

TERAPIA GÉNICA PARA TRATAR HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

1. INTRODUCCIÓN

La invención se refiere a una terapia génica para tratar la hipercolesterolemia familiar (FH) y, en particular, la FH homocigótica (HoFH).

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA DE MATERIAL PRESENTADO EN FORMA ELECTRÓNICA

El solicitante incorpora de esta manera como referencia el material del listado de secuencias presentado en forma electrónica con el mismo. Este archivo es marcado como "UPN-16-7717PCT_ST25.txt".

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hipercolesterolemia familiar (FH) es un trastorno que pone en riesgo la vida causado por mutaciones en genes que afectan la función del receptor de LDL (LDLR) (Goldstein *et al.*, Familial hypercholesterolemia, en The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, C. R. Scriver, *et al.*, editores. 2001, McGraw-Hill Information Services Company: New York. p. 2863-2913 (2001)). Se estima que >90% de los pacientes con FH molecularmente confirmada poseen mutaciones en el gen que codifica para el LDLR (LDLR, MIM 606945). El resto de los pacientes poseen mutaciones en tres genes adicionales: APOB (MIM 107730) que codifica para la apolipoproteína (apo) B, PCSK9 (MIM 607786) que codifica para la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) y LDLRAP1 (MIM 695747) que codifica para la proteína adaptadora 1 del LDLR. La última es la única mutación génica que está asociada con un rasgo recesivo. La homocigosis es usualmente conferida por la presencia de mutaciones en los 2 alelos del mismo gen; sin embargo, se han reportado casos de pacientes con doble heterocigosis (dos mutaciones heterocigóticas, una de cada una en dos genes diferentes). Con base en las tasas de frecuencia de entre 1 en 500 y 1 en 200 para la FH heterocigótica (Nordestgaard *et al.*, Eur Heart J, 2013. 34 (45): p. 3478-90a (2013), Sjouke *et al.*, Eur Heart J, (2014)), se estima que entre 7,000 y 43,000 personas en todo el mundo tienen FH homocigótica (HoFH).

La caracterización de alelos mutantes del LDLR ha revelado una variedad de mutaciones que incluyen delecciones, inserciones, mutaciones de sentido erróneo y mutaciones sin sentido (Goldstein *et al.*, 2001). Se han reportado más de

1700 mutaciones del LDLR. Esta heterogeneidad genotípica lleva a consecuencias variables en la función bioquímica del receptor que se clasifican en cuatro grupos generales. Las mutaciones de clase 1 están asociadas con ninguna proteína detectable, y con frecuencia son causadas por deleciones de genes. Las mutaciones de clase 2 llevan a anormalidades en el procesamiento intracelular de la proteína. Las mutaciones de clase 3 afectan específicamente la unión del ligando de la LDL, y las mutaciones de clase 4 codifican para proteínas receptoras que no se agrupan en depresiones revestidas. Con base en la actividad residual del LDLR evaluada usando fibroblastos cultivados de pacientes, las mutaciones se clasifican también como negativas para el receptor (<2% de actividad residual del LDLR) o defectuosas para el receptor (2-25% de actividad residual). Los pacientes que son defectuosos para el receptor tienen, en promedio, menores niveles de LDL-C y un curso cardiovascular menos maligno.

Como consecuencia de la función deteriorada del receptor de la LDL, los niveles de colesterol total en plasma sin tratar en los pacientes con HoFH son típicamente mayores de 500 mg/dl, lo que resulta en aterosclerosis prematura y agresiva que lleva con frecuencia a enfermedad cardiovascular (CVD) antes de los 20 años y muerte antes de los 30 años (Cuchel *et al.*, Eur Heart J, 2014. 35 (32): p 2146-2157 (2014), Goldstein *et al.* 2001). El inicio temprano del tratamiento agresivo para estos pacientes es por lo tanto esencial (Kolansky *et al.* 2008). Las opciones disponibles son limitadas. Las estatinas son consideradas como la primera línea para el tratamiento farmacológico. Incluso a dosis máximas, sólo se observa una reducción de 10-25% en los niveles de la LDL-C en plasma en la mayoría de los pacientes (Marais *et al.* Atherosclerosis, 2008. 197 (1): p. 400-6 (2008); Raal *et al.* Atherosclerosis, 2000. 150 (2): p. 421-8 (2000)). La adición del inhibidor de la absorción de colesterol, ezetimiba, a la terapia con estatinas, podría resultar en una reducción adicional de 10-20% en los niveles de la LDL-C (Gagne *et al.* Circulation, 2002. 105 (21): p. 2469-2475 (2002)). El uso de otras medicaciones para reducir el colesterol, incluyendo secuestrantes de ácidos biliares, niacina, fibratos y probucol se ha usado con éxito en la era pre-estatina, y puede ser considerado para lograr una mayor reducción de la LDL-C en la HoFH; sin embargo, su uso es limitado por la tolerabilidad y la disponibilidad de fármacos. Se ha mostrado que este procedimiento reduce la CVD y la mortalidad por todas las causas (Raal *et al.* Circulation, 2011. 124 (20): p. 2202-7). A pesar de la implementación de un procedimiento de terapia agresivo de fármacos múltiples, los niveles de la LDL-C de los pacientes con HoFH siguen siendo elevados y su esperanza de vida media sigue siendo de aproximadamente 32 años (Raal *et al.* 2011). Varias opciones no farmacológicas se han puesto a prueba también a lo largo de los años.

Las intervenciones quirúrgicas, tales como el bypass portocavo (Bilheimer Arteriosclerosis, 1989. 9 (suppl. 1): p. 1158-1163 (1989); Forman *et al.* Atherosclerosis, 1982. 41 (2-3): p. 349-361 (1982)) y la derivación ileal (Deckelbaum *et al.* N. Engl. J. Med. 1977; 296: 465-470 1977. 296 (9): p. 465-470 (1977)), han dado como resultado sólo disminución parcial y transitoria de la LDL-C, y son ahora consideradas como procedimientos no viables. Se ha demostrado que el trasplante de hígado ortotópico reduce sustancialmente los niveles de la LDL-C en los pacientes con HoFH (Ibrahim *et al.* J Cardiovasc Transl Res, 2012. 5 (3): p. 351-8 (2012); Kucukkartallar *et al.* Pediatr Transplant, 2011. 15 (3): p. 281-4 (2011)), pero desventajas y riesgos limitan el uso de este procedimiento, incluyendo el alto riesgo de complicaciones quirúrgicas post-trasplante y mortalidad, la escasez de donadores, y la necesidad de tratamiento de por vida con terapia inmunosupresora (Malatack Pediatr Transplant, 2011. 15 (2): p. 123-5 (2011); Starzl *et al.* Lancet, 1984. 1 (8391): p. 1382-1383 (1984)). El estándar actual de cuidado en la HoFH incluye aféresis de lipoproteínas, un método físico de purgar el plasma de la LDL-C que puede reducir transitoriamente la LDL-C en más de 50% (Thompson Atherosclerosis, 2003. 167 (1): p. 1-13 (2003); Vella *et al.* Mayo Clin Proc, 2001. 76 (10): p. 1039-1046 (2001)). La re-acumulación rápida de la LDL-C en el plasma después de las sesiones de tratamiento (Eder y Rader Today's Therapeutic Trends, 1996. 14: p. 165-179 (1996)) hace necesaria la aféresis semanal o quincenal. Aunque este procedimiento puede retrasar la aparición de la aterosclerosis (Thompson *et al.* Lancet, 1995. 345: p. 811-816; Vella *et al.* Mayo Clin Proc, 2001. 76 (10): p. 1039-1046 (2001)), es laborioso, costoso, y no está fácilmente disponible. Además, aunque es un procedimiento que es generalmente bien tolerado, el hecho de que requiere repetición frecuente y acceso intravenoso puede ser un reto para muchos pacientes con HoFH.

Recientemente, tres nuevos fármacos han sido apostados a prueba por la FDA como tratamiento complementario específicamente para la HoFH. Dos de ellos, la lomitapida y el mipomersen, inhiben el ensamble y la secreción de lipoproteínas que contienen apoB, aunque lo hacen a través de mecanismos moleculares diferentes (Cuchel *et al.* N Engl J Med, 2007. 356 (2): p. 148-156 (2007); Raal *et al.* Lancet, 2010. 375 (9719): p. 998-1006 (2010)). Este procedimiento da como resultado una reducción significativa de la LDL-C que alcanza un promedio de aproximadamente 50% con lomitapida (Cuchel *et al.* 2013) y aproximadamente 25% con mipomersen (Rall *et al.* 2010). Sin embargo, su uso está asociado con una serie de eventos adversos que puedan afectar la tolerancia y la adherencia a largo plazo y que incluyen la acumulación de grasa en el hígado, cuyas consecuencias a largo plazo aún no han sido aclaradas completamente.

El tercero es parte de una clase novedosa de fármacos que disminuyen los niveles de lípidos, los anticuerpos monoclonales contra la proproteína convertasa subtilisina/kexina 9 (PCSK9) que se ha mostrado son efectivos en la reducción de los niveles de la LDL-C con un perfil de seguridad aparentemente favorable en los pacientes con FH heterocigótica (Raaijmakers *et al.* *Circulation*, 2012. 126 (20): p. 2408-17 (2012), Raaijmakers *et al.* *The Lancet*, 2015. 385 (9965): p. 341-350 (2015); Stein *et al.* *Circulation*, 2013. 128 (19): p. 2113-20 (2012)). Se ha mostrado que el tratamiento de la HoFH con el inhibidor de la PCSK9 evolocumab, 420 mg cada 4 semanas por 12 semanas, provee una reducción de aproximadamente 30% en la LDL-C en comparación con el placebo (Raaijmakers *et al.* 2015). La eficacia de los inhibidores de la PCSK9, sin embargo, depende de la actividad residual del LDLR, sin efecto alguno en los pacientes sin actividad residual del LDLR (Raaijmakers *et al.* 2015, Stein *et al.* *Circulation*, 2013. 128 (19): p. 2113-20 (2012)). Aunque la adición de inhibidores de la PCSK9 puede llegar a ser el estándar de cuidado para la FH y puede proveer una mayor reducción adicional para reducir la hipercolesterolemia en un sub-grupo de pacientes con HoFH, no afectará dramáticamente el manejo clínico de esta condición.

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad médica insatisfecha por nuevas terapias médicas para la HoFH.

3. BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere al uso de un virus adeno-asociado (AAV) de replicación deficiente para suministrar un gen del receptor de lipoproteína de baja densidad humano (hLDLR) a las células hepáticas de pacientes (sujetos humanos) diagnosticados con HoFH. El vector de AAV recombinante (rAAV) usado para suministrar el gen del LDLR ("rAAV.hLDLR") debe tener un tropismo por el hígado (por ejemplo, un rAAV que posea una cápside de AAV8), y el transgen del hLDLR debe ser controlado por elementos de control de la expresión específica del hígado. Dichos vectores de rAAV.hLDLR pueden administrarse por infusión intravenosa (IV) durante un período de 20 a 30 minutos hasta alcanzar niveles terapéuticos de expresión del LDLR en el hígado. Las dosis terapéuticamente efectivas del rAAV.hLDLR varían de 2.5×10^{12} a 7.5×10^{12} copias del genoma (GC)/kg de peso corporal del paciente. En una modalidad preferida, la suspensión de rAAV tiene una potencia tal que una dosis de 5×10^{11} GC/kg administrada a un modelo de ratón LDLR^{-/-}-Apobec^{-/-} con doble expresión bloqueada de HoFH (ratón DKO) disminuye los niveles de colesterol de la referencia inicial en el ratón DKO en 25% a 75%.

El objetivo del tratamiento es reemplazar funcionalmente el LDLR defectuoso del paciente a través de la terapia génica dirigida al hígado basada en el rAAV como un procedimiento viable para el tratamiento de esta enfermedad, y mejorar la respuesta a los tratamientos actuales de reducción de lípidos. La invención se basa, en parte, en el desarrollo de composiciones y métodos terapéuticos que permitan el suministro seguro de dosis eficaces; y métodos de fabricación mejorados para cumplir con el requisito de producción de purificación para la dosificación eficaz en sujetos humanos.

La eficacia de la terapia puede evaluarse después del tratamiento, por ejemplo, después de la dosificación, usando los niveles de la LDL-C en plasma como un biomarcador sustituto para la expresión del transgen del LDLR humano en el paciente. Por ejemplo, una disminución en los niveles de la LDL-C en plasma del paciente después del tratamiento con la terapia génica indicaría la transducción exitosa de LDLR funcionales. Adicionalmente, o en forma alternativa, otros parámetros que pueden ser monitoreados incluyen, pero no están limitados a, la medición de los cambios en el colesterol total (TC), lipoproteína no de alta densidad colesterol (no-HDL-C), HDL-C, triglicéridos en ayuno (TG), lipoproteína de muy baja densidad colesterol (VLDL-C), lipoproteína(a) (Lp(a)), apolipoproteína B (apoB), y apolipoproteína AI (apoA-I) en comparación con la referencia inicial, así como estudios de cinética de la LDL (evaluación del mecanismo metabólico) antes de la administración del vector y después de la administración del vector, o combinaciones de los mismos.

Los pacientes que son candidatos para el tratamiento son de preferencia adultos (hombre o mujer ≥ 18 años de edad) con diagnóstico de HoFH que poseen dos mutaciones en el gen *LDLR*; es decir, pacientes que tienen mutaciones del LDLR molecularmente definidas en ambos alelos en el contexto de una presentación clínica consistente con HoFH, que puede incluir niveles no tratados de LDL-C, por ejemplo, niveles de LDL-C > 300 mg/dl, niveles tratados de LDL-C, por ejemplo, niveles de LDL-C < 300 mg/dl y/o niveles de colesterol total en plasma mayores de 500 mg/dl y aterosclerosis prematura y agresiva. Los candidatos para el tratamiento incluyen pacientes con HoFH que están sufriendo tratamiento con fármacos que disminuyen los niveles de lípidos, tales como estatinas, ezetimiba, sequestrantes de ácidos biliares, inhibidores de la PCSK9 y aféresis del plasma y/o LDL.

Antes del tratamiento, el paciente con HoFH debe ser evaluado para anticuerpos neutralizantes (NAb) para el serotipo de AAV usado para suministrar el gen del hLDLR. Dichos NAb pueden interferir con la eficiencia de la transducción y reducir la eficacia terapéutica. Los pacientes con HoFH que tienen un título de NAb

en suero en la referencia inicial $\leq 1:5$ son buenos candidatos para el tratamiento con el protocolo de terapia génica de rAAV.hLDLR. El tratamiento de los pacientes con HoFH con títulos de NAb en suero $> 1:5$ puede requerir una terapia de combinación, tal como un co-tratamiento transitorio con un inmunosupresor antes y/o durante el tratamiento con el suministro del vector del rAAV.hLDLR. Adicionalmente, o en forma alternativa, los pacientes son monitoreados para enzimas hepáticas elevadas, que pueden ser tratadas con terapia inmunosupresora transitoria (por ejemplo, si se observan por lo menos aproximadamente 2 veces los niveles de aspartato transaminasa (AST) o alanina transaminasa (ALT)) en la referencia inicial. Los inmunosupresores para dicha co-terapia incluyen, pero no están limitados a, esteroides, antimetabolitos, inhibidores de células T y agentes alquilantes.

La invención se ilustra por medio de ejemplos que describen un protocolo para el tratamiento del AAV8.LDLR de sujetos humanos (sección 6, ejemplo 1); datos pre-clínicos en animales que demuestran la eficacia del tratamiento en modelos animales de la enfermedad (sección 7, ejemplo 2); la fabricación y formulación de composiciones terapéuticas del AAV.hLDLR (secciones 8.1 a 8.3, ejemplo 3); y métodos para la caracterización del vector de AAV (sección 8.4, ejemplo 3).

3.1. Definiciones

Como se usa en la presente, el término "cápside de AAV8" se refiere a la cápside de AAV8 que tiene la secuencia de aminoácidos codificada del acceso del GenBank: YP_077180, la cual se incorpora en la presente como referencia, y se reproduce en SEQ ID NO: 5. Alguna variación de esta secuencia codificada es abarcada por la presente invención, que puede incluir secuencias que tienen aproximadamente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de referencia en el acceso del GenBank: YP_077180; patentes de los Estados Unidos 7,282,199; 7,790,449; 8,319,480; 8,962,330; 8,962,332 (es decir, menos de aproximadamente 1% de variación de la secuencia de referencia). En otra modalidad, la cápside de AAV8 puede tener la secuencia de VP1 de la variante de AAV8 descrita en el documento WO2014/124282, el cual se incorpora en la presente como referencia. Se han descrito métodos de generación de la cápside, secuencias de codificación para la misma, y métodos para la producción de vectores virales de rAAV. Véase, por ejemplo, Gao, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003), y los documentos US 2013/0045186A1 y WO 2014/124282.

Como se usa en la presente, el término "título de NAb" se refiere a una medición de la cantidad de anticuerpos neutralizantes (por ejemplo, NAb anti-AAV) que se producen que neutralizan el efecto fisiológico de su epítipo objetivo (por ejemplo, un AAV). Los títulos de NAb anti-AAV pueden medirse como se describe,

por ejemplo, en Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. 199(3): p. 381-390, cita que se incorpora en la presente como referencia.

Los términos "por ciento (%)" de identidad", "identidad de secuencia", "por ciento de identidad de secuencia" o "por ciento idéntica" en el contexto de secuencias de aminoácidos, se refieren a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para determinar la correspondencia. El por ciento de identidad puede determinarse fácilmente para las secuencias de aminoácidos sobre la longitud completa de una proteína o polipéptido, de aproximadamente 32 aminoácidos, aproximadamente 330 aminoácidos, o un fragmento peptídico de las mismas o los secuenciadores de codificación de secuencias de ácidos nucleicos correspondientes. Un fragmento de aminoácidos adecuado puede ser de por lo menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, y puede ser de hasta aproximadamente 700 aminoácidos. Generalmente, cuando se hace referencia a la "identidad", "homología" o "similitud" entre dos secuencias diferentes, la "identidad", "homología" o "similitud" se determina en relación con las secuencias "alineadas". Las secuencias "alineadas" o "alineaciones" se refieren a múltiples secuencias de ácidos nucleicos o proteínas (aminoácidos), que contienen con frecuencia correcciones para aminoácidos o bases adicionales o faltantes en comparación con una secuencia de referencia. Las alineaciones se realizaron usando cualquiera de una variedad de programas de alineación de secuencias múltiples públicamente o comercialmente disponibles. Están disponibles programas de alineación de secuencias para las secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" y "Match-Box". En general, cualquiera de estos programas se usa en los valores predeterminados, aunque el experto en la técnica puede alterar estos valores, según sea necesario. En forma alternativa, el experto en la técnica puede usar otro algoritmo o programa de ordenador que provea por lo menos el nivel de identidad o alineación como el provisto por los algoritmos y programas de referencia. Véase, por ejemplo, J. D. Thomson *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13): 2682-2690 (1999).

Como se usa en la presente, el término "enlazado operablemente" se refiere a las secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés, y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés.

