleótidos bacteriano, una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado no es una secuencia que codifica una proteína o péptido, una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado es una secuencia distinta de cualquiera de las siguientes: secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX), una secuencia de repetición de terminal invertido (ITR) de AAV, un elemento de control de la expresión, un origen de replicación, un marcador seleccionable o una secuencia de señal de poli-adenilación (poli-A).

En diversos aspectos particulares adicionales, una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado es una secuencia de intrón que está relacionada o no con la secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). En aspectos particulares, la secuencia del intrón se coloca dentro de la secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). En otros aspectos particulares, la secuencia del intrón está relacionada con la secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG) ya que el intrón está en el ADN genómico, tal como el ADN genómico que codifica una proteína

cuya proteína también está codificada por la secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX).

Los vectores de lentivirus y parvovirus recombinantes de la invención (por ejemplo, AAV) tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, y variantes tales como la variante de la cápside (por ejemplo, 4-1) partículas que incluyen (encapsidar, empaquetar) el genoma vectorial de AAV recombinante se pueden incluir dentro de las células. En dichas modalidades, las células pueden comprender células de empaquetamiento que producen o pueden ser lisadas para producir partículas de virus (AAV), o células diana en las que se desea expresar la secuencia de polinucleótidos heterólogos. En consecuencia, se proporcionan células que comprenden el Factor IX modificado que codifica el ácido nucleico, tales como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, vectores y vectores lentivirus y parvovirus (por ejemplo, AAV) tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, y partículas variantes (por ejemplo, tales como 4 - 1).

En modalidades adicionales, una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana, en la que dicho ácido nucleico tiene un número reducido de nucleótidos CpG en comparación con la secuencia nativa que codifica Factor IX humano, o un vector de expresión o plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana, en la que dicho ácido nucleico tiene un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano, se incluye en una composición. En un aspecto particular,

tales secuencias de ácido nucleico se pueden incluir en una composición farmacéutica. Por consiguiente, los vectores de lentivirus y parvovirus recombinantes de la invención (por ejemplo, AAV) tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, y partículas variantes (por ejemplo, tal como 4 - 1) que incluyen (encapsidar, empaquetar) el genoma vectorial se pueden incluir dentro de las composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones son útiles para la administración de un vector recombinante (por ejemplo, AAV) y partículas de virus tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, y variantes (por ejemplo 4-1) que incluyen (encapsidar, empaquetar) genomas vectoriales (por ejemplo, AAV) a un sujeto.

Los vectores recombinantes de lentivirus y parvovirus (por ejemplo, AAV) tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, y partículas variantes (por ejemplo, tales como 4 - 1) que incluyen (encapsidar, empaquetar) el genoma vectorial en varios métodos y usos. Por consiguiente, se proporcionan métodos y usos para administrar o transferir una secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG) en un organismo o célula, tal como un mamífero o una célula de un mamífero.

En una modalidad, un método o uso incluye administrar un vector lentivirus o parvovirus (por ejemplo, AAV) tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4,

AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, o una variante que incluye una secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG) en un genoma vectorial (encapsidar, empaquetar) a un mamífero o una célula de un mamífero en condiciones adecuadas para administrar o transferir la secuencia de polinucleótidos heterólogos en el mamífero o la célula de un mamífero. En un aspecto, el método o uso transfiere/administra el polinucleótido heterólogo (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG) en el mamífero y/o la célula. En otro aspecto, el método permite la transferencia / administración del polinucleótido heterólogo (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG) en la célula, posterior transcripción para formar una transcripción y posterior traducción para formar un producto genético (por ejemplo, Factor IX).

En modalidades adicionales, un método o uso es para tratar un sujeto (por ejemplo, mamífero) deficiente o que necesita una expresión o función de proteína que incluye proporcionar un vector de lentivirus o parvovirus (por ejemplo, AAV) tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, o una variante, una pluralidad de tales partículas virales (por ejemplo, AAV), o una composición farmacéutica de vectores de lentivirus parvovirus (por ejemplo, AAV) tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, o variante, partícula o pluralidad de tales partículas virales

(por ejemplo, AAV); y administrar la partícula viral, la pluralidad de partículas virales, o la composición farmacéutica de partículas virales o la pluralidad de partículas virales al sujeto (por ejemplo, mamífero). La secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG) así administrada se puede expresar posteriormente en el sujeto (por ejemplo, mamífero).

Los métodos y usos para la administración o suministro incluyen cualquier modo compatible con un sujeto. En modalidades particulares, un vector de lentivirus o parvovirus (por ejemplo, AAV) tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, y las variantes, o la pluralidad de tales partículas virales se administran o suministran por vía parenteral, tal como intravenosamente, intraarterialmente, intramuscularmente, subcutáneamente, o mediante catéter.

Los sujetos incluyen mamíferos, tales como humanos y no humanos (por ejemplo, primates). En modalidades particulares, un sujeto se beneficiaría de o necesita la expresión de una secuencia de polinucleótidos heterólogos. En una modalidad más particular, un sujeto se beneficiaría de la expresión o función del Factor IX, por ejemplo, tal como un sujeto que expresa una cantidad reducida de Factor IX, tal como un sujeto con hemofilia B.

De acuerdo con la invención, se proporcionan métodos para producir vectores recombinantes de lentivirus y parvovirus (por ejemplo, AAV) tales

como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, y variantes que incluyen (encapsidar, empaquetar) el genoma vectorial. En una modalidad, un método incluye introducir en una célula de empaquetamiento un plásmido vectorial recombinante (por ejemplo, AAV) para producir una infección viral productiva; y cultivar las células de empaquetamiento en condiciones para producir partículas virales recombinantes. En otra modalidad, un método para producir partículas virales o de AAV recombinantes con cantidades reducidas de partículas virales recombinantes en las que el vector viral recombinante incluye ácido nucleico contaminante, incluye introducir en una célula de empaquetamiento un plásmido vectorial recombinante (por ejemplo, AAV); y cultivar las células de empaquetamiento bajo condiciones para producir partículas virales recombinantes, en las que las partículas virales recombinantes producidas tienen números reducidos de partículas virales con genomas vectoriales que contienen ácido nucleico contaminante en comparación con el número de partículas virales que contienen ácido nucleico contaminante producido en condiciones en las cuales una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado está ausente del vector viral recombinante. En aspectos particulares, el ácido nucleico contaminante es ácido nucleico bacteriano; o una secuencia distinta de la secuencia de polinucleótidos heterólogos, o ITR, promotor, potenciador, origen de replicación, secuencia poli-A, o marcador seleccionable.

Las células de empaquetamiento incluyen células de mamífero. En modalidades particulares, una célula de empaquetamiento incluye funciones

auxiliares (por ejemplo, AAV) para empaquetar la secuencia (de polinucleótidos heterólogos) (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG), vector de expresión (por ejemplo, genoma vectorial), en una partícula viral (por ejemplo, partícula de AAV). En aspectos particulares, una célula de empaquetamiento proporciona proteínas Rep y/o Cap de AAV (por ejemplo, proteínas Rep78 o/y Rep68); una célula de empaquetamiento es transfectada estable o transitoriamente con polinucleótido(s) que codifica(n) la(s) secuencia(s) de proteína de Rep y/o Cap; y/o una célula de empaquetamiento es transfectada estable o transitoriamente con la(s) secuencia(s) que codifica(n) el polinucleótido de la proteína Rep78 y/o Rep68.

En la invención los vectores de lentivirus o parvovirus recombinantes (por ejemplo, AAV), y elementos cis acompañantes (por ejemplo, elementos de control de la expresión, ITRs, poliA) o trans (por ejemplo, proteínas de la cápside, funciones de empaquetamiento como proteína Rep/Cap) pueden basarse en cualquier organismo, especie, cepa o serotipo. Las partículas virales recombinantes (por ejemplo, AAV) de la invención se basan típicamente en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, y variantes, pero también incluyen híbridos o quimeras de diferentes serotipos. Los serotipos de AAV representativos incluyen, sin limitación, serotipos de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8. Por consiguiente, las partículas virales recombinantes de la invención (por ejemplo, AAV) que comprenden genomas vectoriales pueden incluir una proteína de la cápside de

un serotipo diferente, una mezcla de serotipos o híbridos o quimeras de diferentes serotipos, como una proteína de cápside de VP1, VP2 o VP3 del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8. Además, los vectores de lentivirus o parvovirus recombinantes de la invención (por ejemplo, AAV) tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, secuencias, plásmidos, genomas vectoriales, pueden incluir elementos de cualquier serotipo, una mezcla de serotipos o híbridos o quimeras de diferentes serotipos. En diversas modalidades, un vector de AAV recombinante incluye ITR, Cap, Rep, y/o una secuencia derivada de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y/o el serotipo AAV-2i8, o una mezcla, híbrido o quimera de cualquiera de los serotipos de AAV anteriores.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de Rh74 VP1.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos o Rh74 VP2.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de Rh74 VP3.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de la proteína VP1 de variante de cápside 4-1.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de la cápside 15-1.

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de la cápside 15-2.

La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de la cápside 15-3 / 15-5.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de la cápside 15-4.

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de la cápside 15-6.

La Figura 10 muestra la secuencia de ácido nucleico de FIX39.

La Figura 11 muestra la secuencia de ácido nucleico de FIX19.

La Figura 12A muestra la secuencia del plásmido FIX39.

La Figura 12B muestra la secuencia del plásmido phFIX39v2.

La Figura 13 muestra un mapa del plásmido FIX39.

La Figura 14 muestra la secuencia de ácido nucleico de Intron A.

La Figura 15 muestra la secuencia de ácido nucleico de FIX39 + Intrón A.

La Figura 16 muestra la eficacia de transducción de la variante de la cápside de AAV-4-1 (SEC ID NO: 4) analizada en una configuración *in vitro*.

La Figura 17 muestra los niveles de hFIX en plasma de ratones de tipo salvaje después de la inyección intravenosa en la semana 8 de vida con 1×10^{11} o 1×10^{12} vg/kg de AAV-FIX39-Padua (cuadrado / círculo) y AAV-FIX19-Padua (diamante / hexágono). Los niveles plasmáticos de FIX humano se analizaron mediante ELISA y representan mediciones múltiples, obtenidas por sangrado en serie, en el mismo grupo de animales durante el curso del estudio ($n = 5$ ratones en cada cohorte). Las barras de error indican el error estándar de la media.

La Figura 18 muestra los niveles circulantes de FIX humano en plasma de ratón 24 horas después de la inyección hidrodinámica en la vena de la cola de 5 µg de plásmidos pFIX19-Padua o pFIX39-Padua. $P = 0.3337$.

La Figura 19 muestra un resumen de datos de cuatro pacientes con hemofilia B humana a los que se administró una infusión única de un vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39) de acuerdo con la invención y

la actividad FIX (%) durante los períodos de evaluación subsiguientes (183, 102, 69 y 50 días, respectivamente).

La Figura 20A muestra los datos de actividad de FIX (%) del primer paciente humano con hemofilia B al que se administró la infusión única del vector portador de la variante de AAV-FIX Padua (FIX39), durante el período de evaluación de 183 días.

La Figura 20B muestra los datos de la prueba de función hepática (ALT, AST y enzimas LDH) del primer paciente humano con hemofilia B al que se administró la infusión única del vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39) durante el período de evaluación de 183 días. Los valores de LDH trazados (LDH^1) se han dividido por 10 para mostrarse con los valores de ALT y AST.

La Figura 21A muestra los datos de actividad de FIX (%) del segundo paciente de hemofilia B humana a los que se administró la infusión única del vector portador de la variante de AAV-FIX Padua (FIX39), durante el período de evaluación de 102 días.

La Figura 21B muestra los datos de la prueba de función hepática (ALT, AST y enzimas LDH) del segundo paciente humano con hemofilia B al que se administró la infusión única del vector portador de AAV-FIX Padua (FIX39), durante el período de evaluación de 102 días. Los valores de LDH trazados (LDH^1) se han dividido por 10 para mostrarse con los valores de ALT y AST.

La Figura 22A muestra los datos de actividad de FIX (%) del tercer paciente humano con hemofilia B al que se administró la infusión única del vector portador de la variante de AAV-FIX Padua (FIX39), durante el período de evaluación de 69 días.

La Figura 22B muestra los datos de la prueba de función hepática (ALT, AST y enzimas LDH) del tercer paciente humano con hemofilia B al que se le administró la infusión única del vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el período de evaluación de 69 días. Los valores de LDH trazados (LDH¹) se han dividido por 10 para mostrarse con los valores de ALT y AST.

La Figura 23A muestra los datos de la actividad FIX (%) del cuarto paciente humano con hemofilia B al que se administró la infusión única del vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el período de evaluación de 50 días.

La Figura 23B muestra los datos de la prueba de función hepática (ALT, AST y enzimas LDH) del cuarto paciente humano con hemofilia B al que se administró la infusión única del vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39) durante el período de evaluación de 50 días. Los valores de LDH trazados (LDH¹) se han dividido por 10 para mostrarse con los valores de ALT y AST.

La Figura 24A muestra un perfil de inmunogenicidad bajo de AAV-FIX39-Padua en sujetos humanos.

La Figura 24B muestra un perfil de inmunogenicidad comparativo de AAV-FIX39-Padua y AAV8-FIX19 en sujetos humanos.

Descripción detallada

La invención se basa, por lo menos en parte, en el desarrollo de secuencias de ácido nucleico modificadas que codifican proteínas, tales como la proteína FIX humana. En diversas modalidades, un ácido nucleico modificado tiene un número reducido de dinucleótidos CpG (citosina-guanina) en comparación con una secuencia de ácido nucleico de referencia que codifica el Factor IX, tal como una secuencia nativa (de tipo natural) que codifica el Factor IX humano. En modalidades adicionales, tales ácidos nucleicos modificados que tienen un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con un factor IX de referencia que codifica un ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia nativa que codifica el Factor IX humano) se incluyen dentro de vectores de expresión (por ejemplo, genomas vectoriales) o plásmidos.

La invención también incluye composiciones, tales como composiciones que incluyen una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica FIX humano. En dichas composiciones, un ácido nucleico modificado tiene un número reducido de dinucleótidos CpG en relación con una secuencia de

referencia como una secuencia nativa (de tipo natural) que codifica el Factor IX humano. Las composiciones incluyen además vectores de expresión (por ejemplo, vectores virales/ genomas vectoriales) y plásmidos que incluyen dichas secuencias de ácido nucleico modificado que codifica la proteína FIX humana que tiene un número reducido de dinucleótidos CpG.

En aspectos particulares, una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana tiene 1-5 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano; o tiene 5-10 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa (de tipo natural) que codifica el factor IX humano; o tiene 10-15 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa (tipo natural) que codifica el Factor IX humano; o tiene 15-20 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa (de tipo natural) que codifica el Factor IX humano; o tiene 20-25 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa (de tipo natural) que codifica el Factor IX humano; o tiene 25-30 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa (de tipo natural) que codifica el Factor IX humano; o tiene 30-40 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa (de tipo natural) que codifica el Factor IX humano; o tiene 40-55 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa (de tipo natural) que codifica el factor IX humano; o está completamente desprovisto de cualquier dinucleótido CpG.

Los ácidos nucleicos modificados que codifican el Factor IX, tales como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, pueden incluir además uno o más elementos cis adicionales. Los elementos cis representativos incluyen, sin limitación, elementos de control de expresión, intrones, ITRs, codones de

parada, secuencias de poliA, y/o secuencias de polinucleótidos de relleno. En modalidades particulares, dichos elementos que actúan en cis también se pueden modificar. Por ejemplo, los elementos que actúan en cis, tales como los elementos de control de la expresión, intrones, ITRs, secuencias poli-A y/o secuencias de polinucleótidos de relleno pueden tener un número reducido de dinucleótidos CpG. En un aspecto, uno o más elementos que actúan en cis, tales como los elementos de control de expresión, intrones, ITRs, secuencias poli-A, y/o secuencias de polinucleótidos de relleno, están desprovistos de dinucleótidos CpG. En aspectos particulares, uno o más elementos que actúan en cis como elementos de control de la expresión, intrones, ITRs, secuencias poli-A y/o secuencias de polinucleótidos de relleno tienen 1-5 menos dinucleótidos CpG que un elemento de referencia que actúa en cis; o tiene 5-10 menos dinucleótidos CpG que un elemento de referencia que actúa en cis; o tiene 10-15 menos dinucleótidos CpG que un elemento de referencia que actúa en cis; o tiene 15-20 menos dinucleótidos CpG que un elemento de referencia que actúa en cis; o tiene 20-25 menos dinucleótidos CpG que un elemento de referencia que actúa en cis; o tiene 25-30 menos dinucleótidos CpG que un elemento de referencia que actúa en cis; o tiene 30-40 menos dinucleótidos CpG que un elemento de referencia que actúa en cis; o tiene 40-55 menos dinucleótidos CpG que un elemento cis de referencia; o está desprovisto de cualquier dinucleótido CpG.

También incluye vectores virales que incluyen una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la proteína FIX humana, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG. En partículas particulares, un vector

incluye un vector de lentivirus o parvovirus, tal como un vector adenoviral. En una modalidad más particular, una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la proteína FIX humana, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, está comprendida en un vector de virus adenoasociado (AAV).

En modalidades particulares adicionales, los vectores de virus adenoasociados (AAV) incluyen cápsides derivadas de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, así como variantes de los mismos (por ejemplo, variantes de la cápside, tales como inserciones, adiciones y sustituciones de aminoácidos). Como apreciará un experto en la técnica, las cápsides de AAV incluyen típicamente una proteína VP1 y dos proteínas más cortas, llamadas VP2 y VP3, que son esencialmente truncamientos amino-terminales de VP1. Dependiendo de la cápside y otros factores conocidos por los expertos en la materia, las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 están presentes típicamente en una cápside en una proporción de aproximadamente 1:1:10, respectivamente, aunque esta relación, particularmente de VP3, puede variar significativamente y no deben considerarse limitante en ningún aspecto.

Las variantes de AAV incluyen variantes de AAV-Rh74, por ejemplo, variantes de la cápside de AAV de la secuencia de la cápside de VP1 de Rh74 (SEC ID NO: 1; Figura 1), que incluyen, pero no se limitan a las variantes 4-1, 15-1, 15-2, 15-3 / 15-5, 15-4 y 15-6 descritos en la Tabla 1. Las secuencias de

aminoácidos de Rh74 VP2 y Rh74 VP3 se proporcionan en la SEC ID NO: 2 (Figura 2) y la SEC ID NO: 3 (Figura 3), respectivamente.