Un "virus de replicación defectuosa" o "vector viral" se refiere a una partícula viral sintética o artificial en la cual un cassette de expresión que contiene un gen de interés es empacado en una cápside o envoltura viral, en donde cualquier

secuencia genómica viral empacada también dentro de la cápside o envoltura viral es de replicación deficiente; es decir, no puede generar viriones de la progenie, pero retiene la capacidad para infectar a las células objetivo. En una modalidad, el genoma del vector viral no incluye genes que codifican para las enzimas requeridas para la replicación (el genoma puede ser diseñado para estar "sin entrañas" - conteniendo sólo el transgen de interés flanqueado por las señales necesarias para la amplificación y el empacado del genoma artificial), pero estos genes pueden ser suministrados durante la producción. Por lo tanto, se considera seguro para su uso en la terapia génica, ya que no puede ocurrir la replicación y la infección por los viriones de la progenie, salvo en presencia de la enzima viral requerida para la replicación.

Se observará que los términos "un" o "una" se refieren a uno o más. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "por lo menos uno" se usan indistintamente en la presente.

Los términos "comprende", "comprenden" y "que comprende" se interpretarán inclusivamente más que exclusivamente. Los términos "consiste", "que consiste", y sus variantes, se interpretarán inclusivamente más que exclusivamente. Mientras que varias modalidades en la especificación se presentan usando el lenguaje "que comprende", bajo otras circunstancias, se pretende también que una modalidad relacionada sea interpretada y descrita usando el lenguaje "que consiste de" o "que consiste esencialmente de".

Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" significa una variabilidad de 10% de la referencia dada, a menos que se especifique de otra manera.

A menos que se defina de otra manera en esta especificación, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como es entendido comúnmente por los expertos en la técnica y como referencia a los textos publicados, los cuales le proveen al experto en la técnica con una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A-1H. Impacto del NAb preexistente de AAV8 sobre los niveles de expresión del EGFP en hígados de macacos. Macacos de diferentes tipos y edades fueron inyectados a través de una vena periférica con 3×10^{12} GC/kg de AAV8.TBG.EGFP, y fueron sacrificados 7 días después y analizados para la transducción de hepatocitos de varias maneras. Las figuras 1A-1E son micrografías que muestran secciones representativas de hígado de animales con varios niveles

de anticuerpos neutralizantes pre-existentes para AAV8 (< 1:5, 1:5, 1:10 y 1:20, respectivamente). La figura 1F muestra un análisis morfométrico cuantitativo de la eficiencia de transducción con base en el por ciento de transducción de hepatocitos. La figura 1G muestra el análisis morfométrico cuantitativo de la eficiencia de transducción con base en la intensidad relativa del EGFP. La figura 1H muestra la cuantificación de la proteína EGFP en el lisado de hígado por ELISA. Macacos cynomolgus adultos (n = 8, círculos oscuros), macacos rhesus adultos (n = 8, triángulos claros), macacos rhesus juveniles (n = 5, cuadrados claros).

Figura 2. Expresión a largo plazo del mLDLR en ratones DKO. Ratones DKO fueron dosificados con 10^{11} GC/ratón (5×10^{12} GC/kg) de AAV8.TBG.mLDLR (n = 10) o AAV8.TBG.nLacZ (n = 10). Los niveles de colesterol en suero fueron monitoreados sobre una base regular. Las diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos se realizaron tan tempranamente como el día 7 ($p < 0.001$), y se han mantenido a lo largo de la duración del experimento. Los ratones fueron sacrificados en el día 180 después de la administración del vector.

Figuras 3A-3F. Regresión de la aterosclerosis en ratones DKO después de AAV8.TBG.mLDLR. La figura 3A es una serie de tres paneles con la tinción con Sudán IV *en face*. Las aortas de los ratones fueron aseguradas y teñidas con Sudán IV, el cual tiñe los lípidos neutros. Se muestran las aortas representativas de los animales tratados con 10^{11} GC/ratón de AAV8.nLacZ (5×10^{12} GC/kg) (centro), 10^{11} GC/ratón de AAV8.TBG.mLDLR (5×10^{12} GC/kg) (derecha) en el día 60 después de la administración del vector (día 120 bajo una dieta alta en grasa) o en la referencia inicial (día 60 bajo una dieta alta en grasa) (izquierda). La figura 3B es una gráfica de barras que muestra los resultados de los análisis morfométricos cuantificados del por ciento de la aorta teñida con rojo oleoso O a lo largo de toda la longitud de la aorta. Las figuras 3C-3K muestran las raíces aórticas de estos ratones que fueron teñidas con rojo oleoso O. La figura 3L es una gráfica de barras que muestra el por ciento de tinción con Sudán IV de la superficie aórtica total en la referencia inicial (n = 10), AAV.TBG.nLacZ (n = 9) y AAV8.TBG.mLDLR (n = 10). La cuantificación se llevó a cabo en las lesiones teñidas con rojo oleoso O. Los datos del área de la lesión aterosclerótica fueron sometidos a un ANOVA unidireccional. Los grupos experimentales se compararon con el grupo de la referencia inicial usando la prueba de Dunnett. Se usó ANOVA de medidas repetidas para comparar los niveles de colesterol entre los diferentes grupos de ratones con el tiempo después de la transferencia génica. La significancia estadística para todas las comparaciones se asignó a p, 0.05. Las gráficas representan los valores medios de SD (desviación estándar). *p < 0.05, **p < 0.01, ‡p < 0.001.

Figura 4. Niveles de colesterol en ratones DKO inyectados con artículo de prueba o control. Los ratones DKO fueron inyectados IV con 7.5×10^{11} GC/kg, 7.5×10^{12} GC/kg o 6.0×10^{13} GC/kg de AAV8.TBG.mLDLR o 6.0×10^{13} GC/kg de AAV8.TBG.hLDLR o control de vehículo (100 μ l de PBS). Los niveles de colesterol se expresaron como la media $\pm$ SEM. Cada grupo demostró una reducción estadísticamente significativa en el colesterol en suero respecto a los controles de PBS del mismo punto de tiempo de la necropsia.

Figuras 5A-5B. Niveles de colesterol en ratones DKO inyectados con artículo de prueba. La figura 5A muestra los niveles de colesterol (mg/mL) en ratones tratados con dosis variables de vector, medidos en el día 0, día 7 y día 30. Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM. $p < 0.05$.

Figuras 6A-6C. Respuestas de células T periféricas en macacos rhesus inyectados con vector. Los datos presentados muestran el curso de tiempo de la respuesta de las células T y los niveles de AST para macacos 19498 (figura 6A), 090-0287 (figura 6B) y 090-0263 (figura 6C). Para cada día de estudio, las respuestas de las células T a la no estimulación, AAV8 y hLDLR medidas como unidades formadoras de manchas (SFU) por millón de PBMC se graficaron de izquierda a derecha en cada figura. Los macacos 19498 y 090-0287 desarrollaron una respuesta positiva de las células T periféricas a y/o el transgen del hLDLR, mientras que los ratones 090-0263 no lo hicieron. * denota las respuestas positivas de la cápside que estuvieron significativamente por encima del fondo.

Figura 7. Representación esquemática del vector AAV8.TBG.hLDLR.

Figuras 8A-8B. Construcciones de plásmidos cis de AAV. A) Representación lineal del plásmido de clonación cis paterno, pENN.AAV.TBG.PI, que contiene el promotor de TBG específico del hígado y el intrón quimérico flanqueado por los elementos de ITR de AAV2. B) Representación lineal del plásmido cis del LDLR humano, pENN.AAV.TBG.PI.hLDLR.RBG.KanR, en el cual el ADNc del LDLR humano fue clonado en pENN.AAV.TBG.PI entre el intrón y la señal de poli A, y el gen de resistencia a ampicilina fue reemplazado por el gen de resistencia a kanamicina.

Figuras 9A-9B. Plásmidos trans de AAV. La figura 9A es una representación lineal del plásmido de empacado trans de AAV8, p5E18-VD2/8, con el gen de resistencia a ampicilina. La figura 9B es una representación lineal del plásmido de empacado trans de AAV8, pAAV2/8 con el gen de resistencia a kanamicina.

Figuras 10A-10B. Plásmido auxiliar de adenovirus. La figura 10A ilustra la derivación del plásmido auxiliar, pAd Δ F6, del plásmido precursor, pBHG10, a

través de los intermediarios pAd Δ F1 y pAd Δ F5. La figura 10B es una representación lineal del gen de resistencia a ampicilina en pAd Δ F6 que fue reemplazado por el gen de resistencia a kanamicina para crear pAd Δ F6(Kan).

Figuras 11A-11B. Diagrama de flujo que muestra el procedimiento de fabricación del vector AAV8.TBG.hLDLR.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Un rAAV de replicación deficiente se usa para suministrar un gen del hLDLR a las células hepáticas de los pacientes (sujetos humanos) con diagnóstico de HoFH. El vector rAAV.hLDLR debe tener un tropismo por el hígado (por ejemplo, un rAAV que posea una cápside de AAV8), y el transgen del hLDLR debe ser controlado por elementos de control de la expresión específicos del hígado.

Dichos vectores rAAV.hLDLR pueden ser administrados por infusión intravenosa (IV) durante aproximadamente un período de 20 a aproximadamente 30 minutos para lograr los niveles terapéuticos de expresión del LDLR en el hígado. En otras modalidades, pueden seleccionarse períodos más cortos (por ejemplo, 10 a 20 minutos) o más largos (por ejemplo, tiempos de intervención de más de 30 minutos a 60 minutos, por ejemplo, aproximadamente 45 minutos, o más). Las dosis terapéuticamente efectivas del rAAV.hLDLR varían de por lo menos aproximadamente 2.5×10^{12} a 7.5×10^{12} copias del genoma (GC)/kg de peso corporal del paciente. En una modalidad preferida, la suspensión de rAAV tiene una potencia tal que una dosis de 5×10^{11} GC/kg administrada a un modelo de ratón LDLR^{-/-}-Apobec^{-/-} con doble expresión bloqueada de HoFH (ratón DKO) disminuye los niveles de colesterol de la referencia inicial en el ratón DKO en 25% a 75%. La eficacia del tratamiento puede evaluarse usando los niveles de lipoproteína de baja densidad colesterol (LDL-C) como un sustituto para la expresión del transgen. Las evaluaciones de eficacia primarias incluyen los niveles de LDL-C en 1 a 3 meses (por ejemplo, la semana 12) después del tratamiento, con persistencia del efecto seguida después por cuando menos aproximadamente 1 año (aproximadamente 52 semanas). La seguridad a largo plazo y la persistencia de la expresión del transgen pueden medirse después del tratamiento.

Los pacientes que son candidatos para el tratamiento son de preferencia adultos (hombres o mujeres ≥ 18 años de edad) con diagnóstico de HoFH que posean dos mutaciones en el gen *LDLR*; es decir, los pacientes que tengan mutaciones del LDLR molecularmente definidas en ambos alelos en el contexto de una presentación clínica consistente con HoFH, que pueden incluir

niveles no tratados de LDL-C, por ejemplo, niveles de LDL-C >300 mg/dl, niveles de LDL-C tratados, por ejemplo, niveles de LDL-C <300 mg/dl y/o niveles de colesterol total en plasma mayores de 500 mg/dl y aterosclerosis prematura y agresiva. Los candidatos para tratamiento incluyen a los pacientes con HoFH que estén sufriendo tratamiento con fármacos que disminuyen los niveles de lípidos, tales como estatinas, ezetimiba, secuestrantes de ácidos biliares, inhibidores de la PCSK9, y aféresis del plasma y/o LDL.

Antes del tratamiento, el paciente con HoFH debe ser evaluado para los anticuerpos neutralizantes (NAb) para el serotipo de AAV usado para suministrar el gen del hLDLR. Dichos NAb pueden interferir con la eficiencia de la transducción y reducir la eficacia terapéutica. Los pacientes con HoFH que tienen un título de NAb en suero de la referencia inicial $\leq 1:5$ son buenos candidatos para el tratamiento con el protocolo de terapia génica de rAAV.hLDLR. El tratamiento de los pacientes con HoFH con títulos de NAb en suero $>1:5$ pueden requerir una terapia de combinación, tal como co-tratamiento transitorio con un inmunosupresor antes/durante el tratamiento con rAAV.hLDLR. Adicionalmente, o en forma alternativa, los pacientes son monitoreados para las enzimas hepáticas elevadas, que pueden tratarse con terapia inmunosupresora transitoria (por ejemplo, si se observan niveles de la referencia inicial de por lo menos aproximadamente 2x de aspartato transaminasa (AST) o alanina transaminasa (ALT)).

5.1 Vectores de terapia génica

El vector de rAAV.hLDLR debe tener un tropismo por el hígado (por ejemplo, un rAAV que posea una cápside de AAV8), y el transgen del hLDLR debe ser controlado por elementos de control de la expresión específicos del hígado. El vector se formula en un regulador de pH/vehículo adecuado para la infusión en sujetos humanos. El regulador de pH/vehículo debe incluir un componente que impida que el rAAV se adhiera a la tubería de infusión, pero que no interfiera con la actividad de unión del rAAV *in vivo*.

5.1.1. El vector de rAAV.hLDLR

Puede usarse cualquiera de un número de vectores de rAAV con tropismo por el hígado. Ejemplos de AAV que pueden seleccionarse como fuentes para las cápsides del rAAV incluyen, por ejemplo, rh10, AAVrh64R1, AAVrh64R2, rh8 [véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos No. 2007-0036760-A1; la solicitud de patente publicada de los Estados Unidos No. 2009-0197338-A1; y el documento EP 1310571]. Véase también el documento WO 2003/042397 (AAV7 y otro AAV de simio), la patente de los Estados Unidos 7790449

y la patente de los Estados Unidos 7282199 (AAV8), los documentos WO 2005/033321 y US 7906111 (AAV9), los documentos WO2006/110689 y WO 2003/042397 (rh10), AAV3B; y el documento US 2010/0047174 (AAV-DJ).

El transgen del hLDLR puede incluir, pero no está limitado a, una o más de las secuencias provistas por SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4, las cuales se proveen en el listado de secuencias anexo, el cual se incorpora en la presente como referencia. Con referencia a SEQ ID NO: 1, estas secuencias incluyen una secuencia de señal localizada a aproximadamente el par de bases 188 a aproximadamente el par de bases 250, y la proteína madura para la variante 1 abarca aproximadamente el par de bases 251 a aproximadamente el par de bases 2770. SEQ ID NO: 1 identifica también exones, por lo menos uno de los cuales está ausente en las variantes de empalme alternativas conocidas del hLDLR. Adicionalmente, u opcionalmente, puede seleccionarse una secuencia que codifica para una o más de las otras isoformas del hLDLR. Véase, por ejemplo, las isoformas 2, 3, 4, 5 y 6, cuyas secuencias están disponibles, por ejemplo, de <http://www.uniprot.org/uniprot/P01130>. Por ejemplo, las variantes comunes carecen del exón 4 (pb (255)..(377)) o el exón 12 (pb (1546)..(1773)) de SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, el transgen puede incluir las secuencias de codificación para la proteína madura con una secuencia de señal heteróloga. SEQ ID NO: 2 provee el ADNc para el LDLR humano y la proteína traducida (SEQ ID NO: 3). SEQ ID NO: 4 provee un ADNc diseñado para el LDLR humano. Alternativamente o adicionalmente, pueden usarse programas de ordenador basados en la Web o disponibles comercialmente, así como compañías basadas en el servicio para traducir de nuevo las secuencias de aminoácidos a secuencias de codificación de ácidos nucleicos, incluyendo ARN y/o ADNc. Véase, por ejemplo, backtranseq by EMBOSS, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>; Gene Infinity (http://www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html); y ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/>).

En una modalidad específica descrita en los ejemplos, más adelante, el vector de terapia génica es un vector de AAV8 que expresa un transgen del hLDLR bajo el control de un promotor específico del hígado (globulina de unión a tiroxina, TBG) referido como rAAV8.TBG.hLDLR (véase la figura 6). El componente del vector de AAV externo es un serotipo 8, T = 1 cápside icosaédrica que consiste de 60 copias de tres proteínas virales de AAV, VP1, VP2 y VP3, a una relación de 1:1:18. La cápside contiene un genoma de vector de rAAV de ADN de cadena sencilla.

El genoma del rAAV8.TBG.hLDLR contiene un transgen del hLDLR flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. El transgen del hLDLR incluye un intensificador, promotor, intrón, una secuencia de codificación del

hLDLR y una señal de poliadenilación (poli A). Las ITR son los elementos genéticos responsables de la replicación y el empaquetado del genoma durante la producción del vector, y son los únicos elementos cis virales requeridos para generar rAAV. La expresión de la secuencia de codificación del hLDLR es dirigida desde el promotor de TBG específico de hepatocitos. Dos copias del elemento intensificador de alfa 1 microglobulina/bikunina preceden al promotor de TBG para estimular la actividad del promotor. Un intrón quimérico está presente para mejorar adicionalmente la expresión, y una señal de poliadenilación (poli A) de beta globina de conejo se incluye para mediar la terminación de los transcritos de ARNm del hLDLR.

Un plásmido y vector ilustrativos descritos en la presente usan la globulina de unión a tiroxina (TBG) del promotor específico del hígado. En forma alternativa, pueden usarse otros promotores específicos del hígado [véase, por ejemplo, la base de datos del promotor de genes específico del hígado, Cold Spring Harbor, <http://rulai.schl.edu/LSPD>, alfa 1 anti-tripsina (A1AT); albúmina humana Miyatake *et al.*, J. Virol., 71: 5124-32 (1997), humAlb; y el promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig *et al.*, Gene Ther., 3: 1002-9 (1996)]. El intensificador/promotor mínimo de TTR, el promotor de alfa-antitripsina, LSP 25 (845 nt) requiere scAAV de menos intrones. Aunque menos deseado, pueden usarse otros promotores, tales como promotores virales, promotores constitutivos, promotores regulables [véase, por ejemplo, los documentos WO 2011/126808 y WO 2013/04943] o un promotor sensible a las señales fisiológicas en los vectores descritos en la presente.

Además de un promotor, un cassette y/o un vector de expresión pueden contener otras secuencias de inicio, terminación e intensificación de la transcripción apropiadas, señales de procesamiento del ARN eficientes, tales como señales de empalme y poliadenilación (poli A); secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que intensifican la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que intensifican la estabilidad de las proteínas; y, cuando se desee, secuencias que intensifican la secreción del producto codificado. Ejemplos de secuencias de poli A adecuadas incluyen, por ejemplo, SV40, hormona de crecimiento de bovino (bGH) y TK poli A.

Ejemplos de intensificadores adecuados incluyen, por ejemplo, el intensificador de alfa fetoproteína, el promotor/intensificador mínimo de TTR, y LSP (promotor de globulina de unión a TH/intensificador de alfa 1-microglobulina/bikunina), entre otros.

Estas secuencias de control están "enlazadas operablemente" a las secuencias génicas del hLDLR.

El cassette de expresión puede ser diseñado en un plásmido que se usa para la producción de un vector viral. Las secuencias mínimas requeridas para empacar el cassette de expresión en una partícula viral de AAV son las ITRs 5' y 3' de AAV, que pueden ser del mismo origen del AAV que la cápside, o que son de un origen diferente del AAV (para producir un pseudotipo de AAV). En una modalidad, las secuencias de la ITR de AAV2, o la versión deletada de la misma (Δ ITR), se usan por conveniencia y para acelerar la aprobación reglamentaria. Sin embargo, pueden seleccionarse las ITRs de otras fuentes de AAV. En donde la fuente de las ITR es de AAV2 y la cápside del AAV es de otra fuente de AAV, el vector resultante puede ser denominado como pseudotipificado. Típicamente, un cassette de expresión para un vector de AAV comprende una ITR 5' de AAV, secuencias de codificación del hLDLR y cualquier secuencia reguladora, y una ITR 3' de AAV. Sin embargo, otras configuraciones de estos elementos pueden ser adecuadas. Se ha descrito una versión acortada de la ITR 5', denominada Δ ITR, en la cual se eliminan la D-secuencia y el sitio de resolución terminal (trs). En otras modalidades, se usan las ITRs 5' y 3' de AAV de longitud completa.

La abreviatura "sc" se refiere a auto-complementario. Un "AAV auto-complementario" se refiere a un plásmido o vector que tiene un cassette de expresión en el cual una región de codificación llevada por una secuencia de ácido nucleico de AAV recombinante ha sido diseñada para formar un molde de ADN de doble cadena intramolecular. Tras la infección, en lugar de esperar la síntesis mediada por células de la segunda cadena, las dos mitades complementarias de scAAV se asociarán para formar una unidad de ADN de doble cadena (ADNd) que está lista para replicación y transcripción inmediatas. Véase, por ejemplo, D. M. McCarty *et al.*, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (Agosto de 2001), Vol. 8, número 16, páginas 1248-1254. AAV auto-complementarios se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,596,535; 7,125,717 y 7,456,683, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente como referencia.

5.1.2. Formulación de rAAV.hLDLR

La formulación de rAAV.hLDLR es una suspensión que contiene una cantidad efectiva de vector de rAAV.hLDLR suspendido en una solución acuosa que contiene solución salina de regulador de pH, un agente tensoactivo y una sal fisiológicamente compatible o mezcla de sales ajustada a una concentración iónica equivalente a cloruro de sodio (NaCl) aproximadamente 100 mM a cloruro de sodio

aproximadamente 250 mM, o una sal fisiológicamente compatible ajustada a una concentración iónica equivalente. En una modalidad, la formulación puede contener, por ejemplo, aproximadamente 1.5×10^{11} GC/kg a aproximadamente 6×10^{13} GC/kg, o aproximadamente 1×10^{12} a aproximadamente 1.25×10^{13} GC/kg, según se mide por qPCR optimizada (oqPCR) o PCR de gotita digital (ddPCR) como se describe, por ejemplo, en M. Lock *et al.*, *Hu Gene Therapy Methods*, Hum Gene Ther Methods. Abril de 2014; 25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub Febrero 14 de 2014, cita que se incorpora en la presente como referencia. Por ejemplo, una suspensión como se provee en la presente puede contener NaCl y KCl. El pH puede estar en la escala de 6.5 a 8, o de 7 a 7.5. Un agente tensoactivo adecuado, o combinación de agentes tensoactivos, puede seleccionarse de entre poloxámeros, es decir, copolímeros de tres bloques no iónicos compuestos de una cadena hidrofóbica central de polioxipropileno (óxido de poli (propileno)) flanqueado por dos cadenas hidrofílicas de polioxietileno (óxido de poli (etileno)), SOLUTOL HS 15 (hidroxiestearato de macrogol-15), LABRASOL (glicérido polioxi caprílico), éter polioxi 10 oleílico, TWEEN (ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán), etanol y polietilenglicol. En una modalidad, la formulación contiene un poloxámero. Estos copolímeros se nombran comúnmente con la letra "P" (por poloxámero) seguida de tres dígitos: los dos primeros dígitos x 100 dan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno, y el último dígito x 10 da el porcentaje de contenido de polioxietileno. En una modalidad, se selecciona el poloxámero 188. El agente tensoactivo puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente 0.0005% a aproximadamente 0.001% de la suspensión. En una modalidad, la formulación de rAAV.hLDLR es una suspensión que contiene por lo menos 1×10^{13} copias del genoma (GC)/mL, o mayor, según se mide por oqPCR o PCR de gotita digital (ddPCR) como se describe, por ejemplo, en M. Lock *et al.*, *Hu Gene Therapy Methods*, Hum Gene Ther Methods. Abril de 2014; 25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub Febrero 14 de 2014, cita que se incorpora en la presente como referencia. En una modalidad, el vector es suspendido en una solución acuosa que contiene cloruro de sodio 180 mM, fosfato de sodio 10 mM, poloxámero 188 a 0.001%, pH 7.3. La formulación es adecuada para su uso en sujetos humanos, y se administra por vía intravenosa. En una modalidad, la formulación se suministra a través de una vena periférica por infusión durante 20 minutos ($\pm$ 5 minutos). Sin embargo, esta vez puede ser ajustada según sea necesario o se desee.

A fin de asegurar que las cápsides vacías sean removidas de la dosis de AAV.hLDLR que se administra a los pacientes, las cápsides vacías son separadas de las partículas del vector durante el procedimiento de purificación del

vector, por ejemplo, usando ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio como se discute en detalle en la presente en la sección 8.3.2.5. En una modalidad, las partículas del vector que contienen a los genomas empacados se purifican de las cápsides vacías usando el procedimiento descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/322,093, presentada en Abril 13 de 2016, y la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 62/266,341, presentada en Diciembre 11 de 2015, y titulada "Scalable Purification Method for AAV8", las cuales se incorporan en la presente como referencia. Brevemente, se describe un esquema de purificación de dos pasos que captura y aísla selectivamente las partículas del vector de rAAV que contienen al genoma del sobrenadante clarificado concentrado de un cultivo de células de producción de rAAV. El procedimiento usa un método de captura por afinidad realizado a una alta concentración de sales, seguido de un método de resina de intercambio aniónico realizado a alto pH para proveer partículas de vector de rAAV que están sustancialmente libres de intermediarios de rAAV.

En ciertas modalidades, el método separa las partículas virales de AAV8 recombinantes que contienen ADN que comprenden secuencias genómicas farmacológicamente activas de intermediarios de la cápside de AAV8 de genoma deficiente (vacío). El método implica (a) formar una suspensión de carga que comprende: partículas virales de AAV8 recombinantes e intermediarios de la cápside de AAV8 vacíos que han sido purificados para remover los materiales no de AAV de un cultivo de células productoras de AAV en el cual las partículas e intermediarios se generaron; y un regulador de pH A que comprende Bis-Tris propano (BTP) 20 mM y un pH de aproximadamente 10.2; (b) cargar la suspensión de (a) en una resina de intercambio aniónico fuerte, dicha resina estando en un recipiente que tiene una entrada para el flujo de una suspensión y/o solución y una salida que permite el flujo de eluato del recipiente; (c) lavar la resina de intercambio aniónico cargada con regulador de pH B a 1% que comprende NaCl 10 mM y BTP 20 mM con un pH de aproximadamente 10.2; (d) aplicar un gradiente de concentración creciente de sales a la resina de intercambio aniónico cargada y lavada, en donde el gradiente de sales varía de NaCl aproximadamente 10 mM a aproximadamente 190 mM, inclusive de los criterios de valoración, o un equivalente; y (e) coleccionar las partículas de rAAV del eluato, dichas partículas de rAAV siendo purificadas de los intermediarios.

En una modalidad, el pH usado es de 10 a 10.4 (aproximadamente 10.2), y las partículas de rAAV son por lo menos aproximadamente 50% a aproximadamente 90% purificadas de los intermediarios de AAV8, o un pH de 10.2 y aproximadamente 90% a aproximadamente 99% purificadas de los intermediarios de AAV8. En una modalidad, esto se determina por copias del genoma. Una provisión o preparación de partículas de rAAV8 (genomas empacados) está "sustancialmente

libre" de cápsides vacías de AAV (y otros intermediarios), cuando las partículas de rAAV8 en la provisión son por lo menos aproximadamente 75% a aproximadamente 100%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95% o por lo menos 99% del rAAV8 en la provisión, y las "cápsides vacías" son menos de aproximadamente 1%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 10% o menos de aproximadamente 15% del rAAV8 en la provisión o preparación.

En una modalidad, la formulación será caracterizada por una provisión de rAAV que tiene una relación de "vacío" a "lleno" de 1 o menos, de preferencia menor de 0.75, más preferiblemente 0.5, de preferencia menor de 0.3.

En una modalidad adicional, el rendimiento promedio de partículas de rAAV es de por lo menos aproximadamente 70%. Esto puede calcularse determinando el título (copias del genoma) en la mezcla cargada en la columna y la cantidad presente en las eluciones finales. Además, estos pueden determinarse con base en el análisis de q-PCR y/o técnicas de SDS-PAGE tales como las descritas en la presente o las que se han descrito en la técnica.

Por ejemplo, para calcular el contenido de partículas vacías y llenas, los volúmenes de las bandas de VP3 para una muestra seleccionada (por ejemplo, una preparación purificada con gradiente de iodixanol, en donde # de GC = # de partículas) se grafican contra las partículas de GC cargadas. La ecuación lineal resultante ($y = mx + c$) se usa para calcular el número de partículas en los volúmenes de las bandas de los picos del artículo de prueba. El número de partículas (pt) por 20 μ L cargados se multiplica entonces por 50 para dar las partículas (pt)/mL. Pt/mL dividido entre GC/mL da la relación de partículas a copias del genoma (pt/GC). Pt/mL-GC/mL da las pt vacías/mL. Las pt vacías/mL divididas entre pt/mL y $\times 100$ da el por ciento de partículas vacías.

Generalmente, los métodos para poner a prueba las cápsides vacías y las partículas de vectores de AAV con genomas empacados han sido conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Grimm *et al.*, *Gene Therapy* (1999) 6: 1322-1330; y Sommer *et al.*, *Molec. Ther.* (2003) 7: 122-128. Para la prueba de la cápside desnaturalizada, los métodos incluyen someter la provisión de AAV tratada a SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida, que consiste de cualquier gel capaz de separar las tres proteínas de la cápside, por ejemplo, un gel de gradiente que contiene Tris-acetato a 3-8% en el regulador de pH, entonces, hacer correr el gel hasta que se separe el material de la muestra, y secar el gel sobre membranas de nylon o de nitrocelulosa, de preferencia nylon. Se usan entonces anticuerpos de la cápside anti-AAV como los anticuerpos primarios que se unen a las proteínas de la

cápside desnaturalizadas, de preferencia un anticuerpo monoclonal anti-cápside de AAV, muy preferiblemente el anticuerpo monoclonal anti-AAV-2 B1 (Wobus *et al.*, *J. Virol.* (2000) 74: 9281-9293). Se usa entonces un anticuerpo secundario, uno que se une al anticuerpo primario y que contiene medios para detectar la unión con el anticuerpo primario, más preferiblemente un anticuerpo anti-IgG que contiene una molécula de detección unida covalentemente al mismo, muy preferiblemente un anticuerpo de IgG anti-ratón de oveja unido covalentemente a peroxidasa de rábano picante. Se usa un método para detectar la unión para determinar semicuantitativamente la unión entre los anticuerpos primarios y secundarios, de preferencia un método de detección capaz de detectar emisiones de isótopos radiactivos, radiación electromagnética o cambios colorimétricos, muy preferiblemente un kit de detección de quimioluminiscencia. Por ejemplo, para SDS-PAGE, muestras de fracciones de la columna pueden tomarse y calentarse en regulador de pH de carga de SDS-PAGE que contiene al agente reductor (por ejemplo, DTT), y las proteínas de la cápside se resuelven en geles de poliacrilamida de gradiente pre-formado (por ejemplo, Novex). La tinción con plata puede realizarse usando SilverXpress (Invitrogen, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En una modalidad, la concentración de genomas de vectores de AAV (vg) en las fracciones de la columna puede medirse por PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Las muestras son diluidas y digeridas con desoxirribonucleasa I (u otra nucleasa adecuada) para remover el ADN exógeno. Después de inactivación de la nucleasa, las muestras se diluyen y se amplifican adicionalmente usando iniciadores y una sonda fluorogénica TaqManTM específica para la secuencia de ADN entre los iniciadores. El número de ciclos necesarios para alcanzar un nivel definido de fluorescencia (ciclo umbral, Ct) se mide para cada muestra en un sistema de detección de secuencias Prism 7700 de Applied Biosystems. El ADN de plásmido que contiene secuencias idénticas a las contenidas en el vector de AAV se usa para generar una curva estándar en la reacción de Q-PCR. Los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos de las muestras se usan para determinar el título del genoma del vector normalizándolo con el valor de Ct de la curva estándar del plásmido. Pueden usarse también pruebas de criterios de valoración basadas en la PCR digital.

En un aspecto, se provee en la presente un método de q-PCR optimizada, el cual usa una serina proteasa de amplio espectro, por ejemplo, la proteinasa K (tal como está disponible comercialmente de Qiagen). Más particularmente, la prueba del título del genoma por la qPCR optimizada es similar a una prueba estándar, salvo que después de la digestión con la desoxirribonucleasa I, las muestras son diluidas con regulador de pH de proteinasa K y tratadas con proteinasa K seguida de inactivación con calor. Convenientemente, las muestras son

diluidas con regulador de pH de proteinasa K en una cantidad igual al tamaño de la muestra. El regulador de pH de proteinasa K puede ser concentrado hasta 2 veces o más. Típicamente, el tratamiento con la proteinasa K es de aproximadamente 0.2 mg/mL, pero puede hacerse variar de 0.1 mg/mL a aproximadamente 1 mg/mL. El paso de tratamiento se lleva a cabo generalmente a aproximadamente 55°C por aproximadamente 15 minutos, pero puede realizarse a una temperatura más baja (por ejemplo, aproximadamente 37°C a aproximadamente 50°C) por un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos), o una temperatura más alta (por ejemplo, hasta aproximadamente 60°C) por un período más corto (por ejemplo, aproximadamente 5 a 10 minutos). Del mismo modo, la inactivación con calor es generalmente a aproximadamente 95°C por aproximadamente 15 minutos, pero la temperatura puede ser reducida (por ejemplo, aproximadamente 70°C a aproximadamente 90°C) y el tiempo extendido (por ejemplo, aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos). Las muestras son entonces diluidas (por ejemplo, 1000 veces) y sometidas a análisis TaqMan como se describe en la prueba estándar.

Adicionalmente, o en forma alternativa, puede usarse PCR de gotita digital (ddPCR). Por ejemplo, se han descrito métodos para determinar los títulos del genoma de vectores de AAV de cadena sencilla y auto-complementarios por ddPCR. Véase, por ejemplo, M. Lock *et al.*, *Hum Gene Therapy Methods*. Abril de 2014; 25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub Febrero 14 de 2014.

5.1.3 Fabricación

El vector de rAAV.hLDLR puede fabricarse como se muestra en el diagrama de flujo mostrado en la figura 11. Brevemente, las células (por ejemplo, células HEK 293) se propagan en un sistema de cultivo de células adecuado y transfectadas para la generación del vector. Entonces, el vector de rAAV.hLDLR puede ser cosechado, concentrado y purificado para preparar el vector en masa, el cual es entonces llenado y acabado en un procedimiento aguas abajo.

Los métodos para fabricar los vectores de terapia génica descritos en la presente incluyen métodos bien conocidos en la técnica, tales como la generación de ADN de plásmido usado para la producción de los vectores de terapia génica, la generación de los vectores, y la purificación de los vectores. En algunas modalidades, el vector de terapia génica es un vector de AAV, y los plásmidos generados son un plásmido cis de AAV que codifica para el genoma de AAV y el gen de interés, un plásmido trans de AAV que contiene los genes cap y rep de AAV, y un plásmido auxiliar de adenovirus. El procedimiento de generación del vector puede

incluir pasos de método tales como el inicio del cultivo de células, el paso de las células, la siembra de las células, la transfección de las células con el ADN de plásmido, el intercambio del medio después de la transfección por medio libre de suero, y la cosecha de las células que contienen al vector y los medios de cultivo. Las células cosechadas que contienen al vector y los medios de cultivo son referidos en la presente como cosecha cruda de células.

La cosecha cruda de células puede ser sometida después a pasos de método tales como la concentración de la cosecha del vector, diafiltración de la cosecha del vector, microfluidización de la cosecha del vector, digestión con nucleasa de la cosecha del vector, filtración del intermediario microfluidizado, purificación por cromatografía, purificación por ultracentrifugación, intercambio de regulador de pH por filtración de flujo tangencial, y formulación y filtración para preparar el vector en masa.

En ciertas modalidades, métodos similares a los de la figura 11 pueden usarse en conjunción con otras células productoras de AAV. Se conocen numerosos métodos en la técnica para la producción de vectores de rAAV, e incluyen transfección, producción de líneas de células estables, y sistemas de producción de virus híbridos infecciosos que incluyen híbridos de adenovirus-AAV, híbridos de virus de herpes-AAV e híbridos de baculovirus-AAV. Véase, por ejemplo, G Ye, *et al.*, *Hum Gene Ther Clin Dev*, 25: 212-217 (Diciembre de 2014); RM Kotin, *Hum Mol Genet*, 2011, Vol. 20, emisión de revisión 1, R2-R6; M. Mietzsch, *et al.*, *Hum Gene Therapy*, 25: 212-222 (Marzo de 2014); T Virag *et al.*, *Hum Gene Therapy*, 20: 807-817 (Agosto de 2009); N. Clement *et al.*, *Hum Gene Therapy*, 20: 796-806 (Agosto de 2009); y DL Thomas *et al.*, *Hum Gene Ther*, 20: 861-870 (Agosto de 2009). Los cultivos de producción de rAAV para la producción de partículas de virus de rAAV requieren todos: 1) células hospederas adecuadas que incluyen, por ejemplo, líneas de células derivadas de humano, tales como células HeLa, A549 o 293, o líneas de células derivadas de insecto, tales como SF-9, en el caso de sistemas de producción de baculovirus; 2) función adecuada del virus auxiliar, provista por adenovirus mutantes o de tipo silvestre (tales como adenovirus sensibles a la temperatura), virus de herpes, baculovirus, o una construcción de ácido nucleico que provea funciones auxiliares en trans o en cis; 3) genes rep de AAV funcionales, genes cap funcionales y productos génicos; 4) un transgen (tal como un transgen terapéutico) flanqueado por secuencias de la ITR de AAV; y 5) medios y componentes de medios adecuados para sustentar la producción de rAAV.

Una variedad de células y líneas de células adecuadas se han descrito para su uso en la producción de AAV. La célula misma puede seleccionarse de cualquier organismo biológico, incluyendo células procarióticas (por ejemplo,

bacterianas), y células eucarióticas, que incluyen células de insecto, células de levadura y células de mamífero. Células hospederas particularmente deseables se seleccionan de entre cualquier especie de mamífero incluyendo, sin limitación, células tales como células A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, BHK, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, WI38 o HeLa, células HEK 293 (que expresan E1 adenoviral funcional), células Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y fibroblastos primarios, y células de hepatocitos y mioblastos derivados de mamíferos que incluyen humano, mono, ratón, rata, conejo y hámster. En ciertas modalidades, las células son células adaptadas a la suspensión. La selección de las especies de mamíferos que proveen las células no es una limitación de esta invención; ni es el tipo de células de mamífero, es decir, fibroblasto, hepatocito, célula tumoral, etc.