Tabla 1. Variantes de la cápside AAV

Variante	Sustituciones de Aminoácido y Posiciones Indicadas en la cápside Rh74 VP1 Capsid	Identificado de Secuencia	Figura
4-1	G195A-L199V- S201P-G202N	SEC ID NO:4	Figura 4
15-1	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/169/547)R	SEC ID NO:5	Figura 5
15-2	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R	SEC ID NO:6	Figura 6
15-3/15-5	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R (variante 15-3) G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R (variante 15-5)	SEC ID NO:7	Figura 7
15-4	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R	SEC ID NO:8	Figura 8
15-6	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R	SEC ID NO:9	Figure 9

La variante 4-1 (SEC ID NO: 4) tenía una alanina, una valina, una prolina y una sustitución de asparagina en las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 y 202, respectivamente, de la cápside VP1. La secuencia de aminoácidos de la cápside VP1 variante 4-1, con residuos sustituidos a, v, p y n, subrayados y en negrita se muestra en la Figura 4 (SEC ID NO: 4). Para la variante 4-1, la secuencia VP2 consiste en la SEC ID NO: 27, y la secuencia VP3 consiste en SEC ID NO: 3, respectivamente.

Las variantes 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 1-5 y 15-6 también tenían una alanina, una valina, una prolina y una sustitución de asparagina en las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 y 202, respectivamente, de la cápside VP1. Además, estas variantes tenían múltiples sustituciones de arginina de lisina en varias posiciones. La secuencia de aminoácidos de la cápside VP1 variante 15-1 (SEC ID NO: 5) se muestra en la Figura 5; la secuencia de aminoácidos de la cápside VP1 variante 15-2 (SEC ID NO: 6) se muestra en la Figura 6; la secuencia de aminoácidos de la cápside VP1 variante 15-3 / 15-5 (SEC ID NO: 7) se muestra en la Figura 7; la secuencia de aminoácidos de la cápside VP1 variante 15-4 (SEC ID NO: 8) se muestra en la Figura 8; y la secuencia de aminoácidos de la cápside VP1 variante 15-6 (SEC ID NO: 9) se muestra en la Figura 9. Los ejemplos de cápsides que se pueden usar en este documento incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2015/0023924.

Por consiguiente, se proporciona los vectores lentiviral y parvoviral tales como los vectores de AAV y variantes de vectores virales tales como variantes de AAV (por ejemplo, las variantes de cápsides tales como 4-1, 15-1, 15-2, 15-3 / 15-5 , 15-4 y 15-6) que incluyen (encapsidar o empaquetar) el genoma vectorial que incluye la secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la proteína FIX humana, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG.

En estudios ejemplares, la transferencia / administración del gen mediado por AAV-Rh74 produjo niveles de expresión de proteína que eran

significativamente más altos que otros serotipos diversos. En particular, el vector AAV-Rh74 y las variantes de la cápside (por ejemplo, 4-1) se dirigen a genes para su administración al hígado con una eficacia por lo menos comparable con la prueba de oro para la transducción hepática, AAV8, en perros y/o ratones y/o macacos con hemofilia B.

Como se establece aquí, los vectores virales tales como los vectores de lentivirus y parvovirus, que incluyen serotipos y variantes de AAV, proporcionan un medio para la administración de secuencias de polinucleótidos a las células *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, que pueden codificar proteínas de modo que las células expresan las proteínas codificadas. Por ejemplo, un vector de AAV recombinante puede incluir un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína o péptido deseado (por ejemplo, Factor IX). El suministro o administración de un vector a un sujeto (por ejemplo, mamífero) proporciona, por lo tanto, proteínas y péptidos codificados al sujeto. Por lo tanto, los vectores virales tales como los vectores lentivirus y parvovirus, incluidos los serotipos de AAV y las variantes tales como las variantes de la cápside (por ejemplo, 4-1) pueden usarse para transferir / suministrar polinucleótidos heterólogos para la expresión, y opcionalmente para tratar una variedad de enfermedades.

En modalidades particulares, un vector recombinante (por ejemplo, AAV) es un vector de parvovirus. Los parvovirus son virus pequeños con un genoma de ADN monocatenario. Los "virus adenoasociados" (AAV) pertenecen a la familia de los parvovirus.

Los parvovirus que incluyen AAV son virus útiles como vectores de terapia genética ya que pueden penetrar las células e introducir ácido nucleico / material genético para que el ácido nucleico / material genético pueda mantenerse de forma estable en las células. Además, estos virus pueden introducir ácido nucleico / material genético en sitios específicos, por ejemplo, tal como un sitio específico en el cromosoma 19. Debido a que los AAV no están asociados con la enfermedad patógena en humanos, los vectores de AAV pueden administrar secuencias de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, proteínas y agentes terapéuticos) a pacientes humanos sin causar una patogénesis o enfermedad sustancial de AAV.

Los AAV y las variantes de AAV (por ejemplo, variantes de cápside tales como 4-1) (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2 y/o VP3) pueden o no ser distintas de otros serotipos de AAV, incluido, por ejemplo, AAV1- AAV11, Rh74 o Rh10 (por ejemplo, distintas de las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 de cualquiera de los serotipos de AAV1-AAV11, Rh74 o Rh10).

Según se usa en el presente documento, el término "serotipo" es una distinción usada para referirse a un AAV que tiene una cápside que es serológicamente diferente de otros serotipos de AAV. La distintividad serológica se determina sobre la base de la falta de reactividad cruzada entre anticuerpos a un AAV en comparación con otro AAV. Dichas diferencias de reactividad cruzada se deben normalmente a diferencias en las secuencias de proteína de la cápside / determinantes antigenéticos (por ejemplo, debido a las diferencias en la secuencias de VP1, VP2 y VP3 de los serotipos de AAV). A pesar de la

posibilidad de que las variantes de AAV que incluyen variantes de cápside no sean serológicamente distintas de un AAV de referencia u otro serotipo de AAV, difieren en por lo menos un residuo de nucleótido o aminoácido en comparación con el serotipo de referencia u otro serotipo de AAV.

Según la definición tradicional, un serotipo significa que el virus de interés ha sido probado contra el suero específico para todos los serotipos existentes y caracterizados para neutralizar la actividad y no se han encontrado anticuerpos que neutralicen el virus de interés. A medida que se descubren aislamientos virales que se producen más naturalmente y/o se generan mutantes de la cápside, pueden existir o no diferencias serológicas con alguno de los serotipos existentes actualmente. Por lo tanto, en los casos en que el nuevo virus (por ejemplo, AAV) no tiene diferencia serológica, este nuevo virus (por ejemplo, AAV) sería un subgrupo o variante del serotipo correspondiente. En muchos casos, las pruebas de serología para la actividad neutralizante aún no se han realizado en virus mutantes con modificaciones de la secuencia de la cápside para determinar si son de otro serotipo de acuerdo con la definición tradicional de serotipo. En consecuencia, por razones de conveniencia y para evitar la repetición, el término "serotipo" se refiere ampliamente tanto a virus serológicamente distintos (por ejemplo, AAV) como a virus (por ejemplo, AAV) que no son serológicamente distintos que pueden estar dentro de un subgrupo o una variante de un serotipo dado.

Los plásmidos del vector recombinante (por ejemplo, AAV), los genomas vectoriales (por ejemplo, AAV), así como los métodos y usos de los mismos,

incluyen cualquier cepa o serotipo viral. Como un ejemplo no limitante, un plásmido de vector recombinante (por ejemplo, AAV) o un genoma vectorial (por ejemplo, AAV) puede basarse en cualquier genoma de AAV, tal como AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -rh74, -rh10 o AAV-2i8, por ejemplo. Dichos vectores pueden basarse en lo mismo de cepa o serotipo (o subgrupo o variante), o ser diferentes entre sí. Como ejemplo no limitante, un plásmido de un vector recombinante (por ejemplo, AAV) o un genoma vectorial (por ejemplo, AAV) basado en un genoma de serotipo puede ser idéntico a una o más de las proteínas de la cápside que empaquetan el vector. Además, un plásmido de un vector recombinante (por ejemplo, AAV) o un genoma vectorial (por ejemplo, AAV) puede basarse en un genoma de serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2) distinto de una o más de las proteínas de cápside que empaquetan el vector, en cuyo caso por lo menos una de las tres proteínas de la cápside podría ser un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 o una variante tal como la variante AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de la cápside tales como 4-1, 15-1, 15-2, 15-3 / 15-5, 15-4 y 15-6), por ejemplo.

Los vectores de AAV incluyen por lo tanto secuencias de gen / proteína idénticas a las secuencias de gen / proteína características para un serotipo particular. Según se usa en este documento, un "vector AAV relacionado con AAV1" se refiere a una o más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias VP1, VP2 y/o VP3) que tiene identidad de secuencia sustancial con uno o más polinucleótidos o secuencias polipeptídicas que comprenden AAV1. Análogamente, un "vector de AAV relacionado con AAV8" se refiere a una o

más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias VP1, VP2 y/o VP3) que tiene identidad de secuencia sustancial con uno o más polinucleótidos o secuencias de polipéptidos que comprenden AAV8. Un "vector AAV relacionado con AAV-Rh74" se refiere a una o más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias VP1, VP2 y/o VP3) que tiene identidad de secuencia sustancial con uno o más polinucleótidos o secuencias de polipéptidos que comprenden AAV8. Un "vector AAV relacionado con AAV-Rh74" se refiere a una o más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2 y/o VP3) que tiene una identidad de secuencia sustancial con uno o más polinucleótidos o secuencias de polipéptidos que comprende AAV-Rh74 (ver, por ejemplo, VP1, VP2, VP3 de las Figuras 1-3). Dichos vectores de AAV relacionados con otro serotipo, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, pueden tener, por lo tanto, una o más secuencias distintas de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, pero pueden exhibir una identidad de secuencia sustancial con uno o más genes y/o proteínas, y/o tener una o más características funcionales de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 (por ejemplo, tales como tropismo celular / tisular). Las variantes ejemplares no limitantes AAV-rH74 y AAV relacionadas tales como AAV-Rh74 o AAV relacionado tales como secuencias de variantes de AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside tales como 4-1, 15-1, 15-2, 15-3 / 15- 5, 15-4 y 15-6) incluyen VP1, VP2, y/o VP3 expuestas aquí, por ejemplo, en las Figuras 1-9.

En diversas modalidades ejemplares, un vector de AAV relacionado con un serotipo de referencia tiene un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia del mismo que incluye o consiste en una secuencia de por lo menos 80% o más (por ejemplo, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, etc.) idénticos a uno o más AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 (por ejemplo, tales como secuencias de AAV-Rh74 VP1, VP2, y/o VP3 expuestas en las Figuras 1-9).

Los métodos y usos de la invención incluyen secuencias de AAV (polipéptidos y nucleótidos), secuencias de AAV-Rh74 (polipéptidos y nucleótidos) y subsecuencias de las mismas que exhiben menos de 100% de identidad de secuencia con un serotipo de AAV de referencia tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10 o AAV-2i8, por ejemplo, secuencia del gen o proteína AAV-Rh74 (por ejemplo, secuencias VP1, VP2, y/o VP3 expuestas en las Figuras 1-9), pero son distintos y no idénticos a los genes o proteínas de AAV conocidos, tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, genes o proteínas, etc. En una modalidad, un polipéptido de AAV o una subsecuencia del mismo incluye o consiste en una secuencia de por lo menos 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 100% idéntico a cualquier secuencia AAV de referencia o subsecuencia de la misma, como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 expuestas en las Figuras 1-9). En aspectos

particulares, una variante de AAV tiene una, dos, tres o cuatro de las cuatro sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, variante de cápside 4-1, 15-1, 15-2, 15-3 / 15-5, 15-4 y 15-6).

Vectores recombinantes (por ejemplo, AAV), incluyendo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 y secuencias variantes, relacionadas, híbridas y quiméricas, puede construirse usando técnicas recombinantes que son conocidas por los expertos en la técnica, para incluir una o más secuencias de polinucleótidos heterólogos (transgenes) flanqueadas con una o más secuencias funcionales de ATR ITR. Dichos vectores pueden tener uno o más de los genes de AAV de tipo natural eliminados en su totalidad o en parte, por ejemplo, un gen rep y/o cap, pero conservan por lo menos una secuencia de ITR flanqueante funcional, según sea necesario para el rescate, la replicación y empaquetado del vector recombinante en una partícula de vector de AAV. Un genoma vectorial de AAV incluiría, por lo tanto, secuencias requeridas en cis para la replicación y el empaquetamiento (por ejemplo, secuencias de ITR funcionales).

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en este documento para referirse a todas las formas de ácido nucleico, oligonucleótidos, que incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los polinucleótidos incluyen ADN genómico, ADNc y ADN antisentido, y ARNm empalmados o no empalmados, ARNt de ARNr y ADN o ARN inhibidor (ARNi, por ejemplo, ARN de horquilla pequeña o corta (sh), microARN (miARN), (si)ARN de interferencia pequeña o corta, ARN de

empalme trans, o ARN antisentido). Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos modificados o alterados de forma natural, sintéticos e intencionalmente modificados (por ejemplo, que tienen dinucleótidos CpG reducidos). Los polinucleótidos pueden ser simples, dobles o triples, lineales o circulares, y pueden ser de cualquier longitud. Al hablar de polinucleótidos, una secuencia o estructura de un polinucleótido particular se puede describir aquí de acuerdo con la convención de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

Un polinucleótido "heterólogo" se refiere a un polinucleótido insertado en un vector (por ejemplo, AAV) con fines de transferencia / administración mediada por un vector del polinucleótido en una célula. Los polinucleótidos heterólogos son típicamente distintos del ácido nucleico del vector (por ejemplo, AAV), es decir, no son nativos con respecto al ácido nucleico viral (por ejemplo, AAV). Una vez transferido / administrado en la célula, un polinucleótido heterólogo, contenido dentro del vector, puede expresarse (por ejemplo, transcribirse y traducirse si es apropiado). Alternativamente, no es necesario expresar un polinucleótido heterólogo transferido / administrado en una célula contenida en el vector. Aunque el término "heterólogo" no siempre se usa aquí en referencia a polinucleótidos, la referencia a un polinucleótido incluso en ausencia del modificador "heterólogo" pretende incluir polinucleótidos heterólogos a pesar de la omisión. Un ejemplo de una secuencia heteróloga sería un Factor IX que codifica un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como un

ácido nucleico que tiene dinucleótidos CpG reducidos con respecto a una secuencia de ácido nucleico de referencia.

Los "polipéptidos", "proteínas" y "péptidos" codificados por las "secuencias de polinucleótidos" incluyen secuencias nativas de longitud completa, como con proteínas de origen natural, así como subsecuencias funcionales, formas modificadas o variantes de secuencia siempre que la subsecuencia, forma modificada o variante conserva algún grado de funcionalidad de la proteína nativa de longitud completa. En los métodos y usos de la invención, tales polipéptidos, proteínas y péptidos codificados por las secuencias de polinucleótidos pueden, pero no se requiere, ser idénticos a la proteína endógena que es defectuosa, o cuya expresión es insuficiente, o deficiente en el mamífero tratado.

En los vectores de lentivirus y parvovirus de la invención, tales como un vector adenoviral y vectores de AAV, que incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 y variantes relacionadas de AAV tales como variantes de AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside tales como 4-1, 15-1, 15-2, 15-3 / 15-5, 15-4 y 15-6) puede usarse para introducir / administrar polinucleótidos de forma estable o transitoria en células y su progenie. El término "transgén" se usa en la presente memoria para referirse de forma conveniente a un polinucleótido heterólogo de este tipo que está destinado o ha sido introducido en una célula u organismo. Los transgenes incluyen cualquier polinucleótido, tal como un gen que codifica un polipéptido o proteína (por ejemplo, Factor IX).

Por ejemplo, en una célula que tiene un transgén, el transgén se ha introducido / transferido por medio de un vector, tal como AAV, "transducción" o "transfección" de la célula. Los términos "transducir" y "transfectar" se refieren a la introducción de una molécula tal como un polinucleótido en una célula u organismo huésped.

Una célula en la que se ha introducido el transgén se denomina "célula transducida". Por consiguiente, una célula "transducida" (por ejemplo, en un mamífero, tal 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 (por ejemplo, un transgén) en la célula. Por lo tanto, una célula "transducida" es una célula en la que, o una progenie de la misma en la que se ha introducido una molécula exógena, por ejemplo. La(s) célula(s) se pueden propagar y la proteína introducida se puede expresar, o se puede transcribir el ácido nucleico. Para usos y métodos de terapia genética, una célula transducida puede estar en un sujeto.

El polinucleótido introducido puede o no estar integrado en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor. Si un polinucleótido introducido se integra en el ácido nucleico (ADN genómico) de la célula u organismo receptor, puede mantenerse de forma estable en esa célula u organismo y transmitirse o heredarse adicionalmente por células de progenie u organismos de la célula u organismo receptor. Finalmente, el ácido nucleico introducido puede existir en la célula receptora u organismo huésped solo transitoriamente.

Las células que pueden transducirse incluyen una célula de cualquier tipo de tejido u órgano, de cualquier origen (por ejemplo, mesodermo, ectodermo o endodermo). Los ejemplos no limitantes de células incluyen hígado (por ejemplo, hepatocitos, células endoteliales sinusoidales), páncreas (por ejemplo, células de islotes beta), sistema nervioso central, periférico o de pulmón, como cerebro (por ejemplo, células neuronales, gliales o ependimarias) o columna vertebral, riñón, ojo (por ejemplo, retina, componentes celulares), bazo, piel, timo, testículos, pulmón, diafragma, corazón (cardíaco), músculo o psoas o intestino (por ejemplo, endocrino), tejido adiposo (blanco, marrón o beige), músculo (por ejemplo, fibroblastos), sinoviocitos, condrocitos, osteoclastos, células epiteliales, células endoteliales, glándulas salivales, células nerviosas del oído interno o células hematopoyéticas (por ejemplo, sangre o linfa). Los ejemplos adicionales incluyen células madre, como células progenitoras pluripotentes o multipotentes que se desarrollan o se diferencian en hígado (por ejemplo, hepatocitos, células endoteliales sinusoidales), páncreas (por ejemplo, células de islotes beta), pulmón, sistema nervioso central o periférico, tal como cerebro (por ejemplo, células neurales, gliales o ependimales) o columna vertebral, riñón, ojo (retina, componentes celulares), bazo, piel, timo, testículos, pulmón, diafragma, corazón (cardíaco), músculo o psoas o intestino (por ejemplo, endocrino), tejido adiposo (blanco, marrón o beige), músculo (por ejemplo, fibroblastos), sinoviocitos, condrocitos, osteoclastos, células epiteliales, células endoteliales, glándulas salivales, células nerviosas del oído interno o células hematopoyéticas (por ejemplo, sangre o linfa).

Una "molécula terapéutica" en una modalidad es un péptido o proteína que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un péptido o proteína "terapéutico" codificado por un transgén es uno que confiere un beneficio a un sujeto, por ejemplo, para corregir un defecto genético, para corregir una deficiencia del gen (expresión o funcional).

Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos heterólogos que codifican productos genéticos (por ejemplo, proteínas terapéuticas) que son útiles de acuerdo con la invención incluyen aquellos que pueden usarse en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que incluye, pero no se limita a, coagulación de la sangre trastornos tales como hemofilia A, hemofilia B, talasemia y anemia.