En una modalidad específica, los métodos usados para fabricar los vectores de la terapia génica se describen en el ejemplo 3 en la sección 8, más adelante.

5.2 Población de pacientes

Los pacientes que son candidatos para el tratamiento son de preferencia adultos (hombres o mujeres ≥ 18 años de edad) con diagnóstico de HoFH que poseen dos mutaciones en el gen *LDLR*; es decir, los pacientes que tienen mutaciones del LDLR molecularmente definidas en ambos alelos en el contexto de una presentación clínica consistente con HoFH, que puede incluir niveles no tratados de LDL-C, por ejemplo, niveles de LDL-C > 300 mg/dl, niveles tratados de LDL-C, por ejemplo, niveles de LDL-C < 300 mg/dl y/o niveles de colesterol total en plasma mayores de 500 mg/dl y aterosclerosis prematura y agresiva. En algunas modalidades, un paciente < 18 años de edad puede ser tratado. En algunas modalidades, el paciente que es tratado es un varón ≥ 18 años de edad. En algunas modalidades, el paciente que es tratado es una mujer ≥ 18 años de edad. Los candidatos para tratamiento incluyen pacientes con HoFH que están sufriendo tratamiento con fármacos que disminuyen los niveles de lípidos, tales como estatinas, ezetimiba, secuestrantes de ácidos biliares, inhibidores de la PCSK9 y aféresis del plasma y/o LDL.

Antes del tratamiento, el paciente con HoFH debe ser evaluado en cuanto a NAb para el serotipo de AAV usado para suministrar el gen del hLDLR. Dichos NAb pueden interferir con la eficiencia de la transducción y reducir la eficacia terapéutica. Los pacientes con HoFH que tienen un título de NAb en suero de la referencia inicial $\leq 1:5$ son buenos candidatos para el tratamiento con el protocolo de terapia génica de rAAV.hLDLR. El tratamiento de los pacientes con HoFH con títulos de NAb $> 1:5$ en suero pueden requerir una terapia de combinación, tal como co-

tratamiento transitorio con un inmunosupresor para dicha co-terapia que incluye, pero no está limitado a, esteroides, antimetabolitos, inhibidores de células T y agentes alquilantes. Por ejemplo, dicho tratamiento transitorio puede incluir un esteroide (por ejemplo, prednisona) dosificado una vez al día por 7 días a una dosis decreciente, en una cantidad que inicia a aproximadamente 60 mg, y que disminuye en 10 mg/día (día 7 sin dosis). Pueden seleccionarse otras dosis y medicaciones.

Puede permitirse que los sujetos continúen con su estándar de tratamiento para el cuidado (por ejemplo, aféresis de LDL y/o intercambio de plasma, y otros tratamientos que disminuyen los niveles de lípidos) antes de y concurrentemente con el tratamiento de terapia génica a la discreción de su médico a cargo. En la alternativa, el médico puede preferir detener el estándar de las terapias para el cuidado antes de administrar el tratamiento de terapia génica y, opcionalmente, reanudar el estándar de tratamientos para el cuidado como una co-terapia después de la administración de la terapia génica. Los criterios de valoración deseables del régimen de terapia génica son la reducción de la lipoproteína de baja densidad colesterol (LDL-C) y el cambio en la tasa catabólica fraccional (FCR) de la LDL apolipoproteína B (apoB) de la referencia inicial hasta 12 semanas después de la administración del tratamiento de terapia génica. Otros criterios de valoración deseados incluyen, por ejemplo, reducción de uno o más de: colesterol total (TC), lipoproteína no de alta densidad colesterol (no-HDL-C), disminución de triglicéridos (TG) en ayuno, y cambios en HDL-C (por ejemplo, los niveles incrementados son deseables), lipoproteína de muy baja densidad colesterol (VLDL-C), lipoproteína(a) (Lp(a)), apolipoproteína B (apoB) y/o apolipoproteína A-I (apoA-I).

En una modalidad, los pacientes logran umbrales deseados de LDL-C (por ejemplo, LDL-C <200, <130 o <100, mg/dl) después del tratamiento con el AAV8.hLDLR, solo y/o en combinación con el uso de tratamientos complementarios durante la duración del estudio.

Sin embargo, los pacientes que tienen una o más de las siguientes características pueden ser excluidos del tratamiento según el criterio de su médico a cargo:

- Insuficiencia cardíaca definida por la clasificación de la NYHA como clase funcional III con historia de hospitalización u hospitalizaciones dentro de 12 semanas de la visita en la referencia inicial o clase funcional IV.
- Historia dentro de 12 semanas de la visita en la referencia inicial de un infarto al miocardio (MI), angina inestable que lleva a hospitalización, cirugía de injerto de bypass (derivación) de arteria coronaria (CABG), intervención coronaria percutánea (PCI), arritmia cardíaca no controlada, cirugía de la carótida o colocación

de stent, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio, revascularización de la carótida, procedimiento endovascular o intervención quirúrgica.

- Hipertensión no controlada definida como: presión arterial sistólica >180 mmHg, presión arterial diastólica >95 mmHg.

- Historia de cirrosis o enfermedad crónica del hígado basada en la evaluación histológica documentada o la formación de imágenes no invasiva o la realización de pruebas.

- Diagnóstico documentado de cualquiera de las siguientes enfermedades del hígado: esteatohepatitis no alcohólica (compuesta a prueba por biopsia); enfermedad hepática alcohólica; hepatitis autoinmune; cáncer de hígado; cirrosis biliar primaria; colangitis esclerosante primaria; enfermedad de Wilson; hemocromatosis; deficiencia de anti-tripsina α_1 .

- Pruebas de la función hepática anormales en el examen (AST o ALT >2x el límite superior de lo normal (ULN) y/o bilirrubina total >1.5x ULN, a menos que el paciente tenga hiperbilirrubinemia no conjugada debida al síndrome de Gilbert).

- Hepatitis B como es definida como positiva para HepB SAg, o Hep B Core Ab, y/o ADN viral, o hepatitis C activa crónica como es definida como positiva para Ab de HCV y ARN viral.

- Historia de abuso de alcohol dentro de 52 semanas.

- Ciertas medicaciones prohibidas que se sabe son potencialmente hepatotóxicas, especialmente aquellas que pueden inducir esteatosis microvesicular o macrovesicular. Estas incluyen, pero no están limitadas a: acutane, amiodarona, medicaciones de HAART, uso intensivo de acetaminofén (2 g/día >3 x cada semana), isoniazida, metotrexato, tetraciclinas, tamoxifeno y valproato.

- Uso actual de corticosteroides sistémicos o tuberculosis activa, enfermedad fúngica sistémica u otra infección crónica.

- Historia de enfermedades de inmunodeficiencia, incluyendo un resultado positivo en la prueba del VIH.

- Insuficiencia renal crónica definida como GRF estimada <30 mL/min.

- Historia de cáncer dentro de los últimos 5 años, salvo por un tratamiento adecuado del cáncer de piel de células basales, cáncer de piel de células escamosas o cáncer cervical *in situ*.

- Trasplante de órganos previo.

- Cualquier procedimiento quirúrgico importante que ocurra menos de 3 meses antes de la determinación de las líneas base y/o el tratamiento.

- Un título de NAb de AAV8 en suero en la referencia inicial >1:5.

En otras modalidades, el médico a cargo puede determinar que la presencia de una o más de estas características físicas (historia clínica) no debe impedir el tratamiento como se provee en la presente.

5.3. Dosificación y vía de administración

Los pacientes reciben una sola dosis de rAAV.hLDLR administrado a través de una vena periférica por infusión, por ejemplo, durante aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos. La dosis de rAAV.hLDLR administrada a un paciente es de por lo menos 2.5×10^{12} GC/kg o 7.5×10^{12} GC/kg, o por lo menos 5×10^{11} GC/kg a aproximadamente 7.5×10^{12} GC/kg (según se mide por oqPCR o ddPCR). Sin embargo, pueden seleccionarse otras dosis. En una modalidad preferida, la suspensión de rAAV usada tiene una potencia tal que una dosis de 5×10^{11} GC/kg administrada a un modelo de ratón LDLR^{-/-}Apobec^{-/-} con doble expresión bloqueada de HoFH (ratón DKO) disminuye los niveles de colesterol en la referencia inicial en el ratón DKO en 25% a 75%.

En algunas modalidades, la dosis de rAAV.hLDLR administrada a un paciente está en la escala de 2.5×10^{12} GC/kg a 7.5×10^{12} GC/kg. De preferencia, la suspensión de rAAV usada tiene una potencia tal que una dosis de 5×10^{11} GC/kg administrada a un modelo de ratón LDLR^{-/-}Apobec^{-/-} con doble expresión bloqueada de HoFH (ratón DKO) disminuye los niveles de colesterol en la referencia inicial en el ratón DKO en 25% a 75%. En modalidades específicas, la dosis de rAAV.hLDLR administrada a un paciente es de por lo menos 5×10^{11} GC/kg, 2.5×10^{12} GC/kg, 3.0×10^{12} GC/kg, 3.5×10^{12} GC/kg, 4.0×10^{12} GC/kg, 4.5×10^{12} GC/kg, 5.0×10^{12} GC/kg, 5.5×10^{12} GC/kg, 6.0×10^{12} GC/kg, 6.5×10^{12} GC/kg, 7.0×10^{12} GC/kg o 7.5×10^{12} GC/kg.

En algunas modalidades, el rAAV.hLDLR se administra en combinación con una o más terapias para el tratamiento de la HoFH. En algunas modalidades, el rAAV.hLDLR se administra en combinación con la terapia estándar de disminución de los niveles de lípidos que se usa para tratar la HoFH que incluye, pero no está limitada a, estatina, ezetimiba, ezedia, secuestrantes de ácidos biliares, aféresis de la LDL, aféresis del plasma, intercambio de plasma, lomitapida, mipomersen y/o inhibidores de la PCSK9. En algunas modalidades, el rAAV.hLDLR se administra en combinación con niacina. En algunas modalidades, el rAAV.hLDLR se administra en combinación con fibratos.

5.4. Medición de los objetivos clínicos

La seguridad del vector de terapia génica después de la administración puede evaluarse por el número de eventos adversos, los cambios observados en el examen físico, y/o los parámetros de laboratorio clínico evaluados en puntos de tiempo múltiples hasta aproximadamente 52 semanas después de la administración del vector. Aunque el efecto fisiológico puede observarse antes, por ejemplo, a aproximadamente 1 día a una semana, en una modalidad, niveles de expresión de estado estable se alcanzan a aproximadamente 12 semanas.

La reducción de LDL-C lograda con la administración de rAAV.hLDLR puede evaluarse como un por ciento de cambio definido en LDL-C a aproximadamente 12 semanas, o en otros puntos de tiempo deseados, en comparación con la referencia inicial.

Otros parámetros de lípidos pueden evaluarse también a aproximadamente 12 semanas, o en otros puntos de tiempo deseados, en comparación con los valores en la referencia inicial, específicamente el por ciento de cambio en los niveles de colesterol total (TC), lipoproteína no de alta densidad colesterol (no-HDL-C), HDL-C, triglicéridos en ayuno (TG), lipoproteína de muy baja densidad colesterol (VLDL-C), lipoproteína(a) (Lp(a)), apolipoproteína B (apoB), y apolipoproteína AI (apoA-I). El mecanismo metabólico por el cual la LDL-C es reducida puede evaluarse realizando estudios de la cinética de la LDL antes de la administración de rAAV.hLDLR y de nuevo 12 semanas después de la administración. El parámetro primario que se evaluará es la tasa catabólica fraccional (FCR) de LDL apoB.

Como se usa en la presente, el vector de rAAV.hLDLR en la presente "reemplaza funcionalmente" o "complementa funcionalmente" el LDLR defectuoso de los pacientes con LDLR activo cuando el paciente expresa un nivel suficiente de LDLR para lograr por lo menos uno de estos criterios de valoración clínicos. Los niveles de expresión de hLDLR que logran tan poco como aproximadamente 10% a menos de 100% de los niveles normales de los criterios de valoración clínicos de tipo silvestre en un paciente sin FH, pueden proveer reemplazo funcional.

En una modalidad, la expresión puede observarse tan tempranamente como aproximadamente 8 horas a aproximadamente 24 horas después de la dosificación. Uno o más de los efectos clínicos deseados descritos anteriormente pueden observarse dentro de varios días a varias semanas después de la dosificación.

La seguridad y eficacia a largo plazo (hasta 260 semanas) pueden evaluarse después de la administración de rAAV.hLDLR.

Pueden usarse las evaluaciones de laboratorio clínico estándar y otras pruebas clínicas descritas en las secciones 6.4.1 a 6.7 más adelante, para monitorear los eventos adversos, los criterios de valoración de eficacia que evalúan el por ciento de cambio en los parámetros de lípidos, las evaluaciones farmacodinámicas, la cinética de las lipoproteínas y las concentraciones de ApoB-100, así como las respuestas inmunes al vector de rAAV.hLDLR.

Los siguientes ejemplos son sólo ilustrativos, y no pretenden limitar la presente invención.

EJEMPLOS

6. EJEMPLO 1

Protocolo para el tratamiento de sujetos humanos

Este ejemplo se refiere a un tratamiento de terapia génica para pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigótica (HoFH) genéticamente confirmada debida a mutaciones en el gen del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR). En este ejemplo, el vector de terapia génica, AAV8.TBG.hLDLR, un vector viral adeno-asociado 8 (AAV8) de replicación deficiente que expresa el hLDLR, se administra a los pacientes con HoFH. La eficacia del tratamiento puede evaluarse usando los niveles de lipoproteína de baja densidad colesterol (LDL-C) como un sustituto para la expresión del transgen. Las evaluaciones de eficacia primarias incluyen niveles de LDL-C a aproximadamente 12 semanas después del tratamiento, con persistencia del efecto seguida después por cuando menos 52 semanas. La seguridad y persistencia a largo plazo de la expresión del transgen pueden medirse después del tratamiento en muestras de biopsia del hígado.

6.1. Vector de terapia génica

El vector de terapia génica es un vector de AAV8 que expresa el transgen del receptor de lipoproteína de baja densidad humano (hLDLR) bajo el control de un promotor específico del hígado (globulina de unión a tiroxina, TBG) y es referido en este ejemplo como AAV8.TBG.hLDLR (véase la figura 7). El vector de AAV8.TBG.hLDLR consiste del ingrediente activo del vector de AAV y un regulador de pH de formulación. El componente de vector de AAV externo es un serotipo 8, cápside icosaédrica T = 1 que consiste de 60 copias de las tres proteínas virales de AAV, VP1, VP2 y VP3, a una relación de 1:1:18. La cápside contiene un genoma de vector de AAV recombinante (rAAV) de ADN de cadena sencilla. El genoma contiene un transgen del hLDLR flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. Un intensificador, promotor, intrón, secuencia de codificación del hLDLR y

señal de poliadenilación (poli A) comprenden el transgen del hLDLR. Las ITRs son los elementos genéticos responsables de la replicación y empaquetado del genoma durante la producción del vector, y son los únicos elementos cis virales necesarios para generar el rAAV. La expresión de la secuencia de codificación del hLDLR es dirigida desde el promotor de TBG específico de hepatocitos. Dos copias del elemento intensificador de alfa 1 microglobulina/bikunina preceden al promotor de TBG para estimular la actividad del promotor. Un intrón quimérico está presente para intensificar adicionalmente la expresión, y una señal de poliadenilación (poli A) de beta globina de conejo se incluye para mediar la terminación de los transcritos de ARNm del hLDLR. La secuencia de pAAV.TBG.PI.hLDLRco.RGB que se usó para producir este vector, se provee en SEQ ID NO: 6.

La formulación del agente en investigación es de por lo menos 1×10^{13} copias del genoma (GC)/mL en solución acuosa que contiene cloruro de sodio 180 mM, fosfato de sodio 10 mM, poloxámero 188 a 0.001%, pH 7.3, y se administra a través de una vena periférica por infusión durante 20 minutos ($\pm$ 5 minutos).

6.2. Población de pacientes

Los pacientes tratados son adultos con hipercolesterolemia familiar homocigótica (HoFH) que poseen dos mutaciones en el gen del LDLR. Los pacientes pueden ser hombres o mujeres que tengan 18 años de edad o más. Los pacientes tienen mutaciones del LDLR molecularmente definidas en ambos alelos en el contexto de una presentación clínica consistente con la HoFH, que puede incluir niveles no tratados de LDL-C, por ejemplo, niveles de LDL-C >300 mg/dl, niveles tratados de LDL-C, por ejemplo, niveles de LDL-C <300 mg/dl y/o niveles de colesterol total en plasma mayores de 500 mg/dl, y aterosclerosis prematura y agresiva. Los pacientes tratados pueden estar sufriendo concurrentemente tratamiento con fármacos que disminuyen los niveles de lípidos, tales como estatinas, ezetimiba, secuestrantes de ácidos biliares, inhibidores de la PCSK9, y aféresis del plasma y/o LDL.

Los pacientes que son tratados pueden tener un título de anticuerpos neutralizantes (NAb) de AAV8 en suero en la referencia inicial $\leq 1:5$. Si un paciente no tiene un título de anticuerpos neutralizantes (NAb) de AAV8 en suero en la referencia inicial $\leq 1:5$, el paciente puede ser co-tratado transitoriamente con un inmunosupresor durante el periodo de transducción. Los inmunosupresores para la co-terapia incluyen, pero no están limitados a, esteroides, antimetabolitos, inhibidores de células T y agentes alquilantes.

Puede permitirse que los sujetos continúen con su estándar de tratamiento para el cuidado (por ejemplo, aféresis de LDL y/o intercambio de plasma,

y otros tratamientos que disminuyen los niveles de lípidos) antes de y concurrentemente con el tratamiento de terapia génica a la discreción de su médico a cargo. En la alternativa, el médico puede preferir detener el estándar de las terapias para el cuidado antes de administrar el tratamiento de terapia génica y, opcionalmente, reanudar el estándar de tratamientos para el cuidado como una co-terapia después de la administración de la terapia génica. Los criterios de valoración deseables del régimen de terapia génica son la reducción de la lipoproteína de baja densidad colesterol (LDL-C) y el cambio en la tasa catabólica fraccional (FCR) de la LDL apolipoproteína B (apoB) de la referencia inicial hasta aproximadamente 12 semanas después de la administración del tratamiento de terapia génica.

6.3. Dosificación y vía de administración

Los pacientes reciben una sola dosis de AAV8.TBG.hLDLR administrada a través de una vena periférica por infusión. La dosis de AAV8.TBG.hLDLR administrada a un paciente es de aproximadamente 2.5×10^{12} GC/kg o 7.5×10^{12} GC/kg. A fin de asegurar que las cápsides vacías sean removidas de la dosis de AAV8.TBG.hLDLR que se administra a los pacientes, las cápsides vacías son separadas de las partículas de vector por ultracentrifugación de gradiente de cloruro de cesio o por cromatografía de intercambio iónico durante el procedimiento de purificación del vector, como se discute en la sección 8.3.2.5.

6.4. Medición de los objetivos clínicos

- La reducción de la LDL-C lograda con la administración de AAV8.TBG.hLDLR puede evaluarse como un por ciento de cambio definido en la LDL-C a aproximadamente 12 semanas en comparación con la referencia inicial.
- Otros parámetros de lípidos pueden evaluarse a aproximadamente 12 semanas en comparación con los valores en la referencia inicial, específicamente el por ciento de cambio en colesterol total (TC), lipoproteína no de alta densidad colesterol (no-HDL-C), HDL-C, triglicéridos en ayuno (TG), lipoproteína de muy baja densidad colesterol (VLDL-C), lipoproteína(a) (Lp(a)), apolipoproteína B (apoB) y apolipoproteína A-I (apoA-I).
- El mecanismo metabólico por el cual la LDL-C es reducida puede evaluarse realizando estudios de cinética de la LDL antes de la administración del vector y de nuevo a aproximadamente 12 semanas después de la administración. El parámetro primario por ser evaluado es la tasa catabólica fraccional (FCR) de la LDL apoB.
- La seguridad y eficacia a largo plazo (hasta 52 semanas o hasta 260 semanas) pueden evaluarse después de la administración de AAV8.TBG.hLDLR.

6.4.1. Evaluaciones de laboratorio clínico estándar que pueden realizarse

Los siguientes perfiles clínicos pueden ser puestos a prueba antes y después del tratamiento:

- Perfil bioquímico: sodio, potasio, cloruro, dióxido de carbono, glucosa, nitrógeno ureico en sangre, lactato deshidrogenasa (LDH), creatinina, creatinina fosfocinasa, calcio, proteína total, albúmina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, bilirrubina total y GGT.
- CBC: conteo de glóbulos blancos (WBC), hemoglobina, hematócrito, conteo de plaquetas, amplitud de distribución de los glóbulos rojos, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración de hemoglobina corpuscular media.
- Coagulación: PT, INR, PTT (en el examen y en la referencia inicial, y según sea necesario).
- Análisis de orina: color de la orina, turbiedad, pH, glucosa, bilirrubina, cetonas, sangre, proteínas, WBC.

6.4.2. Eventos adversos de interés

Las siguientes pruebas clínicas pueden usarse para monitorear la toxicidad:

- Daño hepático
 - CTCAE v4.0 resultado de laboratorio de grado 3 o mayor para bilirrubina o enzimas hepáticas (AST, ALT, AlkPhos (fosfatasa alcalina)).
 - Bilirrubina y AlkPhos CTCAE v4.0 de grado 2 (bilirrubina $>1.5 \times \text{ULN}$; AlkPhos $>2.5 \times \text{ULN}$).
 - Hepatotoxicidad (es decir, criterios cubiertos para la "ley de Hy")
 - $\geq 3 \times \text{ULN}$ (límite superior de lo normal) para AST o ALT, y
 - $>2 \times \text{ULN}$ bilirrubina total en suero sin fosfatasa alcalina elevada, y
 - Ninguna otra razón puede encontrarse para explicar el incremento de los niveles de transaminasa combinados con el incremento de la bilirrubina total.

6.5. Criterios de valoración de eficacia

La evaluación del por ciento de cambio en los parámetros de lípidos a aproximadamente 12 semanas después de la administración de AAV8.TBG.hLDLR puede evaluarse y compararse con la referencia inicial. Esto incluye:

- Por ciento de cambio en LDL-C medido directamente (criterio de valoración de eficacia primaria).

- Por ciento de cambio en colesterol total, VLDL-C, HDL-C, HDL no calculada-colesterol, cambios en triglicéridos, apoA-I, apoB y Lp(a).

El valor de LDL-C en la referencia inicial puede calcularse como el promedio de los niveles de LDL-C obtenidos bajo condiciones de ayuno en 2 ocasiones separadas antes de la administración de AAV8.TBG.hLDLR para el control de la variabilidad biológica y de laboratorio y asegurar una evaluación de eficacia confiable.

6.5.1. Evaluaciones farmacodinámicas/de eficacia

Las siguientes pruebas de eficacia de laboratorio pueden evaluarse bajo condiciones de ayuno:

- LDL-C medidos directamente
- Panel de lípidos: colesterol total, LDL-C, no-HDL-C, HDL-C, TG, Lp(a)
- Apolipoproteínas: apoB y apoA-I.

Adicionalmente, puede determinarse la cinética de apoB LDL opcional antes de y 12 semanas después del tratamiento. La eficacia de la disminución de los niveles de lípidos puede evaluarse como el por ciento de cambios desde la referencia inicial a aproximadamente 12, 24 y 52 semanas después de la administración del vector. Los valores de LDL-C en la referencia inicial se calculan promediando los niveles de LDL-C obtenidos bajo condiciones de ayuno en 2 ocasiones separadas antes de la administración. El por ciento de cambio desde la referencia inicial en LDL-C a 12 semanas después de la administración del vector es la medida primaria de la eficacia de la transferencia de genes.

6.6. Cinética de las lipoproteínas

Pueden llevarse a cabo estudios de la cinética de las lipoproteínas antes de la administración del vector y de nuevo después de 12 semanas para evaluar el mecanismo metabólico por el cual los niveles de LDL-C son reducidos. El parámetro primario por ser evaluado es la tasa catabólica fraccional (FCR) de LDL-apoB. La marcación endógena de apoB se logra mediante la infusión intravenosa de leucina deuterada, seguida de la toma de muestras de sangre durante un período de 48 horas.

6.6.1. Aislamiento de ApoB-100

VLDL, IDL y LDL se aíslan mediante la ultracentrifugación secuencial de muestras cronometradas extraídas después de la infusión de D3-leucina. ApoB-100 se aísla de estas lipoproteínas por electroforesis en dodecilsulfato de sodio-gel de poliacrilamida (SDS PAGE) preparativa usando un sistema de regulador de pH de

Tris-glicina. Las concentraciones de ApoB dentro de las especies de apoB individuales se determinan mediante la prueba de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). La concentración total de apoB se determina usando una prueba inmunoturbidimétrica automatizada.

6.6.2. Determinaciones del enriquecimiento isotópico

Se extraen bandas de ApoB-100 de geles de poliacrilamida. Las bandas extraídas se hidrolizan en HCl 12N a 100°C por 24 horas. Los aminoácidos son convertidos hasta los derivados de éster de N-isobutilo y N-heptafluorobutiramida antes del análisis usando un cromatógrafo de gas/espectrómetro de masa. El enriquecimiento (por ciento) de isótopos se calcula a partir de las relaciones de la corriente de iones observadas. Los datos en este formato son análogos a la radiactividad específica en experimentos con radiotrazadores. Se asume que cada sujeto permanece en estado estable con respecto al metabolismo de apoB-100 durante este procedimiento.

6.7. Farmacocinética y respuesta inmune a las evaluaciones de AAV8

Las siguientes pruebas pueden usarse para evaluar la farmacocinética, la pre-inmunidad al vector de AAV y la respuesta inmune al vector de AAV:

- Monitoreo de la respuesta inmune: título de NAb de AAV8; respuestas de las células T al vector de AAV8; respuestas de las células T al hLDLR.
- Concentración del vector: concentraciones de AAV8 en plasma, medidas como genomas del vector por PCR.
- Tipificación del antígeno de leucocitos humano (tipo de HLA): el tipo de HLA se evalúa en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por evaluación de alta resolución de HLA-A, HLA-B, HLA-C para la clase I y HLA DRB1/DRB345, DQB1 y DPB1 para la clase II. Esta información permite la correlación de la respuesta inmune potencial de las células T a la cápside de AAV8 o al transgen del LDLR con un alelo de HLA específico, que ayuda a explicar la variabilidad individual en la intensidad y el tiempo de las respuestas de las células T.

6.8 Evaluación de los xantomas

Los exámenes físicos incluyen la identificación, el examen y la descripción de cualquier xantoma. Se determina la documentación de la ubicación y el tipo de xantoma, es decir, cutáneo, palpebral (ojo), tuberoso y/o tendinoso. Siempre que sea posible, reglas métricas o calibradores se usan para documentar el tamaño de los xantomas (extensiones más grandes y más pequeñas) durante el

examen físico. Si es posible, se toman fotografías digitales de los xantomas que son más extensos y fácilmente identificables con la colocación de una cinta métrica (cinta métrica con milímetros) al lado de la lesión.

7. EJEMPLO 2

Datos preclínicos

Se llevaron a cabo estudios no clínicos para estudiar los efectos de AAV8.TBG.hLDLR en modelos animales para HoHF e inmunidad humoral pre-existente. Se llevaron a cabo estudios de farmacología múltiples de una sola dosis en modelos animales pequeños y grandes que miden las disminuciones en el colesterol. Además, la regresión en la aterosclerosis se midió en el modelo de ratón LDLR^{-/-}-Apobec^{-/-} con doble expresión bloqueada de HoFH (ratón DKO), el cual es deficiente en el LDLR y Apobec1, desarrolla hipercolesterolemia severa debida a las elevaciones en la LDL que contiene apoB-100, incluso bajo una dieta con alimento, y desarrolla aterosclerosis extensa. Estos datos se usaron para determinar una dosis mínimamente efectiva y para justificar adecuadamente la selección de la dosis para estudios en humanos. Para caracterizar adicionalmente la dosis apropiada para estudios en humanos e identificar señales de seguridad potenciales, se llevaron a cabo estudios de toxicología en primates no humanos (NHP) y un modelo de ratón de HoFH.

7.1 Inmunidad humoral pre-existente: efecto sobre la transferencia de genes mediada por AAV al hígado

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la inmunidad humoral pre-existente a AAV sobre la transferencia de genes dirigida al hígado usando vectores encapsidados de AAV8 en macacos rhesus y cynomolgus. Veintiún macacos rhesus y cynomolgus se seleccionaron de una población más grande de animales que fueron pre-seleccionados para los niveles de inmunidad pre-existente contra AAV8. Los animales representaban una amplia distribución de edades, y todos eran machos. Estos estudios se centraron en animales con niveles bajos a indetectables de anticuerpos neutralizantes (NAb), mientras que incluían un número más limitado con títulos de NAb de AAV8 de hasta 1:160. Los animales fueron infundidos con 3×10^{12} GC/kg de vector de AAV8 que expresa proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) del promotor de globulina de unión a tiroxina (TBG) específico del hígado a través de la infusión de una vena periférica. Se realizó la necropsia de los animales 7 días después, y se evaluaron los tejidos para la expresión de la EGFP y la focalización de los genomas del vector de AAV8 del

hígado (figura 1). Los NAb preexistentes para AAV8 en los sueros de NHP se evaluaron usando una prueba de inhibición de la transducción *in vitro*, así como en el contexto de experimentos de transferencia pasiva, en los cuales los sueros de NHP fueron infundidos en ratones antes de y al momento de la administración del vector para evaluar el impacto de los NAb de AAV8 pre-existentes sobre la transferencia de genes dirigida por el hígado *in vivo* (Wang *et al.*, 2010 Molecular Therapy 18 (1): 126-134).

Los animales con niveles indetectables a bajos de NAb pre-existentes para AAV8 exhibieron un alto nivel de transducción en el hígado, como se evidencia por la detección de la EGFP por microscopía de fluorescencia (figura 1) y ELISA, así como cuantificación de ADN del vector en el hígado. La medida más útil de la transducción en términos de eficacia en la HoFH es por ciento de hepatocitos transducidos, que en ausencia de NAb pre-existente fue de 17% (escala de 4.4% a 40%). Esto está muy cerca de la eficiencia observada en los ratones a la misma dosis de vector. El título del umbral T de los NAb pre-existentes que influye significativamente sobre la transducción de las células hepáticas fue $\leq 1:5$ (es decir, títulos de 1:10 o mayor transducción sustancialmente reducida). La inhibición de la transducción del hígado mediada por anticuerpos se correlacionó directamente con los genomas de AAV disminuidos en el hígado. Los sueros humanos fueron examinados para detectar la evidencia de NAb pre-existentes para AAV8, y los resultados sugieren que aproximadamente 15% de los adultos tienen NAb para AAV8 que están en exceso de $\leq 1:5$. Asimismo, se mostró que los niveles más altos de NAb están asociados con un cambio en la biodistribución del vector, de modo que los NAb disminuyen la transferencia de genes al hígado mientras que incrementan la deposición del genoma del vector en el bazo, sin incrementar la transducción del bazo.

7.2 Efecto de AAV8.TBG.mLDLR sobre el colesterol en suero en un modelo de ratón de HoFH

Ratones DKO (machos de 6 a 12 semanas) fueron inyectados IV con AAV8.TBG.mLDLR y monitoreados para la corrección metabólica y la reversión de lesiones de aterosclerosis pre-existentes. Se evaluó también a los animales para determinar la toxicidad clínica general y las anormalidades de las transaminasas en suero. La versión del LDLR de ratón se usó para la administración del vector en el ratón DKO.

Los ratones que recibieron 10^{11} GC/ratón (5×10^{12} GC/kg) mostraron una normalización casi completa de la hipercolesterolemia que fue estable por 180 días (figura 2). Ninguna elevación en los niveles de ALT o la bioquímica hepática

anormal se observó por hasta 6 meses después de la inyección del vector a las dosis más altas en los roedores (Kassim *et al.*, 2010, PLoS One 5 (10): e1 3424).

7.3 Efecto de AAV8.TBG.mLDLR sobre las lesiones ateroscleróticas en un modelo de ratón de HoFH bajo una dieta alta en grasa

Dado que el suministro del LDLR mediado por AAV8 indujo disminución significativa del colesterol total, la expresión del mLDLR mediada por AAV8 se examinó en un estudio de prueba de concepto para determinar si tenía un efecto sobre las lesiones ateroscleróticas (Kassim *et al.*, 2010, PLoS One 5 (10): e1 3424). Tres grupos de ratones DKO machos fueron alimentados con una dieta alta en grasas para acelerar la progresión de la aterosclerosis. Después de dos meses, un grupo de ratones recibió una sola inyección IV de 5×10^{12} GC/kg de vector de AAV8.TBG.nLacZ control, un grupo recibió una sola inyección IV de 5×10^{12} GC/kg de vector de AAV8.TBG.mLDLR, mientras que un tercer grupo de no intervención fue sometido a la necropsia para la cuantificación de lesiones de aterosclerosis. Los ratones que recibieron los vectores fueron mantenidos con la dieta alta en grasas por otros 60 días, en cuyo momento fueron sometidos a la necropsia.

Los animales que recibieron el vector de AAV8.TBG.mLDLR mostraron una rápida disminución en el colesterol total de 1555 ± 343 mg/dl en la referencia inicial a 266 ± 78 mg/dl en el día 7 y hasta 67 ± 13 mg/dl alrededor del día 60 después del tratamiento. En contraste, los niveles de colesterol en plasma de los ratones tratados con AAV8.TBG.nLacZ permanecieron virtualmente sin cambios de 1566 ± 276 mg/dl en la referencia inicial a 1527 ± 67 mg/dl cuando se midieron 60 días después del vector. Todos los animales desarrollaron ligeros incrementos en las transaminasas en suero después de los dos meses bajo la dieta alta en grasas, las cuales se mantuvieron elevadas después del tratamiento con el vector de AAV8.TBG.nLacZ, pero disminuyeron tres veces hasta los niveles normales después del tratamiento con el vector de AAV8.TBG.mLDLR.

La evolución de lesiones ateroscleróticas pre-existentes se evaluó mediante dos métodos independientes. En el primer método, las aortas fueron abiertas del arco a la bifurcación ilíaca, y teñidas con rojo oleoso O (figura 3A); los análisis morfométricos cuantificaron el por ciento de la aorta teñida con rojo oleoso O a lo largo de toda la longitud de la aorta (figura 3B). El rojo oleoso O es un colorante diazoico lipocromo (colorante liposoluble) que se usa para la tinción de triglicéridos neutros y lípidos en secciones congeladas. La tinción de la aorta con este colorante permite la visualización de las placas cargadas de lípidos. Como se ve en la figura 3, dos meses bajo la dieta alta en grasas dieron como resultado aterosclerosis extensa que abarca 20% de la aorta, reflejando la enfermedad en la referencia inicial a la

hora del vector; este valor se incrementó hasta 33% durante un período adicional de dos meses después del tratamiento con el vector de AAV8.TBG.nLacZ, que representa una progresión adicional de 65% en la aterosclerosis. En contraste, el tratamiento con el vector de AAV8.TBG.mLDLR llevó a una regresión de la aterosclerosis en un 87% durante dos meses, de 20% de la aorta cubierta por la aterosclerosis en la referencia inicial a sólo 2.6% de la aorta cubierta por la aterosclerosis 60 días después de la administración del vector.

En el segundo método, el área total de la lesión se cuantificó en la raíz aórtica (figura 3C-3F). Este análisis reveló las mismas tendencias generales, con los ratones inyectados con AAV8.TBG.nLacZ mostrando una progresión de 44% durante 2 meses en comparación con los ratones en la referencia inicial, mientras que los ratones inyectados con AAV8.TBG.mLDLR demuestran una regresión de 64% en las lesiones en comparación con los ratones en la referencia inicial. En resumen, la expresión del LDLR a través de la inyección de AAV8.TBG.mLDLR indujo una notable reducción en el colesterol y regresión sustancial de la aterosclerosis durante dos meses, como se evaluó por dos métodos de cuantificación independientes en dos diferentes sitios dentro de la aorta.

7.4 Evaluación de la dosis efectiva mínima en un modelo de ratón de HoFH

Amplios estudios de las correlaciones entre fenotipos y genotipos en poblaciones con HoFH han demostrado que las diferencias en la LDL y el colesterol total de sólo 25-30%, se traducen en diferencias sustanciales en el resultado clínico (Bertolini *et al.*, 2013, *Atherosclerosis* 227 (2): 342-348 ; Kolansky *et al.*, 2008, *Am J Cardiol* 102 (11): 1438-1443; Moorjani *et al.*, 1993, *The Lancet* 341 (8856): 1303-1306). Además, el tratamiento de reducción de lípidos asociado con la reducción de la LDL-C hasta menos de 30%, se traduce en eventos cardiovasculares retardados y supervivencia prolongada en los pacientes con HoFH (Raal *et al.*, 2011, *Circulation* 124 (20): 2202-2207). Recientemente, la FDA aprobó el fármaco mipomersen para el tratamiento de la HoFH en el cual el criterio de valoración primario fue una reducción de la LDL-C de 20 a 25% a partir de la referencia inicial (Raal *et al.*, 2010, *Lancet* 375 (9719): 998-1006).

En este contexto, la dosis mínima efectiva (MED) en los estudios del ratón tratado con terapia génica discutidos más adelante se definió como la dosis más baja de vector que lleva a una reducción estadísticamente significativa y estable de colesterol total en el suero que es por lo menos 30% menor que en la referencia inicial. La MED se ha evaluado en un número de diferentes estudios, y se provee a continuación una breve descripción de cada experimento.