Todas las formas de polinucleótidos de mamíferos y no mamíferos que codifican productos genéticos, que incluyen los genes y proteínas no limitantes descritos en la presente memoria están expresamente incluidos, ya sean conocidos o desconocidos. Por lo tanto, la invención incluye genes y proteínas de mamíferos no mamíferos, mamíferos distintos de humanos y humanos, cuyos genes y proteínas funcionan de manera sustancialmente similar a los genes y proteínas humanos descritos en este documento. Ejemplos no limitantes de secuencias de Factor IX no humanas de mamífero se describen en Yoshitake et al., 1985, arriba; Kurachi et al., 1995, arriba; Jallat et al., 1990, arriba; 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 formas modificadas y variantes. Como se usa en el presente documento, 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 variantes pueden tener sustancialmente la misma, mayor o menor actividad o función que una secuencia de referencia, pero retener por lo menos una actividad parcial o función de la secuencia de referencia. En modalidades particulares, un ácido nucleico modificado codifica el Factor IX, y se ha modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG en comparación con un Factor IX de referencia que codifica el ácido nucleico (por ejemplo, secuencia de Factor IX natural, tal como una secuencia de genes del Factor IX humano u otro mamífero).

Las variantes también incluyen las variantes de ganancia y pérdida de función. Por ejemplo, las secuencias de ADN del Factor IX humano de tipo natural, cuyas variantes de proteína o mutantes que retienen la actividad, o son terapéuticamente eficaces, o son comparativamente o incluso más terapéuticamente activos que el Factor IX humano invariable en los métodos y usos de la invención. En un ejemplo no limitante de una variante del Factor IX

humano de origen natural, llamada "Padua", el Factor IX humano tiene una L (leucina) en la posición 338 en lugar de una R (arginina). El Padua FIX tiene una mayor actividad catalítica y coagulante en comparación con el Factor IX humano que carece de la mutación de Padua. Cambiar el Residuo 338 en el Factor IX humano de Arginina a Alanina provoca un aumento en la actividad catalítica (Chang et al., J. Biol. Chem., 273: 12089-94 (1998)). En otro ejemplo particular, el colágeno IV sirve para atrapar el Factor IX, lo que significa que cuando se introduce en el tejido muscular de un mamífero, parte del Factor IX 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 Factor IX que da como resultado una proteína con unión reducida al colágeno IV (por ejemplo, pérdida de función) es un mutante útil, por ejemplo, para el tratamiento de la hemofilia. Un ejemplo de dicho gen mutante del Factor IX codifica una proteína FIX humana con el aminoácido alanina en lugar de lisina en la quinta posición de aminoácido desde el comienzo de la proteína madura.

Los ejemplos no limitantes de modificaciones incluyen una o más sustituciones de nucleótidos o aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100, o más nucleótidos o residuos), como la sustitución de un CpG por un dinucleótido alternativo en un transgén (por ejemplo, un gen que codifica el Factor IX, como el gen que codifica FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). Un ejemplo de una sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácido conservadora en una secuencia de cápside. Otro ejemplo de una sustitución de aminoácidos es una

arginina para un residuo de lisina (por ejemplo, una o más sustituciones de arginina de una lisina según se establece en cualquiera de 4-1, 15-1, 15-2, 15-3 / 15-5, 15-4 y/o 15-6). Las modificaciones adicionales incluyen adiciones (por ejemplo, inserciones o 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100, o más nucleótidos o residuos) y eliminaciones (por ejemplo, subsecuencias o fragmentos) de una secuencia de referencia. En modalidades particulares, una secuencia modificada o variante retiene por lo menos parte de una función o actividad de secuencia no modificada. Dichas formas y variantes modificadas pueden tener la misma, menor que, o mayor, pero por lo menos parte de, una función o actividad de una secuencia de referencia, por ejemplo, como se describe aquí.

Como se establece en el presente documento, una variante puede tener una o más diferencias o modificaciones, o ambas, de secuencia de aminoácidos no conservadora o conservadora. Una "sustitución conservadora" es el reemplazo de un aminoácido por un residuo biológica, química 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 ambos hidrófilos o hidrófobos. Los ejemplos particulares incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina, serina por treonina y similares. Los

ejemplos particulares de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo 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 de aminoácidos conservadoras incluyen típicamente 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 conservadora" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido.

En consecuencia, la invención incluye variantes de genes y proteínas (por ejemplo, de polinucleótidos que codifican las proteínas descritas en la presente memoria) que retienen una o más actividades biológicas (por ejemplo, función en la coagulación de la sangre, etc.). Las variantes pueden diferir de una secuencia de referencia, como polinucleótidos, proteínas o péptidos de origen natural. Dichas variantes de polinucleótidos, proteínas o polipéptidos incluyen proteínas o polipéptidos que han sido o pueden ser modificados usando tecnología de ADN recombinante de manera que el polinucleótido, proteína o polipéptido posea propiedades alteradas o adicionales.

A nivel de la secuencia de nucleótidos, un gen variante natural y no natural típicamente será por lo menos aproximadamente 50% idéntico, más típicamente aproximadamente 70% idéntico, incluso más típicamente aproximadamente 80% idéntico al gen de referencia. Por lo tanto, por ejemplo,

un gen FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG puede tener 80% o más de identidad con el gen FIX de tipo natural, u 80-85%, 85-90%, 90-95% o más de identidad con el gen FIX de tipo natural, por ejemplo, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad con el gen FIX de tipo natural.

A nivel de la secuencia de aminoácidos, una proteína variante natural y no natural típicamente será por lo menos aproximadamente 70% idéntica, más típicamente aproximadamente 80% idéntica, incluso más típicamente aproximadamente 90% o más de identidad con la proteína de referencia, aunque se permiten regiones sustanciales de no identidad en regiones no conservadas (por ejemplo, menos de 70% idénticas, tales como menos de 60%, 50% o incluso 40%). En otras modalidades, las secuencias tienen por lo menos 60%, 70%, 75% o más de identidad (por ejemplo, 80%, 85% 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad) con una secuencia de referencia.

El término "identidad", "homología" y variaciones gramaticales de los mismos, significa que dos o más entidades referenciadas son las mismas, cuando son secuencias "alineadas". Por lo tanto, a modo de ejemplo, cuando dos secuencias de polipéptidos son idénticas, tienen la misma secuencia de aminoácidos, por lo menos dentro de la región o porción referenciada. Cuando dos secuencias de polinucleótidos son idénticas, tienen la misma secuencia de polinucleótidos, por lo menos dentro de la región o porción a la que se hace referencia. La identidad puede estar sobre un área definida (región o dominio) de la secuencia. Un "área" o "región" de identidad se refiere a una parte de dos o más entidades referenciadas que son iguales. Por lo tanto, cuando dos

secuencias de proteína o de ácido nucleico son idénticas en una o más áreas o regiones de 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 faltantes o adicionales o aminoácidos (espacios) en comparación con una secuencia de referencia.

La identidad puede extenderse sobre toda la longitud 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. polinucleótidos o aminoácidos contiguos. En aspectos particulares adicionales, la longitud de la identidad de intercambio de secuencias es 21 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, etc. polinucleótidos o aminoácidos contiguos. En aspectos particulares adicionales, la longitud de la identidad de intercambio de secuencias es de 41 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, etc., polinucleótidos o aminoácidos contiguos. En incluso otros aspectos particulares, la longitud de la identidad de intercambio de secuencias es de 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. polinucleótido o aminoácidos contiguo.

Los términos "homólogo" u "homología" significan que dos o más entidades referenciadas comparten por lo menos una identidad parcial sobre una región o porción dada. "Áreas, regiones o dominios" de homología o identidad significa que una parte de dos o más entidades referenciadas comparten 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 por lo 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 región o porción relevante / correspondiente de la molécula de referencia con la que comparte homología.

El grado de identidad (homología) entre dos secuencias se puede determinar usando un programa informático y/o un algoritmo matemático. Dichos algoritmos que calculan el porcentaje de identidad de secuencia (homología) generalmente tienen en cuenta los espacios de secuencia y los desajustes en la región o área de comparación. Por ejemplo, un algoritmo de búsqueda BLAST (por ejemplo, BLAST 2.0) (ver, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990), disponible públicamente a través de NCBI) tiene parámetros de búsqueda ejemplares de la siguiente manera: Desajuste -2; brecha abierta 5; extensión de brecha 2. Para las comparaciones de secuencia de polipéptidos, un algoritmo BLASTP se usa típicamente en combinación con una matriz de puntuación, como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 o BLOSUM 50. Los programas de comparación de secuencia FASTA (por ejemplo,

FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH también se usan para cuantificar el grado de 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 proteica usando el mapeo topológico basado en Delaunay (Bostick et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 304:320 (2003)).

Los polinucleótidos incluyen adiciones e inserciones, por ejemplo, uno o más dominios heterólogos. Una adición (por ejemplo, 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 de referencia nativa (de tipo natural) unida covalentemente a la secuencia. Los términos "fusión" o "quimérico" y las variaciones gramaticales de los mismos, cuando se usan en referencia a una molécula, significa que una parte o parte de la molécula contiene una entidad diferente distinta (heteróloga) de la molécula, ya que típicamente no existen juntos en naturaleza. Es decir, por ejemplo, una parte de la fusión o quimera incluye o consiste en una porción que no existe en la naturaleza y es estructuralmente distinta.

El término "vector" se refiere a un plásmido, virus (por ejemplo, vector de AAV) u otro vehículo que puede manipularse mediante inserción o incorporación de un polinucleótido. Dichos vectores pueden usarse 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. Una secuencia de ácido nucleico vectorial generalmente contiene por lo menos un origen de replicación para la propagación en una célula y opcionalmente elementos adicionales, tales como una secuencia de polinucleótidos heterólogos, elemento de control de expresión (por ejemplo, un promotor, potenciador), intrón, ITR(s), marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos), secuencia de poliadenina (también denominada poliadenilación).

Un vector viral se deriva de o se basa en uno o más elementos de ácido nucleico que comprenden un genoma viral. Los vectores virales particulares incluyen vectores lentivirus y parvovirus, tales como vectores de virus adenoasociados (AAV).

Como se usa en el presente documento, el término "recombinante" como un modificador de vector viral, tal como vectores recombinantes de lentivirus o parvovirus (por ejemplo, AAV), así como un modificador de secuencias tales como polinucleótidos y polipéptidos recombinantes, significa que las composiciones (por ejemplo, AAV o secuencias) han sido manipuladas (es decir, diseñadas genéticamente) de una manera que generalmente no ocurre en la naturaleza. Un ejemplo particular de un vector recombinante, tal como un

vector de AAV, sería cuando un polinucleótido que no está normalmente presente en el genoma viral de tipo natural (por ejemplo, AAV) se inserta dentro del genoma viral. Por ejemplo, un ejemplo de un polinucleótido recombinante sería cuando un polinucleótido heterólogo (por ejemplo, un gen) que codifica una proteína se clona en un vector, con o sin regiones 5', 3' y/o de intrón que el gen normalmente se asocia dentro del genoma viral (por ejemplo, AAV). Aunque el término "recombinante" no siempre se usa en este documento en referencia a vectores, tales como vectores virales y de AAV, así como secuencias tales como polinucleótidos y polipéptidos, se incluyen expresamente formas recombinantes de virus, AAV y secuencias que incluyen polinucleótidos y polipéptidos a pesar de dicha omisión.

Un "vector" viral recombinante o "vector AAV" se deriva del genoma de tipo natural de un virus, tal como AAV usando métodos moleculares para eliminar el genoma de tipo natural del virus (por ejemplo, AAV), y reemplazándolo con un ácido nucleico no nativo, tal como una secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico modificada que codifica FIX humano, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). Típicamente, para AAV, una o ambas secuencias de repetición de terminal invertido (ITR) del genoma de AAV se retienen en el vector de AAV. Un vector viral "recombinante" (por ejemplo, AAV) se distingue de un genoma viral (por ejemplo, AAV), ya que todo o una parte del genoma viral ha sido reemplazado por una secuencia no nativa con respecto al ácido nucleico genómico la viral (por ejemplo, AAV) tal como una secuencia de polinucleótidos heterólogos (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico

modificada que codifica FIX humano, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). La incorporación de una secuencia no nativa (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico modificada que codifica FIX humano, como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG) define por lo tanto el vector viral (por ejemplo, AAV) como un vector "recombinante", que en el caso de AAV se puede referir como un "vector de rAAV".

Una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, lenti-, parvo-, AAV) se puede empaquetar, a la que se hace referencia en este documento como una "partícula" para infección posterior (transducción) de una célula, *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Cuando una secuencia de vector recombinante es encapsidada o se empaqueta en una partícula de AAV, la partícula también se puede denominar como "rAAV". Dichas partículas incluyen proteínas que encapsidan o empaquetan el genoma vectorial. Los ejemplos particulares incluyen proteínas de envoltura viral, y en el caso de AAV, proteínas de cápside.

Para un plásmido recombinante, un "genoma" vectorial se refiere a la porción de la secuencia de plásmido recombinante que finalmente se empaqueta o encapsida para formar una partícula viral (por ejemplo, AAV). En los casos en que se usan plásmidos recombinantes para construir o fabricar vectores recombinantes, el genoma vectorial no incluye la porción del "plásmido" que no corresponde a la secuencia del genoma vectorial del plásmido recombinante. Esta porción del genoma no vectorial del plásmido recombinante se conoce como la "cadena principal del plásmido", que es importante para la clonación y amplificación del plásmido, un proceso que es

necesario para la propagación y producción del virus recombinante, pero no se empaqueta o encapsula en partículas de virus (por ejemplo, AAV).

De este modo, un "genoma" vectorial se refiere a la porción del plásmido vectorial que está empaquetada o encapsidada por virus (por ejemplo, AAV) y que contiene una secuencia de polinucleótidos heterólogos. La porción del genoma no vectorial del plásmido recombinante es la "cadena principal del plásmido" que es importante para la clonación y amplificación del plásmido, por ejemplo, tiene un marcador seleccionable, como kanamicina, pero no está empaquetado ni encapsidado por virus (por ejemplo, AAV).

Las cantidades de rAAV que encapsidan / empaquetan genomas vectoriales pueden determinarse, por ejemplo, mediante PCR cuantitativa. Este ensayo mide el número físico de genomas vectoriales empaquetados mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real y se puede realizar en diversas etapas del proceso de fabricación / purificación, por ejemplo, en el vector AAV a granel y el producto final.

Las secuencias de vectores recombinantes se manipulan mediante inserción o incorporación de un polinucleótido. Como se describe en el presente documento, un plásmido vectorial generalmente contiene por lo menos un origen de replicación para la propagación en una célula y uno o más elementos de control de la expresión.

Las secuencias de vectores que incluyen vectores de AAV pueden incluir uno o más "elementos de control de la expresión". Típicamente, los elementos de control de la expresión son secuencia(s) de ácido nucleico que influyen en la expresión de un polinucleótido enlazado operativamente. Se incluyen elementos de control, incluyendo elementos de control de expresión como se establece en el presente documento como promotores y potenciadores, presentes dentro de un vector para facilitar la transcripción de polinucleótidos heterólogos y, si corresponde, la traducción (por ejemplo, un promotor, potenciador, señal de empalme para intrones, mantenimiento del correcto marco de lectura del gen para permitir la traducción en el marco del ARNm y, codones de parada, etc.). Tales elementos típicamente actúan en cis, denominado elemento "de acción cis", pero también pueden actuar en trans.

El control de expresión puede efectuarse al nivel de la transcripción, traducción, corte y empalme, estabilidad de mensaje, etc. Típicamente, un elemento de control de expresión que modula la transcripción se yuxtapone cerca del extremo 5' (es decir, "corriente arriba") de un polinucleótido transcrito (por ejemplo, de un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). Los elementos de control de la expresión también pueden estar ubicados en el extremo 3' (es decir, "corriente abajo") de la secuencia transcrita o dentro de la transcripción (por ejemplo, en un intrón). Los elementos de control de la expresión se pueden ubicar adyacentes o a una distancia aleada de la secuencia transcrita (por ejemplo, 1-10, 10-25, 25-50, 50-100, 100 a 500 o más nucleótidos del polinucleótido), incluso a distancias considerables. Sin embargo, debido a las

limitaciones de longitud de polinucleótidos de ciertos vectores, tales como vectores de AAV, tales elementos de control de la expresión estarán típicamente dentro de 1 a 1000 nucleótidos del polinucleótido transcrito.

Funcionalmente, la expresión del polinucleótido heterólogo enlazado operativamente es controlable por lo menos en parte por el elemento (por ejemplo, promotor) de manera que el elemento modula la transcripción del polinucleótido y, según sea apropiado, la traducción de la transcripción. Un ejemplo específico de un elemento de control de la expresión es un promotor, que normalmente se ubica en 5' de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de un elemento de control de la expresión es un potenciador, que puede localizarse en 5', 3' de la secuencia transcrita, o dentro de la secuencia transcrita.

Un "promotor" como se usa en el presente documento puede referirse a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que está localizada adyacente a una secuencia de polinucleótidos que codifica un producto recombinante. Un promotor típicamente se enlaza de forma operativa a una secuencia adyacente, por ejemplo, un polinucleótido heterólogo (por ejemplo, ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX). Típicamente, un promotor aumenta una cantidad expresada a partir de un polinucleótido heterólogo en comparación con una cantidad expresada cuando no existe un promotor.

Un "potenciador" como se usa en este documento puede referirse a una secuencia que está localizada adyacente al polinucleótido heterólogo. Los elementos potenciadores típicamente se localizan corriente arriba de un

elemento promotor pero también funcionan y pueden localizarse corriente abajo o dentro de una secuencia de ADN (por ejemplo, un polinucleótido heterólogo). Por lo tanto, un elemento potenciador puede ubicarse 100 pares de bases, 200 pares de bases, o 300 o más pares de bases corriente arriba o corriente abajo de un polinucleótido heterólogo. Los elementos potenciadores aumentan típicamente la expresión de un polinucleótido heterólogo por encima de la expresión incrementada proporcionada por un elemento promotor.

Los elementos de control de expresión (por ejemplo, promotores) incluyen los activos en un tipo de tejido o célula particular, denominados en este documento "elementos / promotores de control de expresión específicos de tejido". Los elementos de control de expresión específicos de tejido típicamente son activos en células o tejidos específicos (por ejemplo, hígado, cerebro, sistema nervioso central, médula espinal, ojo, retina, hueso, músculo, pulmón, páncreas, corazón, células renales, etc.). Los elementos de control de expresión típicamente son activos en estas células, tejidos u órganos porque son reconocidos por proteínas activadoras transcripcionales, u otros reguladores de la transcripción, que son únicos para un tipo específico de célula, tejido u órgano.