7.4.1. Estudio de escala de la dosis de AAV8.TBG.mLDLR en ratones

DKO

Se llevó a cabo un estudio de prueba de concepto de la escala de la dosis de AAV8.TBG.mLDLR y AAV8.TBG.hLDLR en ratones DKO para identificar las dosis adecuadas para más estudio. En estos estudios, ratones DKO machos fueron inyectados IV con diferentes dosis de AAV8.TBG.mLDLR que varían de 1.5 a 500×10^{11} GC/kg y monitoreados para reducciones en el colesterol en plasma (Kassim *et al.*, 2010, PLoS One 5 (10): e1 3424). Las dosis de GC usadas en estos experimentos de investigación (1.5 a 500×10^{11}) se basaron en el título de la PCR cuantitativa (qPCR). Se observaron reducciones estadísticamente significativas de colesterol en plasma de hasta 30% en el día 21 a una dosis de AAV8.TBG.mLDLR de 1.5×10^{11} GC/kg, con mayores reducciones logradas en proporción a las mayores dosis de vector (Kassim *et al.*, 2010, PLoS One 5 (10): e1 3424). Los análisis de los tejidos del hígado cosechados después de la corrección metabólica revelaron niveles del transgen del LDLR y proteína de los ratones en proporción a la dosis de vector. De esta manera, se observó una correlación de respuesta a la dosis.

7.4.2. Estudio de escala de la dosis de AAV8.TBG.hLDLR en ratones

DKO y LAHB

Estudios de prueba de concepto similares en el ratón DKO se realizaron con un vector que contenía el gen del receptor de la LDL humana (hLDLR) en lugar del gen del LDLR de ratón. Los resultados con el vector del hLDLR fueron muy similares a los observados con el mLDLR porque la dosis de vector fue proporcional a la expresión del transgen y la deposición de genomas del vector en el hígado (Kassim *et al.*, 2013, Hum Gene Ther 24 (1): 19-26). La mayor diferencia fue en su eficacia - el vector del LDLR humano fue menos potente en este modelo. Se lograron reducciones de colesterol cercanas a por lo menos 30% a 5×10^{12} GC/kg y 5×10^{11} GC/kg (dosis basadas en el título de la qPCR), aunque sólo se logró significación estadística a la dosis más alta.

La eficacia reducida observada fue atribuible a la disminución de la afinidad del LDLR humano para la ApoB de ratón. Para evitar este problema, se repitieron los estudios usando el modelo de ratón LAHB que expresa la ApoB100 humana y, por lo tanto, más auténticamente representa la interacción de la ApoB100 humana con el LDLR humano relevante para estudios en humanos. Ratones machos de ambas cepas (DKO vs. LAHB) recibieron una inyección, en la vena de la cola, de una de tres dosis del vector de AAV8.TBG.hLDLR (0.5×10^{11} GC/kg, 1.5×10^{11} GC/kg y 5.0×10^{11} GC/kg con base en el título de la qPCR). De los animales de cada

grupo se extrajo sangre en el día 0 (antes de la administración del vector), el día 7 y el día 21, y se realizó la evaluación del nivel de colesterol en suero. El LDLR humano fue mucho más efectivo en el ratón LAHB en comparación con el mLDLR en el ratón DKO: se logró una reducción de 30% del colesterol en suero a una dosis de 1.5×10^{11} GC/kg, la cual es la misma eficacia lograda con estudios previos de la construcción del LDLR de ratón en los animales DKO (Kassim *et al.*, 2013, Hum Gene Ther 24 (1): 19-26).

7.4.3. Estudio de farmacología no clínica/toxicología de AAV8.TBG.mLDLR y AAV8.TBG.hLDLR en un modelo de ratón de HoFH

Ratones DKO machos y hembras ($n = 280$, 140 machos y 140 hembras) de 6 a 22 semanas recibieron una inyección, en la vena de la cola, de una de tres dosis de vector de AAV8.TBG.mLDLR (7.5×10^{11} GC/kg, 7.5×10^{12} GC/kg, 6.0×10^{13} GC/kg) o una dosis del vector de terapia génica previsto AAV8.TBG.hLDLR (6.0×10^{13} GC/kg). Los animales fueron dosificados con base en las copias del genoma (GC) por kilogramo de peso corporal usando el método de titulación de oqPCR, el cual se describe en la presente en la sección 8.4.1. Un grupo adicional de animales recibió PBS como un control de vehículo. Los animales de cada grupo fueron sacrificados en el día 3, día 14, día 90 y día 180, y se colectó sangre para la evaluación de los niveles de colesterol en suero (figura 4).

Se observó una reducción rápida y significativa de colesterol en todos los puntos de tiempo de la necropsia en todos los grupos de ratones tratados. Esta reducción pareció ser menor en las hembras que en los machos a bajas dosis de vector en los puntos de tiempo primarios, aunque esta diferencia disminuyó con el tiempo y, finalmente, no hubo diferencia detectable alguna entre los sexos. Cada grupo demostró una reducción estadísticamente significativa en el colesterol en suero de por lo menos 30% respecto a los controles de PBS en el mismo punto de tiempo de la necropsia. Por lo tanto, la determinación de la MED con base en este estudio es $\leq 7.5 \times 10^{11}$ GC/kg.

7.4.4. Estudio de eficacia de AAV8.TBG.hLDLR en un modelo de ratón de hipercolesterolemia familiar homocigótica

A ratones DKO machos ($n = 40$) de 12 a 16 semanas se les administró por vía IV una de cuatro dosis (1.5×10^{11} GC/kg, 5.0×10^{11} GC/kg, 1.5×10^{12} GC/kg, 5.0×10^{12} GC/kg) de AAV8.TBG.hLDLR (dosis basadas en el método de titulación de la oqPCR). Los animales fueron sangrados en el día 0 (antes de la administración del vector), día 7 y día 30, y se hizo la evaluación de colesterol en suero (figura 5). Se observó una reducción rápida y significativa del colesterol en los días 7 y 30 en

los grupos de ratones tratados con $\geq 5.0 \times 10^{11}$ GC/kg. La determinación de la MED con base en este estudio está entre 1.5×10^{11} GC/kg y 5.0×10^{11} GC/kg.

7.5. Efectos de AAV8.TBG.rhLDLR en macacos rhesus LDLR+/- bajo una dieta alta en grasas

Se llevaron a cabo estudios diseñados para evaluar la transferencia de genes de AAV8-LDLR en macacos con FH. Tras la administración de 10^{13} GC/kg de AAV8.TBG.rhAFP (un vector control; dosis basada en el método de titulación de la qPCR) en macacos rhesus de tipo silvestre alimentados con grasa o provistos con alimento, no se observaron elevaciones en los valores de aspartato aminotransferasa (AST) o alanina aminotransferasa (ALT). Esto sugiere que la cápside de AAV8 misma no es responsable de desencadenar un proceso hepático inflamatorio o perjudicial.

7.6. Estudio piloto de la biodistribución de AAV8.TBG.hLDLR en un modelo de ratón de HoFH

A fin de evaluar las propiedades farmacodinámicas y de seguridad de la terapia génica para la HoFH, se llevaron a cabo estudios de biodistribución piloto (BD) en ratones DKO. Estos estudios examinaron la distribución y persistencia del vector en cinco ratones DKO hembras a las que se les administraron sistémicamente 5×10^{12} GC/kg (dosis basada en el método de titulación de la qPCR) de vector de AAV8.TBG.hLDLR a través de una de dos vías: 1) inyección IV en la vena de la cola, o 2) inyección intra-portal. En dos puntos de tiempo diferentes (día 3 y día 28), un panel de tejidos se cosechó, y se extrajo el ADN celular total de los tejidos cosechados. En estos estudios piloto, las vías IV e intra-portal dieron como resultado un perfil de BD comparable, apoyando la razón fundamental para infundir el vector de terapia génica en pacientes y animales a través de la vena periférica.

7.7. Toxicología

A fin de evaluar la toxicidad potencial de la terapia génica para la HoFH, se realizaron estudios de farmacología/toxicología en ratones DKO (un modelo de ratón de HoFH) y macacos rhesus LDLR+/- de tipo silvestre. Los estudios incluyen un examen de la función de la expresión del transgen del LDLR en la toxicidad asociada con el vector en macacos rhesus LDLR+/- y de tipo silvestre provistos con alimento, un estudio de farmacología/toxicología de AAV8.TBG.mLDLR y AAV8.TBG.hLDLR en un modelo de ratón de HoFH, y un examen de la biodistribución no clínica de AAV8.TBG.hLDLR en un modelo de ratón de HoFH. Estos estudios se describen en detalle a continuación.

7.8. Estudio no clínico que examina la función de la expresión del transgen del LDLR en la toxicidad asociada con el vector en macacos rhesus LDLR+/- y de tipo silvestre provistos con alimento

A cuatro macacos rhesus de tipo silvestre y cuatro macacos rhesus LDLR+/- se les administraron IV 1.25×10^{13} GC/kg de AAV8.TBG.hLDLR (dosis basada en el método de titulación de la oqPCR). Los primates no humanos (NHP) fueron monitoreados en cuanto a la post-administración del vector por hasta un año. En cuatro animales (dos de tipo silvestre y dos LDLR+/-) se realizó la necropsia en el día 28 post-administración del vector para evaluar la toxicidad aguda asociada con el vector y la distribución del vector, y en cuatro animales (dos de tipo silvestre y dos LDLR+/-) se realizó la necropsia en el día 364/365 post-administración del vector para evaluar la patología a largo plazo asociada con el vector y la distribución del vector. Cada grupo de macacos LDLR+/- y de tipo silvestre consistió de dos machos y dos hembras.

Los animales toleraron bien la infusión del vector sin secuelas clínicas a corto plazo o a largo plazo. Los estudios de biodistribución demostraron focalización de alto nivel y estable del hígado con mucho menos, pero todavía detectable, distribución extrahepática, la cual disminuyó con el tiempo. Estos datos sugirieron que el órgano objetivo para la eficacia, el hígado, es también la fuente más probable de toxicidad potencial. Una revisión detallada de los tejidos cosechados en la necropsia llevada a cabo 28 y 364/365 días post-administración del vector, reveló algunos hallazgos mínimos a leves en el hígado y cierta evidencia de aterosclerosis en los macacos LDLR+/- . La naturaleza de la patología del hígado y el hecho de que se observó una patología similar en uno de los dos animales de tipo silvestre no tratados, le sugirieron al patólogo que no estaban relacionados con el artículo de prueba.

Un animal tuvo elevaciones persistentes en la alanina aminotransferasa (ALT) antes de la administración del vector, las cuales continuaron después de la administración del vector a niveles que variaron entre 58 y 169 U/L. Los animales restantes no demostraron elevaciones en las transaminasas, o sólo incrementos transitorios y de bajo nivel en la aspartato aminotransferasa (AST) y ALT, nunca excediendo de 103 U/L. Las anomalías más consistentes se encontraron después de la inyección del vector, lo que sugiere que estuvieron relacionadas con el artículo de prueba. La activación de las células T al LDLR humano o a la cápside de AAV8 se evaluó para determinar la correlación con los incrementos de AST/ALT. La figura 6 presenta datos de la ELISPOT de la cápside de AAV y los niveles de AST en suero en tres animales seleccionados que demostraron hallazgos relevantes.

Sólo un animal mostró una correlación en la cual un incremento en la AST hasta 103 U/L correspondió a la aparición de células T contra la cápside (figura 6, animal 090-0263); la respuesta de las células T a la cápside persistió, mientras que la AST regresó inmediatamente a la escala normal.

El análisis de las células T derivadas de tejido para determinar la presencia de células T específicas de la cápside y el transgen, mostró que las células T derivadas del hígado se volvieron sensibles a la cápside de ambos genotipos (tipo silvestre y LDLR+/-) por el punto de tiempo tardío, mientras que células T para el LDLR humano fueron detectadas en los animales LDLR+/- en este punto de tiempo tardío. Esto sugiere que las PBMCs no son un reflejo del compartimiento de células T en el tejido objetivo. El tejido del hígado cosechado a los días 28 y 364/365 se analizó para la expresión del transgen mediante RT-PCR, y pareció ser afectado por las anomalías en la patología clínica o la aparición de células T.

Ni los animales LDLR+/- ni de tipo silvestre desarrollaron hipercolesterolemia con la provisión de alimento. No se observaron toxicidades limitativas de la dosis (DLT) a una dosis de 1.25×10^{13} GC/kg (con base en la oqPCR), lo que implica que la dosis máxima tolerada (MTD) sería igual a o mayor que esta dosis. Se observaron elevaciones relacionadas con el artículo de prueba en las transaminasas, las cuales fueron bajas y transitorias, pero sin embargo presentes. Por consiguiente, el nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) es menor que la alta dosis individual evaluada en el ejemplo 1 en la presente.

7.9. Estudio no clínico de farmacología/toxicología de AAV8.TBG.rnLDLR y AAV8.TBG.hLDLR en un modelo de ratón de HoFH

Este estudio se llevó a cabo en los ratones DKO porque el uso de esta cepa permitiría: 1) la evaluación de la eficacia de la prueba de concepto en paralelo con la toxicidad, y 2) la evaluación de la toxicidad asociada con el vector en el ambiente de cualquier patología asociada con el defecto en el LDLR y la dislipidemia asociada y sus secuelas, tales como esteatosis.

El estudio se diseñó para poner a prueba AAV8.TBG.hLDLR a la dosis más alta, la cual es 8 veces mayor que la dosis más alta para la administración a sujetos humanos con HoFH, como se expone en el ejemplo 1. Una versión del vector que expresa el LDLR de murino se puso a prueba a esta alta dosis, así como dos dosis más bajas, para proveer una evaluación del efecto de la dosis sobre los parámetros de toxicidad, así como la reducción en el colesterol. El experimento de respuesta a la dosis se realizó con el vector que expresa el LDLR de murino que

refleja más la toxicidad y eficacia que se observarían en humanos usando el vector del LDLR humano.

En este estudio, a ratones DKO machos y hembras de 6 a 22 semanas se les administró una de las dosis de AAV8.TBG.mLDLR (7.5×10^{11} GC/kg, 7.5×10^{12} GC/kg y 6.0×10^{13} GC/kg) o 6.0×10^{13} GC/kg del vector (AAV8.TBG.hLDLR) (dosis basada en el método de titulación de la oqPCR). Se hizo la necropsia de los animales en el día 3, día 14, día 90 y día 180 post-administración del vector; estos tiempos se seleccionaron para capturar el perfil de expresión del vector del artículo de prueba, así como la toxicidad aguda y crónica. La eficacia de la expresión del transgen se monitoreó por la medición de los niveles de colesterol en suero. Se evaluó a los animales para determinar la patología clínica amplia y las reacciones inmunes al vector (citocinas, NAbs para la cápside de AAV8 y las respuestas de las células T contra la cápside y el transgen), y los tejidos se cosecharon para un examen histopatológico integral al momento de la necropsia.

Los hallazgos de toxicología claves de este estudio, son los siguientes:

- No se observaron secuelas clínicas en los grupos tratados
- Patología clínica:

- Transaminasas: las anormalidades se limitaron a las elevaciones de las pruebas de la función hepática AST y ALT que variaron de 1-4x ULN, y se encontraron principalmente en el día 90 de todas las dosis de vector del LDLR murino. No hubo elevación de las transaminasas en el grupo al que se le administró una alta dosis del vector del LDLR humano, salvo por $<2x$ ULN de ALT en algunos animales machos. Las anormalidades asociadas con el vector de ratón fueron leves y no dependientes de la dosis y, por lo tanto, no se cree que estén relacionadas con el vector. Esencialmente no hubo hallazgo alguno asociado con la alta dosis del vector humano. No hubo evidencia de toxicidad relacionada con el tratamiento con base en estos hallazgos, lo que significa que ningún nivel de efecto adverso (NOAEL), basado en estos criterios, es de 6.0×10^{13} GC/kg.

• Patología: No hubo hallazgos patológicos generales. La histopatología fue limitada a hallazgos mínimos o leves en el hígado, como sigue:

- Los animales a los que se les administró PBS tuvieron evidencia de anormalidades mínimas y/o leves de acuerdo con todos los criterios evaluados. En la evaluación de la patología relacionada con el tratamiento, los presentes inventores se centraron en cualquier hallazgo clasificado como leve que estuviera por encima del encontrado en los animales inyectados con PBS.

- Se observó hiperplasia leve del conducto biliar e hiperplasia sinusoidal de las células en los ratones hembras bajo alta dosis a los que se les

administraron los vectores del LDLR humano y de ratón. Esto podría representar efectos relacionados con el vector que se observan sólo a la alta dosis.

- La hipertrofia centrilobular fue leve, sólo en los ratones machos, y no a las altas dosis de vector, argumentando que no está relacionada con el vector.

- Se encontró necrosis mínima en 1/7 machos y 3/7 hembras en el día 180 en el vector del LDLR humano de alta dosis.

- Con base en el hallazgo de hiperplasia sinusoidal y leve de los conductos biliares a la alta dosis de vector, y algunos ejemplos de necrosis mínima en el vector del LDLR humano de alta dosis, el NOAEL basado en estos criterios está entre 7.5×10^{12} GC/kg y 6.0×10^{13} GC/kg.

- Otros hallazgos: Los animales desarrollaron un incremento en los NAbs para AAV8 y evidencia de respuesta muy baja de las células T con base en una ELISPOT de IFN-gamma a la cápside y el LDLR después de la administración de la alta dosis del vector del LDLR humano. Hubo poca evidencia de una respuesta inflamatoria aguda con base en el análisis del suero 3 y 14 días después del vector; algunas citocinas mostraron elevaciones modestas y transitorias, aunque no hubo incremento alguno en la IL-6.

Un hallazgo notable fue que la toxicidad no fue peor en los ratones DKO tratados con el vector del LDLR de ratón que con el vector del LDLR humano, lo cual podría haber sido el caso si el LDLR humano fuese más inmunógeno en términos de las células T que el transgen de ratón. Los estudios de ELISPOT mostraron cierta activación de las células T específicas del LDLR en los ratones a los que se les administró el vector de alta dosis que expresa el transgen humano, aunque fue baja y en un número limitado de animales que soportan los datos de toxicidad, lo cual sugirió que este mecanismo de respuesta del hospedero contribuiría improbablemente a problemas de seguridad.

En conclusión, no hubo toxicidades limitadas por la dosis, es decir, la dosis máxima tolerada fue mayor que la dosis más alta puesta a prueba, la cual fue de 6.0×10^{13} GC/kg. Con base en los hallazgos leves y reversibles en la patología del hígado en la dosis más alta, el NOAEL está en algún punto entre 6.0×10^{13} GC/kg, en donde en el hígado se observó patología reversible leve, hasta 7.5×10^{12} GC/kg, en donde no había indicación clara alguna de hallazgos relacionados con el vector.

7.10. Biodistribución no clínica de AAV8.TBG.hLDLR en un modelo de ratón de HoFH

A ratones DKO machos y hembras de 6 a 22 semanas se les administraron IV 7.5×10^{12} GC/kg (dosis medida por el método de titulación de la oqPCR) de AAV8.TBG.hLDLR, la dosis más alta para el tratamiento de sujetos

humanos en el ejemplo 1F. Se realizó la necropsia de los animales para la evaluación de la biodistribución en el día 3, día 14, día 90 y día 180 post-administración del vector. Además de la sangre, se cosecharon 20 órganos. La distribución de los genomas del vector en los órganos se evaluó mediante el análisis cuantitativo de la PCR sensible del ADN genómico total cosechado. Una muestra de cada tejido incluyó una espiga de ADN control, que incluye una cantidad conocida de las secuencias del vector, a fin de evaluar la suficiencia de la reacción de la prueba de PCR.