Los ejemplos de promotores activos en el músculo esquelético incluyen promotores de genes que codifican α -actina esquelética, cadena ligera de miosina 2A, distrofina, creatina quinasa muscular, así como promotores de músculo sintético con actividades superiores a los promotores naturales (ver, por ejemplo, Li, et al., *Nat. Biotech.* 17:241 - 245 (1999)). Los ejemplos de

promotores que son específicos de tejido para hígado son el promotor de alfa 1-antitripsina humana (hAAT); albúmina, Miyatake, et al. *J. Virol.*, 71:5124 - 32 (1997); promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig, et al., *Gene Ther.* 3:1002 - 9 (1996); alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot, et al., *Hum. Gene Ther.*, 7:1503 - 14 (1996)], hueso (osteocalcina, Stein, et al., *Mol. Biol. Rep.*, 24:185 - 96 (1997); sialoproteína ósea, Chen, et al., *J. Bone Miner. Res.* 11: 654-64 (1996)), linfocitos (CD2, Hansal, et al., *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998); cadena pesada de inmunoglobulina; cadena del receptor de células T), promotor neuronal (promotor de la enolasa neuronal específica (NSE), Andersen, et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503 - 15 (1993); gen de la cadena ligera del neurofilamento, Piccioli, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5611-5 (1991), el gen vgf específico de neuronas, Piccioli, et al., *Neuron*, 15:373-84 (1995), entre otros. Un ejemplo de un potenciador activo en el hígado es apolipoproteína E (apoE) HCR-1 y HCR-2 (Allan et al., *J. Biol. Chem.*, 272:29113-19 (1997)).

Los elementos de control de expresión también incluyen promotores / potenciadores ubicuos o promiscuos que son capaces de dirigir la expresión de un polinucleótido en muchos tipos de células diferentes. Tales elementos incluyen, pero no se limitan a, las secuencias promotoras / potenciadoras 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 celulares de mamíferos o elementos sintéticos que no están presentes en la naturaleza (ver, por ejemplo, Boshart et al, *Cell*, 41:521-530 (1985)), el promotor SV40, el promotor

dihidrofolato reductasa, el promotor de β -actina citoplásmica y el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK).

Los elementos de control de la expresión también pueden conferir expresión de una manera que es regulable, es decir, una señal o estímulos que aumentan o disminuyen la expresión del polinucleótido heterólogo enlazado operativamente. Un elemento regulable que aumenta la expresión del polinucleótido enlazado operativamente en respuesta a una señal o estímulos también se denomina un "elemento inducible" (es decir, es inducido por una señal). Los ejemplos particulares incluyen, pero no se limitan a, un promotor inducible por hormonas (por ejemplo, esteroides). Un elemento regulable que disminuye la expresión del polinucleótido enlazado operativamente en respuesta a una señal o estímulos se denomina "elemento reprimible" (es decir, la señal disminuye la expresión de manera que cuando la señal se elimina o falta, la expresión aumenta). Típicamente, la cantidad de aumento o disminución conferida por dichos elementos es proporcional a la cantidad de señal o estímulos presentes; cuanto mayor es la cantidad de señal o estímulos, mayor es el aumento o disminución en la expresión. Ejemplos particulares no limitantes incluyen un promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc; el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por hormonas esteroides; el sistema promotor de la polimerasa T7 (WO 98/10088); el sistema reprimible por tetraciclina (Gossen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547 - 5551 (1992)); el sistema inducible por tetraciclina (Gossen, et al., *Science*, 268:1766 - 1769 (1995); ver también Harvey, et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:512 - 518 (1998)); el sistema inducible por RU486 (Wang, et al., *Nat.*

Biotech., 15:239-243 (1997) y Wang, et al., *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)], y el sistema inducible por rapamicina. (Magari, et al., *J. Clin. Invest.* 100:2865 - 2872 (1997); Rivera, et al., *Nat. Medicine.*, 2:1028 - 1032 (1996)). Otros elementos de control regulables que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda, desarrollo.

Los elementos de control de la expresión también incluyen elemento(s) nativo(s) para el polinucleótido heterólogo. Se puede usar un elemento de control nativo (por ejemplo, un promotor) cuando se desea que la expresión del polinucleótido heterólogo debe imitar a la expresión nativa. El elemento nativo puede usarse cuando la expresión del polinucleótido heterólogo debe regularse temporalmente o por desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos de transcripción específicos. También se pueden usar otros elementos de control de la expresión nativa, tales como intrones, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak.

Según se usa en la presente memoria, el término "enlace operable" o "enlazado operativamente" 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 un enlace operable con un ácido nucleico, la relación es tal que el elemento de control modula la expresión del ácido nucleico. Más específicamente, por ejemplo, dos secuencias de ADN enlazadas operativamente significa que los dos ADNs están dispuestos (en cis o trans) en una relación tal que por lo menos una de

las secuencias de ADN es capaz de ejercer un efecto fisiológico sobre la otra secuencia.

En consecuencia, las secuencias de ácido nucleico modificadas que codifican la proteína FIX humana, y los vectores y plásmidos, que incluyen vectores virales tales como vectores de lentivirus y parvovirus, que incluyen vectores de AAV, así como sus composiciones, pueden incluir elementos de ácido nucleico adicionales. Estos elementos incluyen, sin limitación, una o más copias de una secuencia ITR de AAV, un elemento de control de expresión (por ejemplo, promotor / potenciador), una señal de terminación de transcripción o un codón de parada, regiones no traducidas 5' o 3' (por ejemplo, secuencias de poliadenilación (poliA)) que flanquean una secuencia de polinucleótidos, o un intrón, tal como la totalidad o una porción del intrón I del Factor IX genómico humano (SEC ID NO: 13).

Los elementos de ácido nucleico incluyen además, por ejemplo, secuencias de polinucleótidos de relleno o de rellenado, por ejemplo para mejorar el empaquetamiento y reducir la presencia de ácido nucleico contaminante, por ejemplo, para reducir el empaquetamiento de la cadena principal del plásmido. Como se describe en este documento, los vectores de AAV típicamente aceptan insertos de ADN que tienen un intervalo de tamaño definido que generalmente es de aproximadamente 4 kb a aproximadamente 5.2 kb, o ligeramente más. Por lo tanto, para secuencias más cortas, la inclusión de un rellenado o relleno en el fragmento de inserción con el fin de ajustar la longitud a cerca o al tamaño normal de la secuencia genómica del

virus aceptable para el empaquetamiento del vector AAV en partículas de virus. En diversas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de relleno / relleno es un segmento de ácido nucleico no traducido (que no codifica proteínas). En modalidades particulares de un vector de AAV, una secuencia de polinucleótidos heterólogos tiene una longitud menor que 4.7 kb y la secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno tiene una longitud que cuando se combina (por ejemplo, se inserta en un vector) con la secuencia de polinucleótidos heterólogos tiene una longitud total entre aproximadamente 3.0-5.5kb, o entre aproximadamente 4.0-5.0Kb, o entre aproximadamente 4.3-4.8Kb.

Un intrón también puede funcionar como una secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno con el fin de alcanzar una longitud para el vector de AAV que se empaqueta en una partícula de virus. Los intrones y los fragmentos de intrón (por ejemplo, la porción del intrón I de FIX) que funcionan como una secuencia de polinucleótidos de relleno o relleno también pueden potenciar la expresión. La inclusión de un elemento de intrón puede mejorar la expresión en comparación con la expresión en ausencia del elemento intrón (Kurachi et al., 1995, arriba).

El uso de intrones no se limita a la inclusión de secuencias del intrón I del Factor IX, sino que también incluye otros intrones, cuyos intrones pueden estar asociados con el mismo gen (por ejemplo, cuando el ácido nucleico codifica el Factor IX, el intrón se deriva de un intrón presente en la secuencia genómica del Factor IX) o asociado con un gen completamente diferente u otra

secuencia de ADN. Por consiguiente, otras regiones de ácido nucleico no traducidas (que no codifican proteínas), tales como intrones encontrados en secuencias genómicas de genes afines (relacionados) (la secuencia de polinucleótidos heterólogos codifica toda o una porción de la misma proteína codificada por la secuencia genómica) y los genes no afines (no relacionados) (la secuencia de polinucleótidos heterólogos codifica una proteína que es distinta de la proteína codificada por la secuencia genómica) también pueden funcionar como secuencias de polinucleótidos de relleno o rellenado de acuerdo con la invención.

Una "porción del intrón I" como se usa en este documento, significa región del intrón I que tiene una longitud de nucleótido de aproximadamente 0.1 kb a aproximadamente 1.7 kb, región que aumenta la expresión del Factor IX, típicamente alrededor de 1.5 veces o más en un plásmido o plantilla de vector viral cuando se compara 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 I. Un ejemplo no limitante de una secuencia del intrón del Factor IX es intrón A, una quimera compuesta por la parte 5' y la parte 3' del primer intrón FIX como se expone en la SEC ID NO: 13.

Los elementos de control de la expresión, ITRs, secuencias poli A, secuencias de polinucleótidos de relleno o rellenado pueden variar en longitud. En aspectos particulares, un elemento de control de la expresión, ITR, poliA o una secuencia de polinucleótidos de relleno o rellenado es una secuencia entre aproximadamente 1 - 10, 10 - 20, 20 - 30, 30 - 40, 40 - 50, 50 - 60, 60 -75, 75-

100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1,000, 1,000-1,500, 1,500-2,000 o 2,000- 2.500 nucleótidos de longitud.

De acuerdo con una modalidad no limitante, un vector AAV comprende una cápside de AAV que comprende la proteína VP1 variante de la cápside 4-1 (SEC ID NO: 4) y un genoma para expresar un gen heterólogo en una célula de mamífero transducida.

La cápside de este vector puede comprender además las proteínas VP2 y VP3 de la variante de la cápside 4-1 (SEC ID NO: 27 y SEC ID NO: 3, respectivamente). De acuerdo con ciertas modalidades no limitantes, la proteína VP1 y las proteínas VP2 están en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:1 (o en alguna otra proporción), y la proteína VP3 está en una relación VP1 o VP2, o ambas VP1 y VP2 , en una proporción aproximada de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, o alguna otra relación.

En algunas modalidades, un genoma de un vector de AAV, que incluye sin limitación uno que tiene una cápside que comprende las proteínas variantes de cápside 4-1 (VP1, VP2, VP3), comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica la proteína del Factor IX humano (FIX). En algunas modalidades, la proteína FIX es de tipo natural, y en otras modalidades la proteína FIX contiene una mutación de sustitución u otra mutación que altera la actividad de la proteína. En algunas modalidades, la mutación aumenta la actividad catalítica de FIX y/o la actividad de la proteína como un

procoagulante. En algunas modalidades, la proteína FIX es la proteína Padua FIX, con una sustitución Arg a Ala en el aminoácido correspondiente a la posición 338 de la proteína FIX. De acuerdo con algunas modalidades, un gen que codifica FIX humano (que incluye FIX Padua) se optimiza con un codón, por ejemplo, reduciendo o incluso eliminando dinucleótidos CpG. También son posibles otros tipos de optimización de codones.

En algunas modalidades, un genoma vectorial de AAV comprende además repeticiones de terminal invertido (ITRs) de AAV2 colocadas en los extremos izquierdo y derecho (es decir, extremos 5' y 3', respectivamente) del genoma. En algunas modalidades, una ITR izquierda comprende o consiste en los nucleótidos 1-141 de la SEC ID NO: 12 (descrita aquí como SEC ID NO: 13), y una ITR derecha comprende o consiste en los nucleótidos 4097-4204 de la SEC ID NO: 12 (revelado aquí como SEC ID NO: 20). Cada ITR puede separarse de otros elementos en el genoma vectorial mediante una secuencia de ácido nucleico de longitud variable.

En otras modalidades, un genoma del vector de AAV comprende además un elemento de control de la expresión, que incluye un promotor, y opcionalmente un potenciador. En algunas modalidades, un genoma vectorial de AAV comprende tanto un promotor como un potenciador, que puede ser constitutivo, inducible o específico de tejido. En algunas modalidades, un promotor, o un potenciador, o ambos son específicos de tejido. De acuerdo con una modalidad ejemplar, tanto el potenciador como el promotor son preferentemente activos en los hepatocitos, en comparación con ciertos otros

tipos de células. De acuerdo con una modalidad, un potenciador es todo o una porción del potenciador de ApoE HCR-1 humano, y un promotor es todo o una porción del promotor de alfa-1 antitripsina humana (AAT). En algunas modalidades, un genoma vectorial de AAV incluye un potenciador ApoE HCR-1 humano que comprende o consiste en los nucleótidos 152-472 de la SEC ID NO: 12 (divulgado aquí como SEC ID NO: 14), e incluye un promotor AAT humano que comprende o consiste en de los nucleótidos 482-878 de la SEC ID NO: 12 (divulgado aquí como SEC ID NO: 15). En algunas modalidades, un potenciador de ApoE HCR-1 se coloca en 5' de un promotor de AAT, y las secuencias pueden ser contiguas, o separadas por otra secuencia de nucleótidos. De acuerdo con algunas modalidades, un potenciador y un promotor se colocan en 5' de una secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor IX, y se pueden unir de manera contigua al primer exón de un gen del Factor IX, o se pueden separar de la secuencia 5' no traducida (UTR) de un gen humano del Factor IX, o alguna otra secuencia que sirve como un espaciador. En una modalidad ejemplar no limitante, una secuencia 5' UTR comprende o consiste en los nucleótidos 879-907 de la SEC ID NO: 12.

En algunas modalidades, el gen que codifica FIX, que incluye FIX Padua de origen natural, incluye uno o más intrones presentes en una secuencia genómica de Factor IX humano. En otras modalidades, se pueden excluir todos los intrones, un ejemplo del cual se describe como la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 10 y se denomina en este documento secuencia de codificación para "FIX39". Si está presente, un intrón puede comportarse como una secuencia de relleno o de relleno como se describe en el presente

documento. El gen completo puede optimizarse con codones para reducir o eliminar los dinucleótidos CpG.

En una modalidad particular no limitante, un gen que codifica el Factor IX humano usado en un vector AAV comprende o consiste en los nucleótidos 908-3731 de la SEC ID NO: 12, que codifica el FIX Padua y está optimizado con un codón para eliminar los dinucleótidos CpG. Esta secuencia incluye un exón 1 (nucleótidos 908-995 de la SEC ID NO: 12), un primer intrón (a veces conocido como intrón I, nucleótidos 996-2433 de la SEC ID NO: 12) y exones 2-8 (nucleótidos 2434- 3731 de la SEC ID NO: 12).

En ciertas modalidades, un gen que codifica el Factor IX puede seguirse en su extremo 3' por una secuencia 3' UTR de un gen humano del Factor IX (tal como sin limitación los nucleótidos 3732-3779 de la SEC ID NO: 12 y/o por una secuencia de poliadenilato (poliA) de un gen del Factor IX u otro gen. En un ejemplo no limitante, la secuencia poliA puede ser del gen de la hormona de crecimiento bovino (bGH) y puede comprender o consistir en nucleótidos 3820-4047 de la SEQ. ID NO: 12. En algunas modalidades, un 3'UTR puede estar separado de forma variable de la secuencia poliA por una secuencia interpuesta de nucleótidos.

En algunas modalidades, los elementos descritos anteriormente se pueden combinar en un genoma vectorial de AAV. Según un ejemplo no limitante, un vector de AAV puede tener un genoma que comprende, en un orden de 5' a 3', un ITR de AAV izquierdo, el potenciador de ApoE HCR-1 (o

una porción del mismo), el promotor hAAT (o una porción del mismo), una porción del Factor IX 5'UTR humano, ácido nucleico que codifica el Factor IX Padua humano (que incluye opcionalmente uno o más intrones, tal como el intrón I), una porción de factor IX 3'UTR humano, una secuencia poliA de bGH (o porción del mismo), y a la derecha un AAV2 ITR. En algunas de estas modalidades, un ITR AAV2 izquierdo tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 13; un potenciador de ApoE HCR-1 tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 14; un promotor hAAT tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 15; un 5' UTR tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 16; un gen que codifica FIX Padua (que incluye el intrón I) codifica la proteína FIX codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 10; el 3' UTR tiene una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 18; una región poliA tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 19; y una ITR de AAV2 derecha tiene una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 20.

De acuerdo con ciertas modalidades, un genoma de un vector de AAV comprende o consiste en los nucleótidos 1-4204 de la SEC ID NO: 12, o una secuencia que es por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99 % idéntico a eso. En algunas de estas modalidades, una cápside comprende la variante de proteína de la cápside 4-1 VP1 (SEC ID NO: 4) y las proteínas VP2 y de la cápside VP2 correspondientes. En una modalidad particular no limitante de un vector de AAV, denominado en este documento "AAV-FIX39-Padua", el vector incluye una cápside formada a partir de 4-1 proteínas variantes de la cápside (VP1,

VP2, VP3) y un genoma monocatenario que comprende una secuencia de ácido nucleico que corresponde a los nucleótidos 1-4204 de la SEC ID NO: 12.

Las "cápsides vacías" de AAV como se usan en este documento no contienen un genoma vectorial (por lo tanto, el término "vacío"), en contraste con "cápsides que contienen genoma" que contienen un genoma vectorial de AAV. Las cápsides vacías son partículas similares a virus en que reaccionan con uno o más anticuerpos que reaccionan con el virus intacto (genoma que contiene el vector AAV).

Se pueden incluir cápsides vacías en preparaciones de vectores de AAV. Si se desea, las cápsides vacías de AAV pueden añadirse a las preparaciones de vectores de AAV, o administrarse por separado a un sujeto de acuerdo con los métodos de la presente.

Aunque no se desea vincularse a ninguna teoría, se cree que las cápsides vacías de AAV se unen o reaccionan con anticuerpos contra los vectores de AAV, funcionando así como un señuelo para reducir la inactivación del vector de AAV. Tal señuelo actúa para absorber anticuerpos dirigidos contra el vector de AAV aumentando o mejorando de esta manera la transducción del transgén del vector AAV de las células (introducción del transgén), y a su vez aumenta la expresión celular de la transcripción y/o la proteína codificada.

Las cápsides vacías pueden generarse y purificarse con una calidad y determinarse sus cantidades. Por ejemplo, el título de cápside vacío se puede medir mediante espectrofotometría por densidad óptica a una longitud de onda de 280 nm (en base a Sommer et al., Mol. Ther. 2003 Jan; 7 (1):122-8).

Las cápsides vacías de AAV o vacías a veces se encuentran naturalmente en preparaciones de vectores de AAV. Tales mezclas naturales se pueden usar de acuerdo con la invención, o si se desea se pueden manipular para aumentar o disminuir la cantidad de cápside y/o vector vacíos. Por ejemplo, la cantidad de cápside vacía puede ajustarse opcionalmente a una cantidad que se esperaría que reduzca el efecto inhibitorio de anticuerpos que reaccionan con un vector de AAV que se pretende usar para la transducción de genes mediada por vectores en el sujeto. El uso de cápsides vacías se describe en la publicación estadounidense 2014/0336245.