El número de GC del vector en el hígado fue sustancialmente mayor en el hígado que en otros órganos/tejidos, lo cual es consistente con las altas propiedades hepatotrópicas de la cápside de AAV8. Por ejemplo, las copias del genoma del vector en el hígado fueron por lo menos 100 veces mayores que las encontradas en cualquier otro tejido en el día 90. No hubo diferencia significativa alguna entre los ratones machos o hembras en los primeros tres puntos de tiempo. El número GC disminuyó con el tiempo en el hígado hasta el día 90, en donde entonces se estabilizó. Se observó una tendencia similar de disminución en todos los tejidos, pero la disminución en el número de copias del vector fue más rápida en los tejidos con mayor tasa de cambio de células. Niveles bajos pero detectables de copias del genoma del vector estuvieron presentes en las gónadas de ambos sexos y el cerebro.

La biodistribución de AAV8.TBG.hLDLR en los ratones DKO fue consistente con los resultados publicados con AAV8. El hígado es el objetivo primario de la transferencia de genes después de la infusión IV, y las copias del genoma en el hígado no disminuyen significativamente con el tiempo. Otros órganos son focalizados para el suministro del vector, aunque los niveles de la transferencia de genes en estos tejidos no hepáticos son sustancialmente menores y disminuyen con el tiempo. Por lo tanto, los datos presentados en la presente sugieren que el sistema de órganos primario que será evaluado es el hígado.

7.1 1. Conclusiones de los estudios no clínicos de seguridad

Los estudios de los macacos rhesus y el ratón DKO confirmaron que el vector a alta dosis está asociado con la patología del hígado de bajo nivel, transitoria y asintomática evidente por las elevaciones transitorias de las transaminasas en los NHP, y en ratones por la aparición transitoria de hipertrofia leve sinusoidal y de los conductos biliares. No se observó alguna otra toxicidad que se sintiera se debe al vector.

No hubo DLT observadas a dosis tan altas como 1.25×10^{13} GC/kg en los macacos y 6×10^{13} GC/kg en los ratones DKO. La determinación del NOAEL se

centra principalmente en la toxicidad del hígado como se refleja en las elevaciones de las transaminasas en los macacos y la histopatología en los ratones DKO. Esto se tradujo en un NOAEL de menos de 1.25×10^{13} GC/kg en los macacos y menos de 6×10^{13} GC/kg pero mayor de 7.5×10^{12} GC/kg en los ratones DKO. Las dosis se basaron en el método de titulación de la oqPCR.

7.12. Evaluación general de los datos no clínicos para sustentar el tratamiento de humanos

Los hallazgos clave que surgieron de los estudios farmacológicos y toxicológicos que han informado la selección de la dosis y el diseño para el estudio clínico, son los siguientes:

- Dosis mínima efectiva (MED): La MED se definió en estudios no clínicos como una dosis de GC/kg que dio como resultado una reducción de 30% en el colesterol en suero. Dos estudios no clínicos que permiten IND establecieron que la MED está entre 1.5 y 5.0×10^{11} GC/kg. El estudio de farmacología/toxicología del ratón demostró una reducción estadísticamente significativa en el colesterol en suero de por lo menos 30% respecto a los controles de PBS, lo que permite la estimación de una MED $\leq 7.5 \times 10^{11}$ GC/kg. La relación de la respuesta a la dosis observada permitió que la determinación de la MED esté entre 1.5 y 5.0×10^{11} GC/kg, según se determina mediante oqPCR.

- Dosis máxima tolerada (MTD): La MTD se definió en estudios no clínicos como la dosis de GC/kg que no resultó en una toxicidad limitativa de la dosis (DLT). No se observaron DLT en los estudios de toxicología a las dosis más altas puestas a prueba, las cuales fueron de 6.0×10^{13} GC/kg en los ratones DKO y de 1.25×10^{13} GC/kg en los macacos, según lo determinado por la oqPCR. Los resultados de los presentes inventores sugirieron que la MTD real es mayor que estas dosis.

- Nivel de evento adverso no observado (NOAEL): Se determinó que este es de 7.5×10^{12} GC/kg en los ratones DKO. Esto se basó en hallazgos histopatológicos mínimos a leves, predominantemente en el hígado (hiperplasia sinusoidal y de los conductos biliares, necrosis mínima), observados a mayores dosis del transgen del LDLR humano (hLDLR). Sólo una dosis fue puesta a prueba en macacos; sin embargo, la toxicidad a 1.25×10^{13} GC/kg fue leve, incluyendo incrementos transitorios y de bajo nivel en AST y ALT, lo que sugiere que el NOAEL verdadero se lograría a una dosis menor que la dosis puesta a prueba.

Con base en estos datos, se llegó a dos dosis: una sola dosis de 2.5×10^{12} GC/kg o una sola dosis de 7.5×10^{12} GC/kg (dosis basadas en el método de titulación de la oqPCR). La dosis más alta propuesta por poner a prueba en la clínica

es menor que la dosis más alta puesta a prueba en el estudio de toxicología en macacos, y 8 veces menor que la dosis más alta puesta a prueba en los ratones DKO - ninguna de las cuales se consideró era la MTD. Se propone una dosis que sea por lo menos 5 veces mayor que la MED, lo que sugiere que los pacientes que participan en el grupo de baja dosis potencialmente podrían obtener algún beneficio. La dosis más baja es también aproximadamente 3 veces menor que la dosis del NOAEL en los ratones DKO, y 5 veces menor que la dosis puesta a prueba en los macacos.

8. EJEMPLO 3

Fabricación de AAV8.TBG.hLDLR

El vector de AAV8.TBG.hLDLR consiste del ingrediente activo del vector de AAV y un regulador de pH de formulación. El componente del vector de AAV externo es una cápside icosaédrica T = 1 de serotipo 8, que consiste de 60 copias de tres proteínas virales de AAV, VP1, VP2 y VP3, a una relación de 1:1:18. La cápside contiene un genoma de vector de AAV recombinante (rAAV) de ADN de cadena sencilla (figura 7). El genoma contiene un transgen de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) humano flanqueado por las dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. Un intensificador, promotor, intrón, secuencia de codificación del LDLR humano y señal de poliadenilación (poli A), comprenden el transgen del LDLR humano. Las ITR son los elementos genéticos responsables de la replicación y el empaquetado del genoma durante la producción del vector, y son los únicos elementos cis virales necesarios para generar el rAAV. La expresión de la secuencia de codificación del LDLR humano es dirigida desde el promotor de globulina de unión a tiroxina (TBG) específico de hepatocitos. Dos copias del elemento intensificador de alfa 1 microglobulina/bikunina preceden al promotor de TBG para estimular la actividad del promotor. Un intrón quimérico está presente para intensificar adicionalmente la expresión, y una señal de poli A de beta globina de conejo se incluye para mediar la terminación de los transcritos de ARNm del LDLR humano. El vector se suministra como una suspensión de vector de AAV8.TBG.hLDLR en regulador de pH de formulación. El regulador de pH de formulación es NaCl 180 mM, fosfato de sodio 10 mM, poloxámero 188 a 0.001%, pH 7.3.

Los detalles de la fabricación del vector y la caracterización de los vectores, se describen en las siguientes secciones.

8.1. Plásmidos usados para producir AAV8.TBG.hLDLR

Los plásmidos usados para la producción de AAV8.TBG.hLDLR, son los siguientes:

8.1.1 Plásmido cis (construcción de expresión del genoma del vector):

pENN.AAV.TBG.hLDLR.RBG.KanR que contiene el cassette de expresión del LDLR humano (figura 8). Este plásmido codifica para el genoma del vector de rAAV. La señal de poli A para el cassette de expresión es del gen de β globina de conejo. Dos copias del elemento intensificador de alfa 1 microglobulina/bikunina preceden al promotor de TBG.

Para generar el plásmido cis usado para la producción de AAV8.TBG.hLDLR, el ADNc del LDLR humano fue clonado en una construcción que contiene la ITR de AAV2, pENN.AAV.TBG.PI, para crear pENN.AAV.TBG.hLDLR.RBG. La estructura de base del plásmido en pENN.AAV.TBG.PI fue originalmente de pZac2.1, un plásmido basado en pKSS. El gen de resistencia a ampicilina en pENN.AAV.TBG.hLDLR.RBG fue separado y reemplazado con el gen de kanamicina para crear pENN.AAV.TBG.hLDLR.RBG.KanR. La expresión del ADNc del LDLR humano es dirigida desde el promotor de TBG con un intrón quimérico (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). La señal de poli A para el cassette de expresión es del gen de β globina de conejo. Dos copias del elemento intensificador de alfa 1 microglobulina/bikunina preceden al promotor de TBG.

Descripción de los elementos de secuencia

1. Repeticiones terminales invertidas (ITR): Las ITR de AAV (GenBank # NC001401) son secuencias que son idénticas en ambos extremos, pero se encuentran en orientación opuesta. La función de las secuencias de ITR de AAV2 como el origen de la replicación del ADN del vector y la señal de empaquetado para el genoma del vector, cuando el AAV y el auxiliar de adenovirus (ad) funcionan, se proveen en trans. Como tales, las secuencias de ITR representan las únicas secuencias que actúan en cis necesarias para la replicación y el empaquetado del genoma del vector.

2. Intensificador de alfa 1 microglobulina/bikunina humano (2 copias; 0.1 Kb); GenBank # X67082). Este elemento intensificador específico del hígado sirve para dar especificidad por el hígado e intensificar la expresión del promotor de TBG.

3. Promotor de globulina de unión a tiroxina (TBG) humano (0.46 Kb; GenBank # L13470) Este promotor específico de hepatocitos dirige la expresión de la secuencia de codificación del LDLR humano.

4. ADNc del LDLR humano (2.58 Kb; GenBank # NM000527, CDS completa). El ADNc del LDLR humano codifica para un receptor de lipoproteína de baja densidad de 860 aminoácidos con un peso molecular predicho de 95 kD y un peso molecular aparente de 130 kD por SDS-PAGE.

5. Intrón quimérico (0.13 Kb; GenBank # U47121; Promega Corporation, Madison, Wisconsin). El intrón quimérico consiste de un sitio donador 5' del primer intrón del gen de β -globina humano y la rama y sitio aceptor 3' del intrón localizado entre la secuencia guía y el cuerpo de una región variable de cadena pesada del gen de inmunoglobulina. Se ha mostrado que la presencia de un intrón en un cassette de expresión facilita el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma, intensificando de esta manera la acumulación del nivel estable de ARNm para la traducción. Esta es una característica común en vectores de genes destinados para mediar los niveles incrementados de la expresión génica.

6. Señal de poliadenilación de beta-globina de conejo: (0.13 Kb; GenBank # V00882.1). La señal de poliadenilación de beta-globina de conejo provee secuencias cis para la poliadenilación eficiente del ARNm del anticuerpo. Este elemento funciona como una señal para la terminación de la transcripción, un evento de escisión específico en el extremo 3' del transcrito naciente seguido de la adición de una cola de poliadenilo larga.

8.1.2 Plásmido trans (construcción de empaado): pAAV2/8(Kan), que contiene el gen *rep* de AAV2 y el gen *cap* de AAV8 (figura 9)

El plásmido trans de AAV8 pAAV2/8(Kan) expresa el gen de replicasa (*rep*) de AAV2 y el gen de la cápside (*cap*) de AAV8 que codifica para las proteínas del virión, VP1, VP2 y VP3. Las secuencias de genes de la cápside de AAV8 fueron originalmente aisladas de ADN del corazón de un mono rhesus (acceso del GenBank AF513852). Para crear las construcciones de empaado quiméricas, el plásmido p5E18, que contiene los genes *rep* y *cap* de AAV2, fue digerido con *Xba*I y *Xho*I para remover el gen *cap* de AAV2. El gen *cap* de AAV2 fue reemplazado entonces con un fragmento de PCR *Spe*I/*Xho*I de 2.27 Kb del gen *cap* de AAV8 para crear el plásmido p5E18VD2/8 (figura 9A). El promotor p5 de AAV, el cual normalmente dirige la expresión de *rep*, es reubicado en esta construcción del extremo 5' del gen *rep* al extremo 3' del gen *cap*. Esta disposición sirve para subregular la expresión de *rep* a fin de incrementar el rendimiento de los vectores. La estructura de base del plásmido en p5E18 es de pBluescript KS. Como un paso final, el gen de resistencia a ampicilina fue reemplazado por el gen de resistencia a kanamicina para crear pAAV2/8(Kan) (figura 9B). El plásmido trans de pAAV2/8(Kan) entero ha sido verificado por secuenciación directa.

8.1.3 Plásmido auxiliar de adenovirus: pAd Δ F6(Kan)

El plásmido pAd Δ F6(Kan) es de 15.7 Kb en tamaño, y contiene regiones del genoma adenoviral que son importantes para la replicación de AAV, a saber, E2A, E4 y ARN de VA. pAd Δ F6(Kan) no codifica para replicación adenoviral adicional alguna o genes estructurales, y no contiene elementos cis, tales como las ITR adenovirales, que son necesarias para la replicación; por lo tanto, no se espera que adenovirus infeccioso alguno sea generado. Las funciones génicas esenciales E1 adenovirales son provistas por las células HEK293 en las cuales se producen los vectores de rAAV. pAd Δ F6(Kan) se derivó de un clon molecular E1, E3 deletado de Ad5 (pBHG10, un plásmido basado en pBR322). Las deleciones fueron introducidas en el ADN de Ad5 para remover las regiones de codificación adenovirales innecesarias y reducir la cantidad de ADN adenoviral de 32 Kb a 12 Kb en el plásmido auxiliar resultante. Finalmente, el gen de resistencia a ampicilina fue reemplazado por el gen de resistencia a kanamicina para crear pAd Δ F6(Kan) (figura 10). La secuenciación del plásmido de ADN fue realizada por Qiagen Sequencing Services, Alemania, y reveló 100% de homología entre la secuencia de referencia para pAdDeltaF6(Kan) y los siguientes elementos adenovirales: p1707FH-Q: E4 ORF6 3.69-2.81 Kb; proteína de unión a ADN de E2A de 11.8-10.2 Kb; región de ARN de VA de 12.4-13.4 Kb.

Cada uno de los plásmidos cis, trans y auxiliares descritos anteriormente contiene un cassette de resistencia a kanamicina; por lo tanto, no se usan en su producción antibióticos de beta-lactama.

8.1.4 Fabricación del plásmido

Todos los plásmidos usados para la producción de vectores fueron producidos por Puresyn Inc. (Malvern, PA). Todos los medios de crecimiento usados en el procedimiento están libres de animales. Todos los componentes usados en el procedimiento, incluyendo matraces de fermentación, contenedores, membranas, resina, columnas, tubos y cualquier componente que entre en contacto con el plásmido se dedican a un sólo plásmido, y están certificados libres de BSE. No existen componentes compartidos, y se usan desechables cuando sea apropiado.

8.2. Bancos de células

Se produjo el vector AAV8.TBG.hLDLR de un banco de células de trabajo HEK293, el cual se derivó de un banco de células maestro completamente caracterizado. Los detalles de fabricación y de prueba de ambos bancos de células aparecen a continuación.

8.2.1 Banco de células maestro de HEK293

El banco de células maestro (MCB) de HEK293 es un derivado de células primarias de riñón embrionario humano (HEK) 293. La línea de células HEK293 es una línea permanente transformada por ADN de adenovirus tipo 5 (Ad5) humano sometido a esfuerzo cortante (Graham *et al.*, 1977, Journal of General Virology 36 (1): 59-72). El MCB de HEK293 ha sido puesto a prueba extensamente para la contaminación microbiana y viral. El MCB de HEK293 es actualmente almacenado en nitrógeno líquido. Se realizaron pruebas adicionales en el MCB de HEK293 para demostrar la ausencia de patógenos específicos de origen humano, simiano, bovino y porcino. El origen humano del MCB de HEK293 se demostró por el análisis de isoenzimas.

Se llevaron a cabo también pruebas de tumorigenicidad en el MCB de HEK293 evaluando la formación de tumores en ratones atímicos desnudos (nu/nu) después de la inyección subcutánea de la suspensión de células. En este estudio, se diagnosticó fibrosarcoma en el sitio de la inyección en diez de diez ratones control positivos, y se diagnosticó carcinoma en el sitio de la inyección en diez de diez ratones del artículo de prueba. No se diagnosticaron neoplasmas en ratón control negativo alguno. El MCB de HEK293 L/N 3006-105679 se puso a prueba también para determinar la presencia de circovirus porcino (PCV) tipos 1 y 2. El MCB se encontró negativo para los tipos de PCV 1 y 2.

8.2.2 Banco de células de trabajo de HEK293

El banco de células de trabajo (WCB) de HEK293 se fabricó usando suero de bovino fetal, FBS, originado de Nueva Zelanda (Hyclone PN SH30406.02) certificado por conveniencia de acuerdo con la monografía de la Farmacopea Europea. El WCB de HEK293 se estableció usando un vial (1 mL) del MCB como material de siembra. Se llevaron a cabo pruebas de caracterización, y los resultados de prueba se enlistan en el cuadro 4.1.

CUADRO 4.1
Caracterización del WCB de HEK293

Prueba	Método	Número de estudio	Resultado
Prueba para determinar la presencia de micoplasma cultivable en	<i>In vivo</i>	BioReliance AD61FS.102063GMP.BSV	Ningún micoplasma detectado

Prueba	Método	Número de estudio	Resultado
agar y no cultivable en agar USP, EP, 1993 PTC			
Calificación de la prueba para micoplasma cultivable en agar y no cultivable en agar USP, EP, 1993 PTC/JP	<i>In vivo</i>	BioReliance AD61FS.102062GMP.BSV	Ninguna micoplasma observada
Prueba de esterilidad con aislador, USP <71>, 21 CFR 610.12	Inoculación directa	BioReliance AD61FS.510120GMP.BSV	Ningún crecimiento bacteriano o fúngico
Prueba para determinar la presencia de virus no aparentes	<i>In vivo</i>	BioReliance AD61FS.005002GMP.BSV	Negativo
Prueba de 28 días para determinar la presencia de contaminantes virales	<i>In vitro</i>	BioReliance AD61FS.003800.BSV	Negativo
Identificación y caracterización del cultivo de células	Análisis de isoenzimas	BioReliance AD61FS.380801.BSV	Humano

8.3. Fabricación del vector

Descripciones generales de los procedimientos de fabricación del vector se dan a continuación y se reflejan también en un diagrama de flujo en la figura 11.

8.3.1 Procedimiento de generación del vector (procedimiento aguas arriba)

8.3.1.1 Inicio del cultivo de células del WCB de HEK293 en un matraz T (75 cm²)

Un vial de células HEK293 del WCB que contiene 10^7 células en 1 mL es descongelado a 37°C y sembrado en un matraz de cultivo de tejidos de 75 cm² que contiene DMEM de alto contenido de glucosa suplementado con suero de bovino fetal a 10% (DMEM HG/10% FBS). Las células se ponen entonces en una incubadora a 37°C/CO₂ a 15%, y se cultivan a aproximadamente 70% de confluencia con inspección visual y microscópica directa diariamente para evaluar el crecimiento de las células. Estas células se designan como pasada 1, y se hacen pasar para generar un tren de siembra de células para la biosíntesis del vector por hasta aproximadamente 10 semanas como se describe a continuación. El número de pasadas se registra en cada pasada, y las células se descontinúan después de la pasada 20. Si se requieren células adicionales para la biosíntesis del vector, un nuevo tren de siembra de células HEK293 se inicia de otro vial del WCB de HEK293.