En diversas modalidades, las cápsides vacías de AAV se formulan con vectores de AAV y/o se administran a un sujeto. En aspectos particulares, las cápsides vacías de AAV se formulan con menos o igual cantidad de vector (por ejemplo, aproximadamente 1.5 a 100 veces vectores de AAV a cápsides vacías de AAV, o aproximadamente una relación 1:1 de vectores de AAV a cápsides vacías de AAV). En otros aspectos particulares, los vectores de AAV se formulan con un exceso de cápsides vacías de AAV (por ejemplo, cápsides vacías de AAV mayores de 1 vez a vectores de AAV, por ejemplo, cápsides vacías de AAV de 1.5 a 100 veces a vectores de AAV). Opcionalmente, los sujetos con título bajo a negativo de AAV NAb pueden recibir cantidades más

bajas de cápsides vacías (de 1 a 10 veces cápsides vacías de AAV a vectores de AAV, cápsides vacías de AAV de 2 a 6 veces para vectores de AAV o aproximadamente 4 a 5 veces cápsides vacías de AAV a vectores de AAV).

De acuerdo con ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas que comprenden vectores de AAV incluyen aquellas que comprenden las proteínas variantes de la 4-1 cápside (VP1, VP2 y VP3), comprenden un exceso de cápsides vacías mayor que la concentración de vectores de AAV (es decir, las que contienen una genoma vectorial) en la composición. Una relación de cápsides vacías a vectores de AAV puede ser de aproximadamente 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10 a 1, o alguna otra relación.

En algunas modalidades, las cápsides vacías comprenden las mismas proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 que están presentes en los vectores de AAV. En otras modalidades, las cápsides vacías comprenden proteínas VP1, VP2 y VP3 que tienen una secuencia de aminoácidos diferente de las encontradas en los vectores de AAV. Típicamente, aunque no necesariamente, si las proteínas de la cápside de las cápsides vacías y las cápsides de los vectores de AAV no son idénticas en secuencia, serán del mismo serotipo.

De acuerdo con algunas modalidades, una composición comprende un vector de AAV descrito en la presente memoria como AAV-FIX39-Padua (o uno que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos idéntica al 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la misma) y opcionalmente un exceso de cápsides vacías que comprenden las mismas proteínas de la cápside, donde la relación de cápsides vacías al vector AAV es aproximadamente 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10 a 1, o alguna otra relación. En algunas modalidades, la relación en la composición de AAV-FIX39-Padua a cápsides vacías es aproximadamente 1:5. En otras modalidades, las composiciones que comprenden AAV-FIX39-Padua y las cápsides vacías se administran a un sujeto humano que tiene hemofilia B, incluida la hemofilia B grave, moderada o leve.

Un "gen marcador seleccionable" se refiere a un gen que cuando se expresa confiere un fenotipo seleccionable, tal como resistencia a antibióticos (por ejemplo, kanamicina), en una célula transducida. Un gen "reportero" es aquel que proporciona una señal detectable. Un ejemplo no limitante de un gen reportero es el gen de la luciferasa.

Se pueden preparar ácidos nucleicos, polinucleótidos, vectores de expresión (por ejemplo, genomas vectoriales), plásmidos, incluyendo formas

modificadas usando diversa clonaciones estándar, tecnología de ADN recombinante, mediante expresión celular o técnicas de traducción *in vitro* y síntesis química. La pureza de los polinucleótidos se puede determinar por secuenciación, electroforesis en gel y similares. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden aislar usando técnicas de hibridación o de selección de bases de datos basadas en computadora. Dichas técnicas incluyen, pero no se limitan a: (1) hibridación de bibliotecas genómicas de ADN o ADNc con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogos; (2) selección 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) en ADN genómico o ADNc usando cebadores capaces de recocido con una secuencia de ácido nucleico de interés; (4) búsquedas por computadora de bases de datos de secuencias para secuencias relacionadas; y (5) selección diferencial de una biblioteca de ácido nucleico sustraída.

El término "aislado", cuando se usa como un modificador de una composición, significa que las composiciones están hechas por la mano del hombre o están separadas, completamente o por lo menos en parte, de su entorno *in vivo* natural. Generalmente, las composiciones aisladas están sustancialmente libres de uno o más materiales con los que normalmente se asocian en la naturaleza, por ejemplo, una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, membrana celular. El término "aislado" no excluye combinaciones producidas por la mano del hombre, por ejemplo, una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, rAAV) o partícula de virus que

empaqueta o encapsida un genoma vectorial y una formulación farmacéutica. El término "aislado" tampoco excluye formas físicas alternativas de la composición, tales como híbridos / quimeras, multímeros / oligómeros, modificaciones (por ejemplo, fosforilación, glucosilación, lipidación) o formas derivatizadas, o formas expresadas en células huésped producidas por la mano de hombre.

Los métodos y usos de la invención proporcionan un medio para administrar (transducir) polinucleótidos heterólogos (transgenes) en células huésped, que incluyen células que se dividen y/o que no se dividen. Las secuencias del vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genomas vectoriales, partículas virales recombinantes, métodos, usos y formulaciones farmacéuticas de la invención son útiles adicionalmente en un método para suministrar, administrar o proporcionar un ácido nucleico o proteína a un sujeto que lo necesita, como un método de tratamiento. De esta manera, el ácido nucleico se transcribe y la proteína puede producirse *in vivo* en un sujeto. El sujeto puede beneficiarse o necesitar el ácido nucleico o proteína porque el sujeto tiene una deficiencia del ácido nucleico o proteína, o porque la producción del ácido nucleico o proteína en el sujeto puede impartir algún efecto terapéutico, como un método de tratamiento o contrario.

En general, las secuencias del vector recombinante lentivirus o parvovirus (por ejemplo, AAV), genomas vectoriales, partículas del virus recombinante, métodos y usos pueden usarse para administrar cualquier polinucleótido heterólogo (transgén) con un efecto biológico para tratar o

mejorar uno o más síntomas asociados con cualquier trastorno relacionado con la expresión génica insuficiente o indeseable. Pueden usarse secuencias de vectores lentivirus o parvovirus recombinantes (por ejemplo, AAV), plásmidos, genomas vectoriales, partículas de virus recombinantes, métodos y usos para proporcionar terapia para diversos estados de enfermedad.

Los ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, rAAV), genomas vectoriales y partículas de virus recombinantes, los métodos y usos de la invención permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. En general, los estados patológicos se dividen en dos clases: estados de deficiencia, generalmente de enzimas, que generalmente se heredan de forma recesiva y estados desequilibrados, que por lo menos a veces implican proteínas reguladoras o estructurales, que se heredan de manera dominante. Para las enfermedades del estado de deficiencia, la transferencia de genes podría usarse para llevar un gen normal a los tejidos afectados para una terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando mutaciones antisentido. Para estados de enfermedad desequilibrados, la transferencia de genes podría usarse para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que luego podría usarse en esfuerzos para contrarrestar el estado de la enfermedad. También es posible el uso de la integración específica del sitio de secuencias de ácido nucleico para corregir defectos.

Ejemplos ilustrativos de estados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a: trastornos de la coagulación sanguínea tales como hemofilia A, hemofilia B, talasemia y anemia.

De acuerdo con la invención, se proporcionan métodos y usos de tratamiento que incluyen ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, rAAV), genomas vectoriales y partículas de virus recombinantes de la invención. Los métodos y usos de la invención son ampliamente aplicables para proporcionar o aumentar o estimular la expresión o función del gen, por ejemplo, la adición o sustitución genética.

En una modalidad, un método o uso de la invención incluye: (a) proporcionar un ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, tal como en un vector o un genoma vectorial, en donde la secuencia de ácido nucleico modificada está operativamente enlazada a un elemento de control de la expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia; y (b) administrar una cantidad del ácido nucleico modificado al mamífero de modo que el Factor IX se exprese en el mamífero.

En otra modalidad, un método o uso de la invención incluye administrar o transferir un ácido nucleico modificado que codifica una secuencia de Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, en un mamífero o una célula de un mamífero, administrando una partícula viral (por ejemplo, AAV) o una pluralidad de partículas virales (por ejemplo, AAV) (por

ejemplo, variantes de la cápside (por ejemplo, 4-1)) que comprenden un genoma vectorial, comprendiendo el genoma vectorial el ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG (y opcionalmente un ITR, intrón, poliA, una secuencia de polinucleótidos de relleno / relleno) a un mamífero o una célula de un mamífero, entregando o transfiriendo así el ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX en el mamífero o célula del mamífero.

En aspectos particulares de los métodos y usos de la invención descritos en este documento, la expresión del ácido nucleico proporciona un beneficio terapéutico para el mamífero (por ejemplo, humano). En un aspecto más particular, la expresión de Factor IX proporciona un beneficio terapéutico para el mamífero (por ejemplo, humano), tal como un mamífero que tiene hemofilia B. En varios aspectos particulares adicionales, se incluye una secuencia de polinucleótidos de relleno / relleno en la secuencia del vector de modo que la longitud combinada con el ácido nucleico modificado que codifica el Factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, tiene una longitud total de entre aproximadamente 3.0 Kb – 5.5 Kb, o entre aproximadamente 4.0 Kb – 5.0 Kb, o entre aproximadamente 4.3Kb - 4.8kb.

Los métodos y usos de la invención incluyen métodos de tratamiento, que dan como resultado cualquier efecto terapéutico o beneficioso. En varios métodos y usos de la invención, se incluyen además la inhibición, disminución o reducción de uno o más síntomas, trastornos, enfermedades, enfermedades o complicaciones adversos (por ejemplo, físicos) causados por o asociados con

la enfermedad. Para un trastorno de la coagulación como la hemofilia, un efecto terapéutico o beneficioso incluye, pero no se limita a, hematomas reducidos, tiempo de coagulación reducido, episodios de hemorragia reducidos (duración, gravedad, frecuencia). Por ejemplo, reducción de la duración, gravedad o frecuencia de los episodios de hemorragia articular o cerebral (cerebral). Para un trastorno hemorrágico tal como hemofilia, un efecto terapéutico o beneficioso también incluye, pero no se limita a, una dosis reducida de una proteína de factor de coagulación suplementaria (por ejemplo, proteína de Factor IX) o la eliminación de la administración de una proteína de factor de coagulación suplementaria (por ejemplo Proteína Factor IX).

Un efecto terapéutico o beneficioso del tratamiento es, por lo tanto, cualquier mejora o beneficio medible o detectable objetivo o subjetivo proporcionado a un sujeto particular. Un efecto terapéutico o beneficioso puede pero no necesita ser una ablación completa de todos o cualquier síntoma adverso particular, trastorno, enfermedad o complicación de una enfermedad. De este modo, se logra un punto final clínico satisfactorio cuando hay una mejora gradual o una reducción parcial en un síntoma adverso, trastorno, enfermedad o complicación causada por o asociada con una enfermedad, o una inhibición, disminución, reducción, supresión, prevención, límite o control del empeoramiento o progresión de uno o más síntomas adversos, trastornos, enfermedades o complicaciones causadas por o asociadas con la enfermedad, en una duración corta o larga (horas, días, semanas, meses, etc.).

Las composiciones, tales como ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, rAAV), genomas vectoriales, y partículas de virus recombinantes que incluyen genomas vectoriales, y los métodos y usos de la invención, se pueden administrar en una cantidad suficiente o efectiva a un sujeto que la necesita. Una "cantidad efectiva" o "cantidad suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona, en dosis únicas o múltiples, solo o en combinación, con una o más de otras composiciones (agentes terapéuticos como un medicamento), tratamientos, protocolos o agentes de regímenes terapéuticos, una respuesta detectable de cualquier duración (largo o corto plazo), un resultado esperado o deseado o un beneficio para un sujeto de cualquier grado medible o detectable o durante cualquier período de tiempo (por ejemplo, por minutos, horas, días, meses, años o curado).

Un experto en la técnica puede determinar si la administración de una sola dosis de rAAV / vector es suficiente o si se debe administrar dosis múltiples de rAAV / vector. Por ejemplo, si los niveles de FIX disminuyen por debajo de un nivel predeterminado (por ejemplo, menor que el mínimo que proporciona un beneficio terapéutico), un experto en la técnica puede determinar si es apropiado administrar dosis adicionales de rAAV / vector.

La dosis para lograr un efecto terapéutico, por ejemplo, la dosis en genomas vectoriales / por kilogramo de peso corporal (vg/kg), variará basado en varios factores que incluyen, pero no se limitan a: la vía de administración, el nivel de expresión de polinucleótido heterólogo requerido para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad específica tratada, cualquier respuesta

inmune del huésped al vector viral, una respuesta inmune del huésped al polinucleótido heterólogo o producto de expresión (proteína), y la estabilidad de la proteína expresada. Un experto en la técnica puede determinar un rango de una dosis de rAAV / genoma vectorial para tratar a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno particular en base a los factores mencionados anteriormente, así como a otros factores. Generalmente, las dosis variarán de por lo 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 vectoriales por kilogramo (vg/kg) del peso del sujeto, para lograr un efecto terapéutico.

En algunas modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV, que incluye, por ejemplo, AAV-FIX39-Padua, o uno que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma de por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a eso, es suficiente cuando se administra a un sujeto, por ejemplo, un humano, con hemofilia B u otra deficiencia de la actividad del Factor IX, para convertir la hemofilia B grave a hemofilia B moderada o leve, o incluso a resultar en un estado aparentemente libre de enfermedad. En otras modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV es suficiente para permitir que un sujeto humano con hemofilia B renuncie por completo a la terapia de reemplazo de Factor IX, o reduzca la frecuencia con la que se administra el FIX de reemplazo para mantener una hemostasia adecuada. Como entienden los expertos en la técnica, la terapia de reemplazo de factor es el estándar de cuidado actual para la hemofilia B, pero requiere inyecciones frecuentes del Factor IX humano producido recombinantemente

para compensar la incapacidad del paciente para producir niveles suficientes del factor de coagulación funcional.

Se acepta generalmente que la hemofilia B se caracteriza por hemorragias frecuentes (por ejemplo, por lo menos una o dos veces por semana), a menudo de forma espontánea (sin traumatismo precedente), en los músculos o las articulaciones de un sujeto. Menos del 1% de la actividad de FIX encontrada en humanos sanos se asocia con hemofilia B severa. Se acepta generalmente que los sujetos humanos con hemofilia B moderada sangran con menos frecuencia que aquellos con hemofilia B severa, por ejemplo, aproximadamente una vez al mes, pero sangrarán durante un tiempo más prolongado de lo normal después de una cirugía, trauma o trabajo dental. En general, se acepta que los sujetos humanos con enfermedad moderada a menudo no sangran espontáneamente. Actividad de FIX 1% - 5% de lo normal se asocia con hemofilia B. En general, los sujetos humanos con hemofilia B leve sangran excesivamente, si es que lo hacen, solo como resultado de una cirugía o un trauma mayor. En general, la hemofilia leve se asocia con un 6% - 40% de la actividad FIX normal. Generalmente, las personas que se consideran sanas y que no presentan síntomas de hemofilia B tienen un rango de aproximadamente 50% a 150% de la actividad normal de FIX. Se puede encontrar información adicional en Fijnvandraat, et al., Diagnosis and management of hemophilia, Br. Medicina. J., 344: 36-40 (2012).

La actividad del factor IX puede medirse de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un ensayo ejemplar no limitante es

el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) de una etapa para determinar la actividad de coagulación de FIX en una muestra de plasma obtenida de un sujeto. La actividad de FIX se expresa con frecuencia en unidades internacionales (IU), donde 1 IU se define como la actividad de coagulación de FIX presente en 1 ml de plasma combinado de donantes normales. Usando esta convención, la hemofilia B severa se asocia con menos de 0.01 IU / ml de niveles de FIX, la enfermedad moderada está asociada con niveles de 0.02-0.05 IU / ml de FIX, la enfermedad leve está asociada con niveles de 0.06-0.40 IU / ml de FIX, y siendo una libre de enfermedad está asociado a niveles de 0.50-1.50 IU / ml FIX.

Como apreciará un experto en la técnica, una variante del Factor IX, tal como la variante FIX Padua de origen natural, que tiene una actividad catalítica más alta en comparación con el FIX humano de tipo natural, puede producir un nivel dado de actividad FIX (por ejemplo, 1 IU / ml) a una concentración más baja de proteína activa en comparación con FIX "no Padua".

En ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV, que incluye, por ejemplo, AAV-FIX39-Padua, o uno que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma de por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a eso, es aquella que suficiente cuando se administra a un sujeto, por ejemplo, un ser humano, con hemofilia B grave, moderada o leve, para lograr actividad de FIX en plasma que es aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%,

32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% o 50%, o más de la actividad FIX normal. En otras modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva es aquella que logra una actividad de FIX del 1% o mayor en un sujeto que de otra manera carece de tal actividad, por ejemplo, de 1.5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30% o más de la actividad de FIX en un sujeto.

Con respecto al tratamiento de un sujeto con hemofilia B, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV que incluye, por ejemplo, AAV-FIX39-Padua, o uno que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma de por lo menos 98% o 99% idéntica a la misma, puede ser por lo menos 1×10^{10} genomas vectoriales (vg) por kilogramo (vg/kg) del peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{10} a 1×10^{11} vg/kg del peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{11} a 1×10^{12} vg/kg (por ejemplo, aproximadamente 1×10^{11} a 2×10^{11} vg/kg o aproximadamente 2×10^{11} a 3×10^{11} vg/kg o aproximadamente 3×10^{11} a 4×10^{11} vg/kg o aproximadamente 4×10^{11} a 5×10^{11} vg/kg o aproximadamente 5×10^{11} a 6×10^{11} vg/kg o aproximadamente 6×10^{11} a 7×10^{11} vg/kg o aproximadamente 7×10^{11} a 8×10^{11} vg/kg o aproximadamente 8×10^{11} a 9×10^{11} vg/kg o aproximadamente 9×10^{11} a 1×10^{12} vg/kg) del peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{12} a 1×10^{13} vg/kg del peso del sujeto, a lograr un efecto terapéutico deseado. Las dosis adicionales pueden estar en un rango de aproximadamente 5×10^{10} a 1×10^{10} genomas vectoriales (vg) por kilogramo (vg/kg) del peso del sujeto, o en un rango de aproximadamente 1×10^{10} a 5×10^{11} vg/kg del peso del sujeto, o en un rango de aproximadamente 5×10^{11} a 1×10^{12} vg/kg del peso del sujeto, o en un rango de aproximadamente

1×10^{12} a 5×10^{13} vg/kg del peso del sujeto, para lograr un efecto terapéutico deseado. En otras modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV es aproximadamente 2.0×10^{11} vg/kg, 2.1×10^{11} vg/kg, 2.2×10^{11} vg/kg, 2.3×10^{11} vg/kg, 2.4×10^{11} vg/kg, 2.5×10^{11} vg/kg, 2.6×10^{11} vg/kg, 2.7×10^{11} vg/kg, 2.8×10^{11} vg/kg, 2.9×10^{11} vg/kg, 3.0×10^{11} vg/kg, 3.1×10^{11} vg/kg, 3.2×10^{11} vg/kg, 3.3×10^{11} vg/kg, 3.4×10^{11} vg/kg, 3.5×10^{11} vg/kg, 3.6×10^{11} vg/kg, 3.7×10^{11} vg/kg, 3.8×10^{11} vg/kg, 3.9×10^{11} vg/kg, 4.0×10^{11} vg/kg, 4.1×10^{11} vg/kg, 4.2×10^{11} vg/kg, 4.3×10^{11} vg/kg, 4.4×10^{11} vg/kg, 4.5×10^{11} vg/kg, 4.6×10^{11} vg/kg, 4.7×10^{11} vg/kg, 4.8×10^{11} vg/kg, 4.9×10^{11} vg/kg, 5.0×10^{11} vg/kg, 5.1×10^{11} vg/kg, 5.2×10^{11} vg/kg, 5.3×10^{11} vg/kg, 5.4×10^{11} vg/kg, 5.5×10^{11} vg/kg, 5.6×10^{11} vg/kg, 5.7×10^{11} vg/kg, 5.8×10^{11} vg/kg, 5.9×10^{11} vg/kg, 6.0×10^{11} vg/kg, 6.1×10^{11} vg/kg, 6.2×10^{11} vg/kg, 6.3×10^{11} vg/kg, 6.4×10^{11} vg/kg, 6.5×10^{11} vg/kg, 6.6×10^{11} vg/kg, 6.7×10^{11} vg/kg, 6.8×10^{11} vg/kg, 6.9×10^{11} vg/kg, 7.0×10^{11} vg/kg, 7.1×10^{11} vg/kg, 7.2×10^{11} vg/kg, 7.3×10^{11} vg/kg, 7.4×10^{11} vg/kg, 7.5×10^{11} vg/kg, 7.6×10^{11} vg/kg, 7.7×10^{11} vg/kg, 7.8×10^{11} vg/kg, 7.9×10^{11} vg/kg, o 8.0×10^{11} vg/kg, o alguna otra dosis. En cualquiera de estas modalidades, un vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos idéntica al 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la misma, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

Las dosis de una "cantidad efectiva" o "cantidad suficiente" para el tratamiento (por ejemplo, para mejorar o proporcionar un beneficio o mejora terapéutica) típicamente son eficaces para proporcionar una respuesta a uno, múltiples o todos los síntomas, consecuencias o complicaciones adversos de la enfermedad, uno o más síntomas, trastornos, enfermedades, patologías o complicaciones adversos, por ejemplo, causados por o asociados con la enfermedad, en una medida considerable, aunque disminuir, reducir, inhibir, suprimir, limitar o controlar la progresión o el empeoramiento de la enfermedad es un resultado satisfactorio.

Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente puede pero no necesita ser proporcionada en una sola administración, puede requerir múltiples administraciones y, puede pero no necesariamente, administrarse solo o en combinación con otra composición (por ejemplo, agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico. Por ejemplo, la cantidad puede aumentar 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 eficaz o 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 dosis, cantidades o duración adicionales por encima y más allá de tales dosis, o composiciones adicionales (por ejemplo, fármacos o agentes), tratamientos, protocolos o regímenes terapéuticos pueden incluirse para que se consideren efectivos o suficientes en un tema dado. Las cantidades consideradas efectivas también incluyen cantidades que

dan como resultado una reducción del uso de otro tratamiento, régimen terapéutico o protocolo, tal como administración de proteína de factor de coagulación recombinante para el tratamiento de un trastorno de coagulación (por ejemplo, hemofilia A o B).

No es necesario que una cantidad eficaz o una cantidad suficiente sea eficaz en todos y cada uno de los temas tratados, ni en la mayoría de los sujetos tratados en un grupo o población determinados. Una cantidad efectiva o una cantidad suficiente significa efectividad o suficiencia en un tema en particular, no un grupo o la población en general. Como es típico para tales métodos, algunos sujetos mostrarán una respuesta mayor, o tendrán menos o ninguna respuesta a un método o uso de tratamiento dado.

El término "mejorar" significa una mejora detectable o medible en una enfermedad del sujeto o síntoma de la misma, o una respuesta celular subyacente. Una mejoría detectable o mensurable incluye una disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación o control subjetivo u objetivo en la ocurrencia, frecuencia, gravedad, progresión o duración de la enfermedad, o complicación causada por 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 de tratamiento exitoso 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 o consecuencias subyacentes de la enfermedad en un sujeto. Por lo tanto, se consideran beneficiosos los métodos de tratamiento y los usos que afectan a una o más causas subyacentes de la enfermedad o los síntomas adversos. Una disminución o reducción del empeoramiento, como la estabilización de la enfermedad o un síntoma adverso de la misma, también es un resultado de tratamiento exitoso.

Por lo tanto, un beneficio o mejora terapéutica no necesita ser una ablación completa de la enfermedad, o cualquiera, la mayoría o todos los síntomas, complicaciones, consecuencias o causas subyacentes asociadas adversas con la enfermedad. De este modo, se logra un punto final satisfactorio cuando hay una mejora incremental en la enfermedad de un sujeto, o una disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación, control o prevención parcial en la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración, o inhibición o reversión de la enfermedad (por ejemplo, estabilización de uno o más síntomas o complicaciones) durante un período corto o largo (horas, días, semanas, meses, etc.). La efectividad de un método o uso, como un tratamiento que proporciona un beneficio terapéutico potencial o la mejora de una enfermedad, se puede determinar mediante diversos métodos, como el tiempo de formación de coágulos de sangre, etc.

De acuerdo con algunas modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV es suficiente cuando se administra a un sujeto humano con hemofilia B, para dar como resultado actividad de FIX por encima

de un cierto nivel durante un período de tiempo sostenido. En algunas de estas modalidades, una dosis eficaz de un vector de AAV da como resultado por lo menos un 1% de actividad de FIX normal en sujetos humanos con hemofilia B durante un período sostenido de por lo menos 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 1.5 años, 2 años, 2.5 años, 3 años, 3.5 años, 4 años, 4.5 años, 5 años, 5.5 años, 6 años, 6.5 años, 7 años, 7.5 años, 8 años, 8.5 años, 9 años, 9.5 años, 10 años o más. En otras modalidades, una dosis efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos un 5% de actividad de FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En otras modalidades, una dosis efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos un 10% de actividad de FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En otras modalidades, una dosis efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos 15% de actividad de FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En otras modalidades, una dosis efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos un 20% de actividad de FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En otras modalidades, una dosis

efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos un 25% de actividad de FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En otras modalidades, una dosis efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos 30% de actividad de FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En otras modalidades, una dosis efectiva de un vector AAV da como resultado por lo menos 35% de actividad FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En otras modalidades, una dosis efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos un 40% de actividad de FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En otras modalidades, una dosis efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos un 45% de actividad de FIX normal durante un período sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o por lo menos 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 años, o más. En cualquiera de estas modalidades, el vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la misma, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de

cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

De acuerdo con otras modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV es suficiente cuando se administra a un sujeto humano con hemofilia B grave o moderada, para dar como resultado una actividad de FIX que es por lo menos 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38% , 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, o 45%, de lo normal durante un período sostenido de por lo menos 6 meses. En algunas modalidades, la dosis de AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos idéntica al 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, es de aproximadamente 5.0×10^{11} vg/kg, que se puede administrar en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

Se puede observar que en algunos sujetos humanos que han recibido una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV, que incluye, por ejemplo, AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma de por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos a esto, que la actividad de FIX atribuible al vector disminuye durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, meses o años) a un nivel que ya no se considera suficiente (por ejemplo, el sujeto presenta síntomas y/o actividad de FIX característicos de la hemofilia B moderada o grave). En tales

circunstancias, el sujeto puede dosificarse nuevamente con el mismo tipo de vector AAV que en el tratamiento inicial. En otras modalidades, particularmente si el sujeto ha desarrollado una reacción inmune al vector inicial, el paciente puede dosificarse con un vector de AAV diseñado para expresar FIX en células diana, pero teniendo una cápside de un serotipo diferente o variante que es menos inmunorreactivo comparado al primer vector AAV.

De acuerdo con ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV es aquella que es suficiente, cuando se administra a un sujeto humano con hemofilia B, para reducir o incluso eliminar la necesidad del sujeto de terapia de reemplazo de Factor IX humano recombinante para mantener una adecuada hemostasia. Por lo tanto, en algunas modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV puede reducir la frecuencia con la que un sujeto humano promedio que tiene hemofilia B moderada o grave necesita terapia de reemplazo con FIX para mantener una hemostasia adecuada en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. En modalidades relacionadas, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV puede reducir la dosis del Factor IX humano recombinante que un sujeto humano promedio que tiene hemofilia B moderada o grave necesita mantener una hemostasia adecuada en aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. En cualquiera de estas modalidades, el vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos

95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la misma, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

En otras modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV es aquella que es suficiente, cuando se administra a un sujeto humano con hemofilia B grave, para reducir o incluso eliminar el sangrado espontáneo en las articulaciones. Por lo tanto, en algunas modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede reducir la frecuencia de hemorragia espontánea en las articulaciones de un sujeto humano con hemofilia B grave en aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%, en comparación con el promedio de sujeto humano sin tratamiento con hemofilia B severa. El sangrado en las articulaciones se puede detectar utilizando imágenes de resonancia magnética o ultrasonografía de las articulaciones u otras técnicas familiares para los expertos en la técnica. En cualquiera de estas modalidades, el vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la misma, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

Los esfuerzos previos para desarrollar vectores de AAV para tratar la hemofilia no han tenido éxito, por lo menos en parte, se cree, debido a una respuesta inmune robusta a la cápside de AAV en ensayos clínicos previos. (Ver, por ejemplo, Nathwani, et al., NEJM 2011; 365(25):2357-2365, y Manno, et al., Nat Med 2006; 12(3):342-347). Un ensayo clínico en curso ha demostrado que ciertas modalidades de vectores de AAV en este documento pueden producir un alto nivel de actividad de FIX en sujetos humanos con hemofilia B grave, mientras que dan como resultado una respuesta inmune nula o mínima, incluso tanto como 6 meses después de que se administraron los vectores de AAV (Ejemplo 5). De este modo, de acuerdo con ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV es aquella que cuando se administra a un sujeto con hemofilia B grave o moderada da como resultado una actividad FIX adecuada para mantener la hemostasia, mientras produce una respuesta inmune nula o mínima durante un período significativo de tiempo. En ciertas modalidades, la respuesta inmune puede ser una respuesta inmune innata, una respuesta inmune humoral, o una respuesta inmune celular, o incluso los tres tipos de respuesta inmune. En algunas modalidades, la respuesta inmune puede ser contra la cápside, el genoma vectorial y/o la proteína del Factor IX producida a partir de células transducidas.

De acuerdo con ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV da como resultado una actividad FIX adecuada para mantener la hemostasia en un sujeto con hemofilia B, mientras produce una

respuesta inmune humoral (es decir, anticuerpo) nula o mínima frente a la cápside, genoma y/o proteína del Factor IX producida a partir de células transducidas. La respuesta de anticuerpos a un virus, o partículas similares a virus tales como vectores de AAV, puede determinarse midiendo el título de anticuerpos en un suero o plasma de un sujeto usando técnicas familiares para los expertos en el campo de la inmunología. El título de anticuerpos a cualquier componente de un vector de AAV, tales como las proteínas de la cápside, o un producto genético codificado por el genoma vectorial y producida en las células transducidas, como el factor IX Padua (u otra variante del FIX), se puede medir usando tales técnicas. Los títulos de anticuerpos se expresan típicamente como una relación que indica la dilución antes de la cual la señal de anticuerpo ya no es detectable en el ensayo particular que se usa para detectar la presencia del anticuerpo. Se pueden usar diferentes factores de dilución, por ejemplo, 2 veces, 5 veces, 10 veces o algún otro factor de dilución. Puede usarse cualquier ensayo adecuado para la presencia de un anticuerpo, por ejemplo y sin limitación, ELISA, FACS o un ensayo de gen reportero, tal como se describe en el documento WO 2015/006743. El uso de otros ensayos también es posible de acuerdo con el conocimiento de los expertos en la técnica. Los títulos de anticuerpos se pueden medir en diferentes momentos después de la administración inicial de un vector de AAV.

En ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV da como resultado por lo menos 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% o más de la actividad de FIX en sujetos con hemofilia B, mientras produce un título de anticuerpos contra la cápside, el genoma y/o la

proteína del Factor IX (como FIX Padua) producido a partir de células transducidas que no es mayor de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 o más, cuando se determina a la 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o un período más largo después de que a los sujetos se les administró el vector de AAV. De acuerdo con una modalidad no limitante ejemplar, un vector de AAV da como resultado la actividad de FIX en por lo menos 20% en un sujeto con hemofilia B grave, mientras que la inducción de un título de anticuerpo contra la cápside y/o Factor IX producido por las células transducidas que no es mayor que 1:2, 1:3 o 1:4, ambos a los 6 meses después de administrar el vector de AAV. En cualquiera de estas modalidades, el vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la misma, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

Como se indicó anteriormente, ensayos previos usando terapia genética mediada por AAV para la hemofilia B desencadenaron una respuesta inmune autolimitada que evitó que la terapia fuera efectiva durante un período de tiempo significativo sin necesidad de dosis altas de esteroides para causar

inmunosupresión. Un factor importante parece haber sido una respuesta inmune celular que eliminó las células hepáticas que se habían transducido con los vectores de AAV en estudio. Este efecto fue detectable tanto a partir de una elevación de enzimas hepáticas, lo que sugiere daño hepático, y la presencia de células T específicas de cápside en los sujetos.

En ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV da como resultado una actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasia en un sujeto con hemofilia B, mientras produce una respuesta inmune celular mínima o nula contra la cápside y/o la proteína de Factor IX producida a partir de células transducidas. Una respuesta inmune celular se puede determinar por lo menos de dos maneras: analizando la actividad de las células T específicas para las proteínas de la cápside o el Factor IX, y probando la presencia de niveles elevados de enzimas hepáticas que indican daño a los hepatocitos.

En algunas modalidades, la respuesta inmune celular se determina ensayando la actividad de las células T específicas para las proteínas de la cápside y/o la proteína del Factor IX producida por las células hepáticas transducidas. En la técnica se conocen diferentes ensayos para la respuesta de células T. En una modalidad ejemplar no limitante, la respuesta de células T se determina recolectando células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) de un sujeto que se trató previamente con un vector de AAV para tratar la hemofilia B. Las células se incuban luego con péptidos derivados de la proteína de la cápside VP1 usada en el vector, y/o la proteína

del Factor IX, tal como FIX Padua, producida por las células hepáticas transducidas. Las células T que reconocen específicamente la proteína de la cápside o la proteína del Factor IX se estimularán para liberar citocinas, tales como interferón gamma u otra citocina, que luego pueden detectarse y cuantificarse usando el ensayo ELISPOT u otro ensayo familiar para los expertos en la técnica. (Ver, por ejemplo, Manno, et al., Nat Med 2006; 12(3): 342-347). La respuesta de las células T puede controlarse antes y en diferentes momentos después de que un sujeto haya recibido una dosis de un vector de AAV para tratar la hemofilia B, por ejemplo, un intervalo semanal, mensual o algún otro intervalo. De este modo, de acuerdo con ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV da como resultado una actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasia en un sujeto con hemofilia B (por ejemplo, actividad de FIX de por lo menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, o más), mientras causa una respuesta de células T medida usando ELISPOT que no es mayor que 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 o más unidades formadoras de manchas por 1 millón de PBMC analizadas cuando se administran semanalmente, mensualmente o en algún otro intervalo después de administrar el vector AAV o a las 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años o algún tiempo diferente después de administrar el vector AAV. En algunas de estas modalidades, el ensayo ELISPOT está diseñado para detectar la producción de interferón gamma (o alguna otra citocina) estimulada por péptidos de la proteína de la cápside del vector de AAV o la proteína del Factor IX (incluyendo FIX Padua, o una variante diferente) producida por células hepáticas transducidas. En cualquiera de estas modalidades, el vector de AAV

puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la misma, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

Como un representante para la respuesta inmune celular contra hepatocitos transducidos, la presencia de enzimas hepáticas mayores de lo normal se puede ensayar usando métodos estándar. Aunque no es deseable estar sujeto a la teoría, se cree que las células T específicas para ciertos vectores de AAV, tales como las utilizadas en ensayos clínicos previos, pueden atacar y matar a los hepatocitos transducidos, lo que libera transitoriamente enzimas hepáticas en la circulación. Las enzimas hepáticas ejemplares incluyen alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH), pero también se pueden controlar otras enzimas indicativas de daño hepático. Un nivel normal de estas enzimas en la circulación se define típicamente como un rango que tiene un nivel superior, por encima del cual el nivel de la enzima se considera elevado y, por lo tanto, indica un daño hepático. Un rango normal depende en parte de los estándares utilizados por el laboratorio clínico que realiza el ensayo. En ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV da como resultado una actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasia en un sujeto con hemofilia B (por ejemplo, actividad de FIX de por lo menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, o más), mientras causa un nivel elevado de enzima hepática

circulante, como ALT, AST o LDH, que no es mayor que 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1500%, 2000% del límite superior del valor normal (ULN) de sus respectivos rangos, en promedio, o en el nivel más alto medido en muestras múltiples extraídas del mismo sujeto bajo tratamiento en diferentes momentos (por ejemplo, a intervalos semanales o mensuales) después de la administración del vector AAV. En cualquiera de estas modalidades, el vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la misma, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

En ensayos clínicos previos que utilizaron vectores de AAV para tratar la hemofilia B, los investigadores necesitaron coadministrar un fármaco inmunosupresor, como un esteroide, para evitar que los sujetos que recibían tratamiento desarrollaran una respuesta inmune que eliminaría las células transducidas que producen la proteína del Factor IX. Debido a la respuesta inmune atenuada observada en sujetos que experimentan un tratamiento experimental con ciertos vectores de AAV, sin embargo, la coadministración de fármacos inmunosupresores puede no ser necesaria. Por tanto, en ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV es aquella que es suficiente para mantener la hemostasia adecuada en un sujeto con hemofilia B grave o moderada, sin necesidad de coadministración (antes,

contemporáneamente o después) de un fármaco inmunosupresor (como un esteroide u otro inmunosupresor). Debido a que una respuesta inmune no es predecible en todos los sujetos, sin embargo, los métodos de tratamiento de este documento para la hemofilia B incluyen vectores de AAV que se coadministran con un fármaco inmunosupresor. La coadministración de un fármaco inmunosupresor puede ocurrir antes, simultáneamente con o después de que los vectores de AAV se administren a un sujeto que tiene hemofilia B. En algunas modalidades, un fármaco inmunosupresor se administra a un sujeto durante un período de días, semanas o meses después de haberse administrado un vector de AAV para tratar la hemofilia B. Los fármacos inmunosupresores ejemplares incluyen esteroides (por ejemplo, sin limitación, prednisona o prednisolona) e inmunosupresores no esteroideos, tales como ciclosporina, rapamicina y otros. Qué dosis de fármaco y tiempo de tratamiento se requieren para efectuar suficiente inmunosupresión dependerán de factores únicos para cada sujeto sometido a tratamiento, pero la determinación de la dosis y el tiempo de tratamiento están dentro de la experiencia de los expertos en la materia. En algunas modalidades, puede ser necesario administrar un inmunosupresor más de una vez.

De acuerdo con ciertas modalidades, una dosis terapéuticamente efectiva de un vector de AAV da como resultado una elevación constante de la actividad de FIX cuando se administra a una población de sujetos humanos con hemofilia B grave o moderada. La consistencia se puede determinar calculando la variabilidad de la respuesta en una población de sujetos humanos usando métodos estadísticos tales como la desviación media y estándar (SD) u otra

técnica estadística familiar para los expertos en la técnica. En algunas modalidades, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV, cuando se administra a una población de sujetos humanos con resultados de hemofilia B grave o moderada, a los 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 21 meses, o 21 meses después de la administración, en una actividad media de FIX del 1-5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1; una actividad FIX media de 2.5-7.5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX de 5-10% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, una actividad media de FIX de 7.5-12.5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX del 10-15% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad FIX media de 12.5-17.5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX del 15-20% con un SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX de 17.5-22.5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1, una actividad media de FIX de 20-25% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad FIX media de 22.5-27.5% con una desviación estándar de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX del 25-30% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad FIX media de 27.5-32.5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX del 30-35% con un SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX de 32.5-37.5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12,

11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX del 35-40% con un SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX de 37.5-42.5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX del 40-45% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad media de FIX de 42.5-47.5% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; o una actividad media de FIX de 45-50% con una SD de menos de 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1. En cualquiera de estas modalidades, el vector AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia del genoma por lo menos idéntica al 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2: 1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7: 1, 8: 1, 9: 1, 10: 1, o alguna otra relación.

Los métodos y usos de la invención se pueden combinar con cualquier compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen terapéutico o protocolo que tenga una actividad o efecto terapéutico, beneficioso, aditivo, sinérgico o complementario deseado. Las composiciones de combinación ejemplares y los tratamientos incluyen segundos agentes activos, tales como, biológicos (proteínas), agentes y fármacos. Dichos productos biológicos (proteínas), agentes, fármacos, tratamientos y terapias se pueden administrar o realizar antes, sustancialmente al mismo tiempo o siguiendo cualquier otro método o uso de la invención, por ejemplo, un método terapéutico para tratar a un sujeto con una enfermedad de coagulación sanguínea.

El compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen terapéutico o protocolo se puede administrar como una composición de combinación, o administrar por separado, tal como administración simultánea o en serie o secuencialmente (antes o después) o administración de un ácido nucleico, vector, vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genoma vectorial o partícula de virus recombinante. Por lo tanto, la invención proporciona combinaciones en las que un método o uso de la invención está en combinación con cualquier compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso, remedio o composición, expuesto aquí o conocido por un experto en la técnica. El compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso, remedio o composición pueden administrarse o realizarse antes, sustancialmente al mismo tiempo o después de la administración de un ácido nucleico, vector, vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genoma vectorial, o partícula de virus recombinante de la invención, a un sujeto.

En ciertas modalidades, una composición de combinación incluye uno o más agentes inmunosupresores. En ciertas modalidades, un método incluye administrar o administrar uno o más agentes inmunosupresores al mamífero. En ciertas modalidades, una composición de combinación incluye partículas de AAV-FIX y uno o más agentes inmunosupresores. En ciertas modalidades, un método incluye administrar o administrar partículas de AAV-FIX a un mamífero y administrar un agente inmunosupresor al mamífero. El experto en la técnica puede determinar la necesidad o el tiempo apropiados de dicha composición de

combinación con uno o más agentes inmunosupresores y administrar el agente inmunosupresor al mamífero.

Los métodos y usos de la invención también incluyen, entre otras cosas, métodos y usos que dan como resultado una necesidad o uso reducido de otro compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso o remedio. Por ejemplo, para una enfermedad de coagulación sanguínea, un método o uso de la invención tiene un beneficio terapéutico si en un sujeto dado una dosis menos frecuente o reducida o eliminación de la administración de una proteína recombinante del factor de coagulación para suplementar el factor de coagulación endógena (anormal o mutante) deficiente o defectuoso en el sujeto. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se proporcionan métodos y usos para reducir la necesidad o el uso de otro tratamiento o terapia.

La invención es útil en animales que incluyen aplicaciones médicas humanas y veterinarias. Por lo tanto, los sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como humanos, así como mamíferos no humanos. El término "sujeto" se refiere a un animal, típicamente un mamífero, tal como los humanos, primates no humanos (simios, gibones, gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (aves de corral tales como pollos y patos, caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos) y animales de experimentación (ratón, rata, conejo, conejillo de Indias). Los sujetos humanos incluyen sujetos fetales, neonatales, infantiles, juveniles y adultos. Los sujetos incluyen modelos de enfermedades animales,

por ejemplo, modelos de ratón y otros modelos de animales de enfermedades de coagulación de la sangre y otros conocidos por los expertos en la materia.

Los sujetos apropiados para el tratamiento incluyen aquellos que tienen o están en riesgo de producir una cantidad insuficiente o que tienen una deficiencia en un producto genético funcional (proteína), o producen un producto genético (proteína) aberrante, parcialmente funcional o no funcional, que puede conducir a la enfermedad. Los sujetos apropiados para el tratamiento de acuerdo con la invención también incluyen aquellos que tienen o corren el riesgo de producir un producto genético (proteína) aberrante o defectuoso (mutante) que conduce a una enfermedad tal que las cantidades, expresión o función del producto genético (proteína) aberrante o defectuoso reducidas conduciría al tratamiento de la enfermedad, o reduciría uno o más síntomas o mejoraría la enfermedad. Por lo tanto, los sujetos diana incluyen sujetos que tienen una producción de factor de coagulación sanguínea aberrante, insuficiente o ausente, tal como hemofílicos (por ejemplo, hemofilia B).

Los sujetos apropiados para el tratamiento de acuerdo con la invención incluyen adicionalmente aquellos previamente o actualmente tratados con una proteína suplementaria (por ejemplo, factor de coagulación sanguínea recombinante tal como FIX para tratar la hemofilia). Los sujetos apropiados para el tratamiento de acuerdo con la invención incluyen además aquellos que no han desarrollado una respuesta inmune sustancial o detectable contra la

proteína FIX, o cantidades de anticuerpos inhibidores contra la proteína FIX que interferirían o bloquearían la terapia genética basada en FIX.

En otras modalidades, los sujetos pediátricos humanos que se determina que tienen hemofilia B (por ejemplo, mediante genotipado), pero que aún no han exhibido ninguno de los síntomas de la hemofilia B, pueden tratarse profilácticamente con un vector de AAV para evitar que tales síntomas se produzcan en primer lugar o, en otras modalidades, de ser tan grave como de otro modo habrían sido en ausencia de tratamiento. En algunas modalidades, los sujetos humanos tratados profilácticamente de esta manera tienen por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses de edad o más, cuando se les administra un vector de AAV para producir y mantener la actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasia, y así prevenir o reducir la gravedad de uno o más síntomas de la hemofilia B. En cualquiera de estas modalidades, el vector de AAV puede ser AAV-FIX39- Padua, o un vector de AAV que tiene la misma cápside y una secuencia de genoma que es idéntica al 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, que puede administrarse a un sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable sola, o con cápsides vacíos del mismo tipo de cápside con una relación de vacío a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

La administración o suministro *in vivo* a un sujeto se puede realizar antes del desarrollo de un síntoma, afección, complicación, etc. adversos causados por o asociados con la enfermedad. Por ejemplo, se puede usar una pantalla

(por ejemplo, genética) para identificar tales sujetos como candidatos para las composiciones, métodos y usos de la invención. Dichos sujetos, por lo tanto, incluyen los seleccionados positivos para una cantidad insuficiente o una deficiencia en un producto genético funcional (proteína), o que producen un producto genético (proteína) aberrante, parcialmente funcional o no funcional.

Los métodos y usos de la invención incluyen el suministro y administración sistémica, regional o local, o por cualquier ruta, por ejemplo, mediante inyección o infusión. Dicho suministro y administración incluyen de manera parenteral, por ejemplo, de manera intravascular, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o transmucosa. Las rutas de suministro y administración ejemplares incluyen intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intrarterial, subcutánea, intrapleural, intubación, intrapulmonar, intracavitaria, iontoforética, intraorganica, intralinfática.

Alternativamente o además, el vector de AAV puede administrarse al hígado a través de la vena porta. En otra alternativa, puede usarse un catéter introducido en la arteria femoral para administrar vectores de AAV al hígado a través de la arteria hepática. También se pueden emplear medios no quirúrgicos, como la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP), para administrar vectores de AAV directamente al hígado, evitando así el torrente sanguíneo y los anticuerpos neutralizantes de AAV. Otros sistemas ductales, como los conductos de la glándula submandibular, también se pueden usar como portales para administrar vectores de AAV en un sujeto que desarrolla o tiene anticuerpos anti-AAV preexistentes.

Las dosis pueden variar y depender de si 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 punto final clínico deseado, los tratamientos previos o simultáneos, la salud general, la edad, el género, la raza o la competencia inmunológica del sujeto y otros factores que serán apreciados por el experto en la materia. La cantidad, el número, la frecuencia o la duración de la dosis pueden aumentarse o reducirse proporcionalmente, según lo indiquen los efectos secundarios adversos, 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 dosificación y el tiempo requeridos para proporcionar una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico.

Los métodos y usos de la invención como se describe en la presente memoria pueden ponerse 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 objetivo para el tratamiento, tiene uno o más síntomas de la enfermedad, o ha sido cribado y se identifica como positivo 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 de la invención se pueden poner en práctica 1-7, 7-14, 14-21, 21-48 o más días, meses o años después de que un sujeto haya sido identificado como portador de la enfermedad para el tratamiento, tiene uno o más síntomas de la enfermedad, o ha sido examinado y se identifica como positivo como se establece en este documento.

Los ácidos nucleicos de la invención, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, rAAV), genomas vectoriales y partículas de virus recombinantes y otras composiciones, agentes, fármacos, biológicos (proteínas) pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas son útiles para, entre otras cosas, la administración y suministro a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

Según se usa en este documento, el término "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" significa una formulación biológicamente aceptable, gaseosa, líquida o sólida, o una mezcla de las mismas, que es adecuada para una o más vías de administración, suministro *in vivo* o contacto. Una composición "farmacéuticamente aceptable" o "fisiológicamente aceptable" es un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, por ejemplo, el material puede administrarse a un sujeto sin causar efectos biológicos indeseables sustanciales. Por lo tanto, dicha composición farmacéutica se puede usar, por ejemplo, en la administración de un vector viral o partícula viral a un sujeto.

Dichas composiciones incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), soluciones (acuosas o no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite en agua o agua en aceite), suspensiones, jarabes, elixires, medios de dispersión y suspensión, revestimientos, isotónicos y agentes de promoción o retardo de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica o contacto o suministro *in vivo*. Disolventes, soluciones y suspensiones acuosas y no

acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen comprimidos (recubiertos o no), cápsulas (duras o blandas), microperlas, polvo, gránulos y cristales. Compuestos activos suplementarios (por ejemplo, conservantes, agentes antibacterianos, antivirales y antifúngicos) también se pueden incorporar en las composiciones.

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

Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas y no acuosas del compuesto activo, preparaciones que típicamente son 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.

Cosolventes y adyuvantes se pueden agregar 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; alcoholes de polioxietileno y ésteres de ácidos grasos de

polioxietileno. Los adyuvantes incluyen, por ejemplo, tensioactivos tales como lecitina de soya y ácido oleico; ésteres de sorbitán tales como trioleato de sorbitán; y polivinilpirrolidona.

Las composiciones farmacéuticas y los sistemas de suministro apropiados para las composiciones, los métodos y usos de la invención son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20ª edición, 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), Technonic 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, NY, pp. 253-315).

Una "forma de dosificación unitaria" como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones 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 para producir un efecto deseado (por ejemplo, efecto profiláctico o terapéutico). Las formas de dosificación unitarias pueden estar dentro de, por ejemplo, ampollas y viales, que pueden incluir una composición líquida, o una composición en un estado liofilizado; un

vehículo líquido estéril, por ejemplo, se puede añadir antes de la administración o suministro *in vivo*. Las formas de dosificación unitarias individuales se pueden incluir en kits o envases de dosis múltiples. Las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genomas vectoriales, partículas de virus recombinantes y composiciones farmacéuticas de las mismas pueden envasarse en forma de dosificación unitaria o múltiple para facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

La invención proporciona kits con material de envasado y uno o más componentes en el mismo. Un kit incluye típicamente una etiqueta o inserción de paquete que incluye una descripción de los componentes o instrucciones para uso *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* de los componentes en el mismo. Un kit puede contener una colección de tales componentes, por ejemplo, un ácido nucleico, un vector recombinante, un virus (por ejemplo, AAV), un genoma vectorial o partícula de virus y opcionalmente un segundo activo, tal como otro compuesto, agente, fármaco o composición.

Un kit se refiere a una estructura física que contiene uno o más componentes del kit. El material de envasado puede mantener los componentes de manera estéril, y puede estar hecho de un material comúnmente usado para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, viales, tubos, etc.).

Las etiquetas o insertos pueden incluir información de identificación de uno o más componentes en el mismo, cantidades de dosis, farmacología

clínica de los ingredientes activos que incluyen un mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinámica. Las etiquetas o insertos pueden incluir información que identifica al fabricante, los números de lote, la ubicación y fecha de fabricación, las fechas de vencimiento. Las etiquetas o insertos pueden incluir información que identifica la información del fabricante, los números de lote, la ubicación y fecha del fabricante. Las etiquetas o insertos pueden incluir información sobre una enfermedad para la cual se puede usar un componente del kit. Las etiquetas o insertos pueden incluir instrucciones para el clínico o el sujeto para usar 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 dosificación, frecuencia o duración, e instrucciones para poner en práctica cualquiera de los métodos, usos, protocolos de tratamiento o regímenes profilácticos o terapéuticos descritos en este documento.

Las etiquetas o insertos pueden incluir información sobre cualquier beneficio que un componente pueda proporcionar, tal como un beneficio profiláctico o terapéutico. Las etiquetas o inserciones pueden incluir información sobre posibles efectos secundarios adversos, complicaciones o reacciones, como advertencias al sujeto o al clínico en relación con situaciones en las que no sería apropiado utilizar una composición particular. También pueden ocurrir efectos adversos o complicaciones cuando el sujeto ha tomado, tomará o está tomando actualmente uno o más medicamentos que pueden ser incompatibles con la composición, o el sujeto ha experimentado, experimentará o está experimentando actualmente, 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 insertos incluyen "material impreso", por ejemplo, papel o cartón, o separados o adheridos a un componente, un kit o material de embalaje (por ejemplo, una caja), o unidos a una ampolla, tubo o vial que contiene un componente del kit. Las etiquetas o inserciones también pueden incluir un medio legible por computadora, como una etiqueta impresa con código de barras, un disco, un disco óptico como 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 magnético / óptico, medios FLASH o tarjetas de tipo memoria.

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

Todas las solicitudes, publicaciones, patentes y otras referencias, citas de GenBank y citas de ATCC citadas en este documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la descripción, incluidas las definiciones, prevalecerá.

Todas las características descritas en este documento se pueden combinar en cualquier combinación. Cada característica divulgada en la especificación puede ser reemplazada por una característica alternativa que tenga el mismo propósito, equivalente o similar. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, las características divulgadas (por ejemplo, ácido nucleico modificado, vector, plásmido, una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genoma vectorial o partícula de virus recombinante) son un ejemplo de un género de características equivalentes o similares.

Según se usa en el presente documento, las formas singulares "un/una", "y" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un ácido nucleico" incluye una pluralidad de tales ácidos nucleicos, la referencia a "un vector" incluye una pluralidad de tales vectores, y la referencia a "un virus" o "partícula" incluye una pluralidad de tales viriones / partículas.

Según se usa en el presente documento, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen números enteros dentro de tales intervalos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de intervalos a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, para ilustrar, se hace referencia a 80% o más de identidad, incluye 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% etc., así como 81.1%, 81.2%, 81.3%, 81.4%, 81.5%, etc., 82.1%, 82.2%, 82.3%, 82.4%, 82.5%, etc., y así sucesivamente .

La referencia a un número entero con más (mayor) o menor que incluye cualquier número mayor o menor que el número de referencia, respectivamente. Así, por ejemplo, una referencia a menos de 100, incluye 99, 98, 97, etc. hasta el número uno (1); y menos de 10, incluye 9, 8, 7, etc. hasta el número uno (1).

Según se usa en el presente documento, todos los valores numéricos o intervalos incluyen fracciones de los valores y números enteros dentro de tales intervalos y fracciones de los números enteros dentro de dichos intervalos a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, para ilustrar, la referencia a un rango numérico, como 1-10 incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, así como 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 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., hasta e incluyendo 50, 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 intervalos que combinan los valores de los límites de diferentes rangos dentro de la serie. Por lo tanto, para ilustrar la referencia a una serie de rangos, por ejemplo, de 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1,000, 1,000-1,500, 1,500-2,000, 2,000-2,500, 2,500-3,000, 3,000-3,500, 3,500-4,000, 4,000-4,500, 4,500-5,000, 5,500-6,000, 6,000-7,000, 7,000-8,000 u 8,000-9,000, incluye rangos de 10-50, 50-100, 100-1,000, 1,000-3,000, 2,000-4,000, etc.

La invención se describe en general en el presente documento utilizando un lenguaje afirmativo para describir las numerosas modalidades y aspectos. La invención también incluye específicamente modalidades en las que se excluye un tema particular, en su totalidad o en parte, tal como sustancias o materiales, etapas y condiciones del método, protocolos o procedimientos. Por ejemplo, en ciertas modalidades o aspectos de la invención, los materiales y/o las etapas del método están excluidos. Por lo tanto, aunque la invención generalmente no se expresa en el presente documento en términos de lo que no incluye la invención, los aspectos que no se excluyen expresamente en la invención se divulgan no obstante aquí.

Se han descrito varias modalidades de la invención. Sin embargo, un experto en la técnica, sin apartarse del espíritu y alcance de la invención, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones.

Por consiguiente, los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, pero no limitar, el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Preparación / Diseño del Vector

Se diseñó un novedoso ácido nucleico de Factor IX que codifica una proteína de factor IX humano de alta actividad específica que tiene la variante de 338L Padua (Simioni P, et al., *N Engl J Med* 2009, 361:1671) ("FIX 39-Padua"; SEC ID NO: 10; Figura 10). FIX39-Padua está completamente

desprovisto de dinucleótidos CpG en la codificación FIX y las secuencias intrónicas. Para las pruebas comparativas, se preparó y modificó FIX19 (Mingozzi et al., *Sci. Transl Med.* 2013) para incluir el FIX Padua, para descartar posibles efectos de confusión resultantes del FIX Padua ("FIX 19-Padua"; SEQ ID NO. : 11; Figura 11).

Se sintetizó un plásmido ("pAAV-ApoE_hAAT-FIX39"; 11125 pb; SEC ID NO: 12; Figura 12A) e incluyó el casete de expresión FIX39-Padua y los elementos descritos en la Tabla 2. Un mapa de pAAV-ApoE_hAAT-FIX39 se muestra en la Figura 13.

Tabla 2.pAAV-ApoE hAAT-FIX39

5' AAV2 ITR	SEC ID NO:13
Potenciador (Región de Control Hepático)	SEC ID NO:14
Promotor hAAT	SEC ID NO:15
5' UTR	SEC ID NO:16
FIX39-Padua CDS	SEC ID NO:10 (Figure10)
Intrón A	SEC ID NO:17 (Figure 14)
3' UTR	SEC ID NO:18
poliA	SEC ID NO:19
3' AAV2 ITR	SEC ID NO:20
Rellenador Lambda	SEC ID NO:21
Origen de replicación F1	SEC ID NO:22
Resistencia a la kanamicina	SEC ID NO:23
Origen de replicación pUC	SEC ID NO:24

La secuencia de la secuencia codificadora FIX39-Padua y el intrón A se expone en la SEC ID NO: 25 (Figura 15). También se sintetizó un plásmido que incluía el CDS FIX19-Padua y los mismos elementos reguladores, las mismas repeticiones de terminal invertido adenoasociadas (ITRs), y el mismo promotor ApoE/hAAT hepático específico como pAAV-ApoE_hAAT-FIX39.

Se preparó un vector AAV que tiene la variante de la cápside 4-1 (SEC ID NO: 4) para los transgenes FIX39-Padua ("AAV-FIX39-Padua") y FIX19-Padua ("AAV-FIX19-Padua") usando un proceso de transfección triple seguido de centrifugación con gradiente doble de cloruro de cesio (Ayuso E, Met. al., Gene Ther 2010, 17: 503). Los vectores se titularon mediante PCR cuantitativa usando un plásmido linealizado como estándar. Para el estudio descrito en el Ejemplo 3, el vector se diluyó en PBS, 5% de sorbitol, 0.001% de F68 hasta un volumen final de 200 µl por ratón, para la inyección a la vena de la cola.

Ejemplo 2. Transducción *in vitro* de AAV variante 4-1

Los hepatocitos primarios de macaco cynomolgus y origen humano se transdujeron con la cápside variante 4-1 (SEC ID NO: 4) que expresa luciferasa a cuatro diferentes multiplicidades de infección (MOI) que varían de 500 a 62,500 genomas de vector por célula. Setenta y dos horas después de la transducción, se analizó la expresión de la luciferasa. Como se muestra en la Figura 16, la proporción de hepatocitos humanos transducidos en relación con los hepatocitos de primates no humanos varió de 0.8 a 1.5, dependiendo de la MOI utilizada. Estos datos generados *in vitro* parecen ser consistentes con observaciones previas *in vivo* cuando se compara la expresión del factor IX de coagulación en macacos cynomolgus y sujetos humanos.

Ejemplo 3. Estudio de potencia

Se realizó un estudio para evaluar la potencia de AAV-FIX39-Padua frente a AAV-FIX19-Padua en ratones. Se inyectaron grupos de 5 ratones a las 8-10 semanas de edad con 1×10^{11} o 1×10^{12} vg/kg de AAV-FIX39-Padua y AAV-FIX19-Padua. Después de la administración del vector, la sangre se recogió por sangrado retroorbital usando tubos capilares heparinizados; el plasma se aisló mediante centrifugación a 9000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se almacenó congelado a -80°C hasta su ensayo.

Se usó el plasma recogido para evaluar la expresión del transgén hFIX. Se midieron los niveles de FIX humano en plasma usando un kit de ELISA (Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Canadá).

Se midieron los niveles de actividad de FIX humano mediante ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT). El ensayo de aPTT se realizó mezclando plasma de muestra en una relación de volumen 1:1:1 con plasma humano con deficiencia de FIX (George King Biomedical, Inc) y reactivo aPTT (Trinity Biotech), seguido de un período de incubación de 180s a 37°C. La coagulación se inició mediante la adición de cloruro de calcio 25 mM. El tiempo para la formación de coágulos se midió usando un instrumento de coagulación STart 4 (Diagnostica Stago). Se generó una curva estándar con plasma normal agrupado de George King comenzando en una dilución 1:5 en TBS pH 7.4 (48 µl + 192 µl) seguido de diluciones seriales 1:2 (120 µl + 120 µl). La curva estándar humana se usó para calcular la actividad de cada muestra en la semana 17 después de la administración del vector; la actividad en dos ratones no tratados también se midió. Se promedió la actividad de FIX en

ratones no tratados y luego se restó de las muestras tratadas para calcular la actividad extra (es decir, humana) debido a la proteína FIX Padua.

Como se muestra en la Figura 17, parece que AAV-FIX39-Padua y AAV-FIX19-Padua expresan niveles sustancialmente equivalentes de FIX.

Diecisiete semanas después de la administración del vector, se midió la actividad de FIX humana en aquellos ratones tratados con una dosis de vector de 1×10^{12} vg/kg. La relación actividad-antígeno varió entre 5.2 y 7.5, con un valor promedio de 6.4 para ambos grupos FIX19-Padua y FIX39-Padua (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de actividad de FIX humano

ID del Animal	Antígeno (% de normal)	Actividad (% de normal)	Relación
01 – FIX19	53.9	352.7	6.5
02 – FIX19	95.6	631.8	6.6
03 – FIX19	120.6	882.3	7.3
04 – FIX19	132.9	797.1	6.0
05 – FIX19	105.2	599.7	5.7
06 – FIX39	163.1	1092.8	6.7
07 – FIX39	108.2	670.3	6.2
08 – FIX39	121.1	781.2	6.4
09 – FIX39	152.3	1147.8	7.5
10 – FIX39	134.1	702.1	5.2

	Promedio		
	Antígeno (% de normal)	Actividad (% de normal)	Relación
AAV-FIX19- Padua	101.7	652.7	6.4
AAV-FIX39- Padua	135.8	878.8	6.4

Si bien estos resultados sugieren que la potencia de ambos casetes de expresión es sustancialmente similar, los dos constructos también se analizaron en la configuración de la inyección hidrodinámica de plásmido en la vena de la cola. La razón fundamental para evaluar los niveles de FIX derivados de la administración *in vivo* de ADN desnudo fue comparar ambos casetes de expresión sin la posible interferencia de las diferencias en la titulación del AAV, la fabricación del vector, etc.

Según se muestra en la Figura 18, ambos casetes de expresión desnuda fueron igualmente potentes para dirigir la expresión de FIX, confirmando los datos obtenidos en la configuración de AAV. Estos resultados indican que los casetes de expresión FIX19-Padua y FIX39-Padua tienen una potencia similar.

Ejemplo 4. Terapia genética de AAV-FIX39-Padua

Se está llevando a cabo un estudio clínico para determinar la seguridad y la cinética de una sola infusión IV de AAV-FIX39-Padua. La variante de la cápside AAV 4-1 utilizada ha demostrado en estudios preclínicos tener buena seguridad y eficacia, la capacidad de alcanzar niveles sostenidos de actividad

de FIX de ~ 35% en NHP a 1×10^{12} vg/kg después de 3 meses de infusión del vector; y los anticuerpos neutralizantes que reaccionan de manera cruzada (Ab) a la variante de la cápside AAV 4-1 son aproximadamente un 10% menos prevalentes que AAV8. El diseño del estudio se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño del Estudio Clínico de AAV-FIX39-Padua

Seguridad y Tolerabilidad de AAVFIX39-Padua	Clínicamente significativo en los signos vitales, los valores de laboratorio y las evaluaciones clínicas (incluido el número de hemorragias y la CdV) desde el inicio
Cinética de AAVFIX39-Padua	Niveles de actividad de transgén FIX y los niveles de antígeno en el pico y
Estado-estable	
Dosificación	Las cohortes de dosis inicial, media y alta incluirán 2-5 personas cada una
Diseño	Escalada de dosis abierta, no aleatorizada
Países participantes	Estados Unidos y potencialmente Europa, Japón y Canadá
Tamaño de la muestra	Hasta 15 sujetos
Elegibilidad	Edades elegibles para el estudio: 18 años y mayor
	Géneros elegibles para el estudio: Masculino
	Acepta Voluntarios Saludables: No
Criterios de Inclusión	Capaz de proporcionar un consentimiento informado y cumplir con los requisitos del estudio
	Hombres ≥ 18 y.o. con diagnóstico confirmado de hemofilia B (≤ 2 UI / dL o $\leq 2\%$ de factor IX endógeno)
	Recibió ≥ 50 días de exposición a productos de factor IX

	Un mínimo de un promedio de 4 eventos hemorrágicos por año que requieren tratamiento episódico de infusiones de factor IX o infusiones de factor IX profiláctico
	No hay inhibidor de factor IX medible evaluado por el laboratorio central y no tiene antecedentes de inhibidores de la proteína del factor IX
	Aceptar usar anticonceptivos de barrera confiables hasta que 3 muestras consecutivas son negativas para secuencias de vectores
Criterios de Exclusión	Evidencia de hepatitis B o C activa
	Actualmente en terapia antiviral para la hepatitis B o C
	Tener una enfermedad hepática subyacente significativa
	Tener evidencia serológica * de VIH-1 o VIH-2 con recuentos de CD4 ≤ 200 / mm ³ (* sujetos que son VIH + y estables con recuento de CD4 > 200 / mm ³ y carga viral indetectable son elegibles para inscribirse)
	Tener anticuerpos detectables reactivos con la variante 4-1 de la cápside de AAV (SEC ID NO: 4)
	Participó en un ensayo de transferencia de genes en las últimas 52 semanas o un medicamento en investigación en las últimas 12 semanas
	Incapaz o no dispuesto a cumplir con las evaluaciones del estudio
Screening Visit	Evaluación de elegibilidad
	El título NAb de AAV es la falla principal de la pantalla (se recomienda encarecidamente

	referir sujetos al protocolo de título NAb de AAV de CHOP para la detección de telómeros)
Visita Día 0	Recuperación incremental de productos FIX luego infusión de vectores
Visitas de seguimiento (~17 visitas)	Evaluaciones de seguridad y cinética
Visita de Fin de Estudio (en la semana 52)	Evaluación final de seguridad

Ejemplo 5. Resultados clínicos

A cuatro sujetos con hemofilia B se les administró una única infusión IV de vector AAV-FIX39-Padua. Los dos primeros sujetos, de edades comprendidas entre 23 y 18 años, respectivamente, no tenían antecedentes de enfermedad hepática, mientras que el tercero, de 47 años, tenía antecedentes de infección por el VHC pero había desaparecido espontáneamente. Los cuatro sujetos habían sido evaluados para neutralizar anticuerpos contra la nueva cápside de AAV y se descubrió que eran negativos.

A los sujetos se infundieron por vía intravenosa con 5×10^{11} vg/kg de vector AAV-FIX39-Padua durante un período de ~ 1 hora. El vector total AAV-FIX39-Padua administrado a cada sujeto se muestra en las Figuras 20-23, que se había combinado con la cantidad indicada de cápsides vacías de AAV.

Las Figuras 19-23 muestran los resultados del estudio, con el vector AAV-FIX39-Padua administrado en el día 0. Los resultados muestran una mayor producción de Factor IX en los cuatro sujetos, reflejada por una mayor actividad de FIX a lo largo del período de evaluación del estudio.

El aumento inicial en la actividad de FIX desde el día 0 hasta aproximadamente el día 3 se debe a la administración de 100 IU/kg de AlprolixTM o BeneFIXTM, que son proteínas de fusión FIX-Fc recombinante que tienen una vida media aproximada de aproximadamente 82 horas. La actividad del factor IX atribuible al vector AAV-FIX39 Padua comienza alrededor del día 6-8 después de la infusión del vector AAV.

Como se resume en la Figura 19 y se muestra para cada sujeto individual en las Figuras 20, 21A, 22A y 23A, la actividad del Factor IX aumentó gradualmente y pareció estable durante los períodos de evaluación de 183, 102, 69 y 50 días para los cuatro sujetos. Estos datos indican que una sola infusión de 5×10^{11} vg/kg de vector AAV-FIX39-Padua da como resultado una producción y actividad de Factor IX suficiente y sostenida para proporcionar a los pacientes con hemofilia B una actividad coagulante significativa y beneficiosa para proporcionar hemostasia.

Como se muestra en las Figuras 19, 20A, 21A, 22A y 23A, los niveles de actividad del Factor IX estaban en 28%, 41%, 26% y 33% de la normal, para los sujetos 1-4 respectivamente, en 183, 102, 69 y 50 días después de la infusión. El sujeto # 3 se trató con un producto de vida media prolongada para una posible hemorragia de tobillo 2 días después de la infusión del vector; aparte de esto, no ha habido infusiones de factores ni hemorragias durante el período de evaluación.

Los agentes inmunosupresores (esteroides) no se han administrado a ninguno de los sujetos. Además, en general no ha habido elevaciones sostenidas de transaminasas por encima del límite superior de la normalidad, lo que indica que no hay efectos adversos del tratamiento (Figuras 20B, 21B, 22B y 23).

Se usaron ELISPOT para controlar las respuestas de células T a AAV y a FIX en los cuatro sujetos y han mostrado respuestas nulas o muy bajas. Es de destacar que el curso del tiempo de aumento en los niveles de Factor IX a un nivel de meseta ha sido notablemente consistente hasta la fecha (Figura 19). Fluctuaciones moderadas en los niveles de antígeno conducen a mayores cambios en los niveles de actividad, dado el aumento de 8 veces en la actividad específica de la variante de Factor IX Padua.

Los datos publicados (Nathwani et al., N Engl J Med. 371(21):1994-2004 (2014)) han demostrado la expresión a largo plazo del Factor IX en hombres con hemofilia B infundida con un vector de AAV8 que expresa el tipo Factor IX. Sin embargo, los niveles de expresión fueron bajos, del 1.4% -2.2% normal en la dosis más baja (2×10^{11} genomas vectoriales [vg]/kg de peso corporal) a 2.9-7.2% en la dosis más alta (2×10^{12} vg/kg). Además, 4/6 sujetos infundidos a la dosis más alta requirieron un ciclo de inmunosupresores (prednisona) para reducir el aumento de las transaminasas asociadas con la dosis más alta (pero no se observó a dosis más bajas de 2×10^{11} o 6×10^{11} vg/kg). Los datos de un estudio de historia natural de pacientes con hemofilia sugieren que se requieren niveles circulantes de ~ 12% de FIX para reducir el número anual de

hemorragias articulares espontáneas a cero (den Uijl et al., Hemofilia 17(1):41-4 (2011)).

Estos son los primeros resultados clínicos que usan una nueva cápside de AAV biodiseñada que expresa un transgén de Factor IX de alta actividad específica. Los niveles de actividad del Factor IX observados en los sujetos 1-4 28%, 41%, 26% y 33% de lo normal son niveles de Factor IX circulante sustancialmente mayores que los observados en estudios previos, basados en datos publicados, y exceden los niveles del Factor IX circulante necesarios para reducir el número anual de hemorragias articulares espontáneas a cero.

Además, los niveles sustanciales de actividad del Factor IX observados en este estudio se lograron sin uso de Factor IX recombinante desde la infusión de vector, y sin usar agentes inmunosupresores (esteroides). Estos resultados muestran el desarrollo de un vector de AAV-FIX que puede dirigir la expresión del factor de coagulación de alto nivel a dosis bajas de administración del vector de AAV, por lo que no se requiere inmunosupresión, un objetivo importante para la terapia genética dirigida al hígado. Los niveles de actividad del Factor IX observados en este estudio se han mantenido durante la duración del período de estudio.

Ejemplo 6. Inmunogenicidad reducida del vector de AAV-FIX39-Padua

Para el estudio actual de Fase I/II, se monitorizaron cuatro sujetos que recibían 5e11 vg/kg de AAV-FIX39-Padua para respuestas inmunes

potenciales contra el vector AAV usando un Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISPOT por sus siglas en inglés) de interferón-gamma validado (IFN-g). Las PBMCs purificadas aisladas a partir de extracciones de sangre semanales se analizaron mediante ensayo ELISPOT de interferón gamma. Seis grupos de péptidos de la cápside de AAV que contienen 24-25 péptidos cada uno se incubaron con 2×10^5 células por triplicado. Las respuestas de células T se detectaron usando un anticuerpo biotinilado contra IFN-g, seguido de desarrollo colorimétrico y se reportó como unidades de formación de manchas (SFU) por millón de células. El grupo de mayor respuesta en cada punto de tiempo se muestra como SFU / millón de células. El límite de positividad utilizado históricamente es > 50 SFU y control de medios triple (línea azul). Los sujetos 840-003-001, 840-001-002, 840-001-004 y 840-001-005 (que se muestran en negro) se han seguido hasta las semanas 26, 14, 11 y 8, respectivamente. Los resultados de ELISPOT de un ensayo previo en el que dos sujetos, CP-16 y PT17 recibieron 1×10^{12} vg/kg del vector de AAV8-FIX19 y un sujeto recibió 2×10^{12} vg/kg de AAV8-FIX19, se muestran en rojo.

Utilizando el valor históricamente aceptado de > 50 SFU y 3 veces el control de fondo (medios) como criterio para la respuesta positiva de células T, ha habido muy poca o ninguna respuesta en los tres sujetos hasta las 26 semanas posteriores infusión (Figura 24A). Esto está en marcado contraste con un estudio no publicado previamente por nuestro grupo usando un vector codificado AAV8 optimizado para entregar el casete transgénico FIX a 3 sujetos, en los que se observaron respuestas robustas de células T IFN-g tan pronto como el punto temporal de la semana 2 (Figura 24B). Otros estudios

previamente publicados que usan AAV-2 (Manno et al., 2006 Nat Med) y vectores autocomplementarios AAV-8 (Nathwani et al., 2011 NEJM) también han mostrado evidencia de respuestas tempranas de células T a la cápside de AAV-8. Es importante destacar que no se han observado respuestas contra el producto transgénico en este ensayo.

Se formula la hipótesis de que la activación de una respuesta inmune mediada por células T frente a hepatocitos transducidos que presentan epítomos de células T de cápside de AAV puede jugar un papel en sujetos que muestran una pérdida de expresión transgénica de corta duración y eventual. Por lo tanto, el perfil de inmunogenicidad reducido del vector AAV-FIX39-Padua representa una mejora prometedora hacia la eficacia global.