8.3.1.2 Paso de las células en ~2 matraces T (225 cm²)

Cuando las células HEK293 que crecen en el matraz T75 son ~70% confluentes, las células se separan de la superficie del matraz usando tripsina recombinante (TrypLE), y se siembran en dos matraces T225 que contienen DMEM HG/10% FBS. Las células se ponen en la incubadora y se cultivan hasta ~70% de confluencia. Las células se monitorean para crecimiento de células, ausencia de contaminación y consistencia por inspección visual y el uso de un microscopio.

8.3.1.3 Paso de las células en ~10 matraces T (225 cm²)

Cuando las células HEK293 que crecen en los dos matraces T225 son ~70% confluentes, las células se separan usando tripsina recombinante (TrypLE), y se siembran a una densidad de $\sim 3 \times 10^6$ células por matraz en diez matraces T de 225 cm² que contienen DMEM HG/10% FBS. Las células se ponen en una incubadora a 37°C/CO₂ a 5%, y se cultivan a ~70% de confluencia. Las células se monitorean para crecimiento de células, ausencia de contaminación y consistencia

por inspección visual directa y el uso de un microscopio. Las células se mantienen por pasadas seriadas en matraces T225 para mantener el tren de siembra de células y para proveer células para expansión para sustentar la fabricación de lotes de vector subsiguientes.

8.3.1.4 Paso de las células en ~10 botellas giratorias

Cuando las células HEK293 que crecen en diez matraces T225 son ~70% confluentes, las células se separan usando tripsina recombinante (TrypLE), se hace el conteo de las mismas y se siembran en botellas giratorias (RB) de 850 cm² que contienen DMEM HG/10% FBS. Las RB se ponen entonces en la incubadora de RB, y las células se cultivan a ~70% de confluencia. Las RBs se monitorean para crecimiento de células, ausencia de contaminación y consistencia por inspección visual directa y el uso de un microscopio.

8.3.1.5 Paso de las células en ~100 botellas giratorias

Cuando las células HEK293 que crecen en las RBs preparadas como se describió en el paso de procedimiento previo son ~70% confluentes, se separan usando tripsina recombinante (TrypLE), se hace el conteo de las mismas y se siembran en 100 RBs que contienen DMEM/10% FBS. Las RB se ponen entonces en la incubadora de RB (37°C, CO₂ a 5%) y se cultivaron hasta ~70% de confluencia. Las células se monitorean para crecimiento de células, ausencia de contaminación y consistencia por inspección visual directa y el uso de un microscopio.

8.3.1.6 Transfección de las células con ADN de plásmido

Cuando las células HEK293 que crecen en 100 RBs son ~70% confluentes, las células son transfectadas con cada uno de los tres plásmidos siguientes: el plásmido de empacado (trans) específico del serotipo de AAV, el plásmido auxiliar y el plásmido cis de vector que contiene el cassette de expresión para el gen del LDLR humano flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. La transfección se lleva a cabo usando el método de fosfato de calcio (para detalles del plásmido, véase la sección 4.1.1). Las RBs se ponen en la incubadora de RBs (37°C, CO₂ a 5%) durante la noche.

8.3.1.7. Intercambio de medio a medio libre de suero

Después de la incubación durante la noche de 100 RBs después de la transfección, el medio de cultivo de DMEM/FBS a 10% que contiene reactivos de transfección es removido de cada RB por aspiración y reemplazado con DMEM-HG

(sin FBS). Las RB se regresan a la incubadora de RB y se incuban a 37°C, CO₂ a 5% hasta que son cosechadas.

8.3.1.8. Cosecha del vector

Las RB son removidas de la incubadora y examinadas para determinar la evidencia de transfección (cambios inducidos por la transfección en la morfología celular, separación de la monocapa de células) y para encontrar cualquier evidencia de contaminación. Las células se separan de la superficie de las RB por agitación de cada RB, y entonces se cosechan por decantación en un embudo estéril desechable conectado a un contenedor BioProcess (BPC). El material combinado de la cosecha en el BPC se etiqueta como “producto intermediario: cosecha cruda de células”, y se toman muestras para (1) pruebas de la carga biológica en el procedimiento, y (2) pruebas de liberación del producto de la carga biológica, micoplasmas y agentes adventicios. El lote del producto intermediario etiquetado como cosecha cruda de células (CH) se almacena a 2-8°C hasta que es procesado adicionalmente.

8.3.2 Procedimiento de purificación del vector (procedimiento aguas abajo)

Mientras que es común, el procedimiento de purificación en “plataforma” se usa para todos los serotipos de AAV (es decir, incorporando la misma serie y orden de los pasos), y cada serotipo requiere condiciones únicas para el paso de cromatografía, un requerimiento que influye también sobre algunos detalles (composición del regulador de pH y pH) de los pasos usados para preparar el lisado de células clarificado aplicado a la resina de cromatografía.

8.3.2.1 Concentración de la cosecha del vector de AAV8 y diafiltración por TFF

El BPC que contiene la CH cruda está conectado a la entrada del depósito aséptico de un aparato de TFF de fibras huecas (límite de peso molecular de 100 k) equilibrado con solución salina regulada en su pH con fosfato. La CH cruda se aplica al aparato de TFF usando una bomba peristáltica, y se concentra hasta 1-2 L. El vector es retenido (mezcla concentrada), mientras que las porciones de peso molecular pequeño y el regulador de pH pasan a través de los poros del filtro de TFF y son desechados. La cosecha es entonces diafiltrada usando el regulador de pH de diafiltración de AAV8. Después de la diafiltración, el vector concentrado es recuperado en un BPC de 5L. El material es etiquetado como “producto intermediario: TFF de post-cosecha”, y se toma una muestra para las pruebas de la carga biológica en el procedimiento. La cosecha concentrada es

procesada adicionalmente de inmediato o almacenada a 2 a 8°C hasta más procesamiento.

8.3.2.2 Microfluidización y digestión de la cosecha con nucleasas

La cosecha concentrada y diafiltrada se somete a esfuerzo cortante que rompe las células HEK293 intactas abiertas usando un microfluidizador. El microfluidizador es desinfectado con NaOH 1N por un mínimo de 1 hora después de cada uso, almacenado en alcohol etílico a 20% hasta la siguiente prueba, y enjuagado con WFI antes de cada uso. El vector crudo contenido en el BPC es unido a la abertura de entrada desinfectada del microfluidizador, y un BPC vacío estéril es unido a la abertura de salida. Mediante el uso de la presión de aire generada por el microfluidizador, las células que contienen al vector se hacen pasar a través de la cámara de interacción del microfluidizador (una vía enrollada de 300 μm de diámetro) para lisar las células y liberar al vector. El procedimiento de microfluidización se repite para asegurar la lisis completa de las células y la alta recuperación del vector. Después del paso repetido del producto intermediario a través del microfluidizador, la trayectoria de flujo se enjuaga con ~500 mL de regulador de pH de Benzonase® de AAV8. El BPC de 5L que contiene al vector microfluidizado es separado de la abertura de salida del microfluidizador. El material es etiquetado como “producto intermediario: microfluidizado final”, y se toman muestras para pruebas de la carga biológica en el procedimiento. El producto intermediario microfluidizado es procesado adicionalmente de inmediato o almacenado a 2 a 8°C hasta más procesamiento. Las impurezas de ácido nucleico son removidas de las partículas de AAV8 por otras 100 U/mL de Benzonase®. El contenido del BPC se mezcla y se incuba a temperatura ambiente por cuando menos 1 hora. El producto intermediario digerido con nucleasas es procesado adicionalmente.

8.3.2.3 Filtración del intermediario microfluidizado

El BPC que contiene al producto intermediario microfluidizado y digerido se conecta a un filtro de cartucho con un tamaño de poro de gradiente que parte a 3 μm descendiendo hasta 0.45 μm . El filtro es acondicionado con regulador de pH de Benzonase® de AAV. Mediante el uso de la bomba peristáltica, el producto intermediario microfluidizado se hace pasar a través del filtro de cartucho y se colecta en el BPC conectado a la abertura de salida del filtro. El regulador de pH de Benzonase® de AAV8 estéril se bombea a través del filtro de cartucho para enjuagar el filtro. El producto intermediario filtrado se conecta entonces a un filtro de cápsula de tamaño de poro final de 0.2 μm acondicionado con regulador de pH de

Benzonase® de AAV8. Mediante el uso de la bomba peristáltica, el intermediario filtrado se hace pasar a través del filtro de cartucho y se colecta en el BPC conectado a la abertura de salida del filtro. Un volumen de regulador de pH de Bazonase® de AAV8 estéril se bombea a través del filtro de cartucho para enjuagar el filtro. El material es etiquetado como “producto intermediario: post-microfluidizado filtrado a 0.2 µm”, y se toman muestras para pruebas de la carga biológica en el procedimiento. El material se almacena durante la noche a 2-8°C hasta más procesamiento. Un paso de filtración adicional puede llevarse a cabo en el día de la cromatografía antes de la aplicación del lisado de células clarificado a la columna de cromatografía.

8.3.2.4 Purificación por cromatografía de intercambio aniónico

El producto intermediario filtrado a 0.2 µm se ajusta para la concentración de NaCl añadiendo regulador de pH de dilución de AAV8. El lisado de células que contiene al vector se purifica entonces por cromatografía de intercambio iónico usando una resina de intercambio iónico. El sistema de cromatografía piloto AKTA de GE Healthcare está equipado con una columna de BPG que contiene un volumen de lecho de resina de aproximadamente 1L. La columna es empacada usando condiciones de flujo continuo, y cumple con las especificaciones de asimetría establecidas. El sistema es desinfectado de acuerdo al procedimiento establecido, y se almacena en alcohol etílico a 20% hasta la siguiente prueba. Inmediatamente antes del uso, el sistema es equilibrado con regulador de pH de lavado de AAV8 estéril. Mediante el uso de técnicas asépticas y materiales y componentes estériles, el BPC que contiene al lisado de células clarificado se conecta a la abertura de entrada de muestras desinfectada, y los BPC que contienen a los reguladores de pH de bioprocesamiento enlistados más adelante se conectan a las aberturas de entrada desinfectadas en el piloto AKTA. Todas las conexiones durante el procedimiento de cromatografía se llevan a cabo de forma aséptica. El lisado de células clarificado se aplica a la columna, y se enjuaga usando regulador de pH de lavado de AAV8. Bajo estas condiciones, el vector se une a la columna, y las impurezas se enjuagan de la resina. Las partículas de AAV8 se eluyen de la columna mediante la aplicación de regulador de pH de elución de AAV8 y se colectan en una botella de plástico estéril. El material es etiquetado como “producto intermediario”, y se toman muestras para las pruebas de la carga biológica en procesamiento. El material se procesa adicionalmente de inmediato.

8.3.2.5 Purificación por ultracentrifugación de gradiente de CsCl

Las partículas de AAV8 purificadas por cromatografía en columna de intercambio aniónico como se describió anteriormente contienen cápsides vacías y otras impurezas relacionadas con el producto. Las cápsides vacías se separan de las partículas de vector por ultracentrifugación de gradiente de cloruro de cesio. Mediante el uso de técnicas asépticas, se añade cloruro de cesio al “producto intermediario” del vector con mezclado suave hasta una concentración final que corresponda a una densidad de 1.35 g/mL. La solución se filtra a través de un filtro de 0.2 µm, se distribuye en tubos de ultracentrifugación, y se somete a ultracentrifugación en un rotor Ti50 por aproximadamente 24 horas a 15°C. Después de la centrifugación, los tubos se remueven del rotor, se limpian con Septihol, y se ponen en el BSC. Cada tubo se sujeta en un soporte y se somete a iluminación centrada para facilitar la visualización de las bandas. Dos bandas principales se observan típicamente, la banda superior que corresponde a las cápsides vacías, y la banda inferior que corresponde a las partículas de vector. La banda inferior se recupera de cada tubo con una aguja estéril unida a una jeringa estéril. El vector recuperado de cada tubo se combina, y se toman muestras para la carga biológica en procesamiento, endotoxina y titulación del vector. El material reunido se distribuye en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL estériles etiquetados como “producto intermediario: post-gradiente de CsCl”, y se almacena inmediatamente a -80°C hasta el siguiente paso del procedimiento.

8.3.2.6 Intercambio del regulador de pH por filtración de flujo tangencial

Después de las pruebas y la liberación para la agrupación, los lotes de vector purificados a través del paso de procesamiento de bandas de CsCl se combinan y se someten a diafiltración por TFF para producir el vector en masa. Con base en la titulación de las muestras obtenidas de los lotes individuales, el volumen de los vectores agrupados se ajusta usando el volumen calculado de regulador de pH de diafiltración estéril. Dependiendo del volumen disponible, alícuotas del vector agrupado y de concentración ajustada se someten a TFF con dispositivos de TFF de un sólo uso. Los dispositivos se desinfectan antes de su uso y se equilibran entonces en regulador de pH de diafiltración. Una vez que el procedimiento de diafiltración concluye, el vector se recupera del aparato de TFF en un matraz estéril. El material se etiqueta como "pre-volumen de filtración de 0.2 µm". El material se procesa adicionalmente de inmediato.

8.3.2.7 Formulación y filtración de 0.2 μ m para preparar el vector en masa

Lotes preparados por unidades de TFF individuales se agrupan y se mezclan por agitación suave en un matraz estéril de 500 mL. El material reunido se hace pasar entonces a través de un filtro de 0.22 μ m para preparar el vector en masa. Se toman muestras del material reunido para preparar el vector en masa y para realizar pruebas de control de calidad reservadas, y entonces el material se distribuye en alícuotas en tubos de polipropileno de 50 mL estériles, se etiqueta como “vector preparado en masa” y se almacena a -80°C hasta el siguiente paso.

8.4. Pruebas del vector

Se realizan pruebas de caracterización que incluyen la identidad del serotipo, el contenido de partículas vacías y la identidad del producto del transgen. Descripciones de todas las pruebas aparecen a continuación.

8.4.1 Titulación de copias del genoma (GC)

Una prueba de PCR cuantitativa optimizada (oqPCR) se usa para determinar la titulación de copias del genoma por comparación con un estándar de plásmido cognado. La prueba de oqPCR usa la digestión secuencial con desoxirribonucleasa I y proteinasa K, seguida de análisis por qPCR para medir las copias genómicas del vector encapsidado. La detección del ADN se lleva a cabo usando iniciadores específicos de la secuencia que focalizan la región de poli A de RBG en combinación con una sonda marcada por fluorescencia que hibrida con esta misma región. La comparación con la curva estándar de ADN de plásmido permite la determinación del título sin la necesidad de alguna manipulación de la muestra post-PCR. Una serie de estándares, muestras de validación y controles (para la contaminación del ADN y el fondo) se han introducido en la prueba. Esta prueba ha sido calificada estableciendo y definiendo parámetros de prueba que incluyen sensibilidad, límite de detección, escala de calificación y precisión a través y dentro de la prueba. Un lote de referencia de AAV8 interno se estableció y se usa para realizar los estudios de calificación.

8.4.2 Prueba de potencia

Una prueba de potencia *in vivo* se diseñó para detectar la reducción mediada por el vector del LDLR humano, de los niveles de colesterol total en el suero de un modelo de ratón LDLR^{-/-}Apobec^{-/-} con doble expresión bloqueada (ratón DKO) de HoFH. La base para el desarrollo de la prueba de potencia *in vivo* se describe en la sección 4.3.5.11. Para determinar la potencia del vector de AAV8.TBG.hLDLR, ratones DKO de 6 a 20 semanas son inyectados IV (a través de

la vena de la cola) con 5×10^{11} GC/kg, por ratón, del vector diluido en PBS. Los animales son sangrados por sangrías retroorbitales, y los niveles de colesterol total en suero son evaluados antes y después de la administración del vector (días 14 y 30) por Antech GLP. Se espera que los niveles de colesterol total en los animales a los que se les administró el vector disminuyan en 25% - 75% de la referencia inicial alrededor del día 14 con base en la experiencia previa con la administración del vector a esta dosis. La dosis de 5×10^{11} GC/kg por ratón se eligió para la prueba clínica con base en la escala anticipada de reducción del colesterol total, lo cual permitiría la evaluación de los cambios en la potencia del vector durante el curso de las pruebas de estabilidad.

8.4.3 Identidad de la cápside del vector: espectrometría de masas de la cápside de AAV de VP3

La confirmación del serotipo de AAV2/8 del vector se logra mediante una prueba basada en el análisis de péptidos de la proteína de la cápside VP3 por espectrometría de masas (MS). El método implica la digestión por enzimas múltiples (tripsina, quimotripsina y endoproteinasa Glu-C) de la banda de proteína VP3 extraída de geles de SDS-PAGE, seguida de caracterización en una UPLC-MS/MS en un espectrómetro de masas Q-Exactive Orbitrap para secuenciar la proteína de la cápside. Se desarrolló un método de espectros de masas (MS) en tándem que permite la identificación de ciertas proteínas contaminantes y la derivación de la secuencia de péptidos de los espectros de masas.

8.4.4 Relación de partículas vacías a llenas

Los perfiles de partículas del vector usando la velocidad de sedimentación en una ultracentrifugación analítica (AUC), según se miden en una ultracentrífuga analítica, son un método excelente para obtener información sobre la heterogeneidad de la estructura macromolecular, la diferencia en la confirmación y el estado de asociación o agregación. La muestra se cargó en las células y se sedimentó a 12000 RPM en una ultracentrífuga analítica Coulter Proteomelab XL-I de Beckman. Se registraron exploraciones del índice de refracción cada dos minutos por 3.3 horas. Los datos se analizaron usando un modelo $c(s)$ (programa Sedfit), y los coeficientes de sedimentación calculados se graficaron contra los valores $c(s)$ normalizados. Debe observarse un pico principal que representa al vector monomérico. La aparición de picos que migran más lentamente que el pico monomérico principal indica partículas vacías/mal ensambladas. El coeficiente de sedimentación del pico de las partículas vacías se establece usando preparaciones de partículas de AAV8 vacías. La cuantificación directa del pico monomérico

principal y los picos precedentes permite la determinación de la relación de partículas vacías a llenas.

8.4.5 Título infeccioso

La prueba de unidades infecciosas (IU) se usa para determinar la absorción productiva y la replicación del vector en células RC32 (células HeLa que expresan rep2). En resumen, células RC32 en placas de 96 cavidades son co-infectadas por diluciones en serie del vector y una dilución uniforme de Ad5 con 12 réplicas en cada dilución de rAAV. Setenta y dos horas después de la infección las células son lisadas, y se realiza qPCR para detectar la amplificación del vector de rAAV sobre la entrada. Se realiza un cálculo de la dilución TCID₅₀ de los criterios de valoración (Spearman-Kärber) para determinar un título replicativo expresado como IU/mL. Dado que los valores de "infecciosidad" dependen de las partículas que entran en contacto con las células, la unión al receptor, la incorporación, el transporte al núcleo y la replicación del genoma, son influenciados por la geometría de la prueba y la presencia de receptores y vías de post-unión apropiados en la línea de células usada. Los receptores y las vías de post-unión críticos para la importación del vector de AAV se mantienen usualmente en líneas de células inmortalizadas, y de esta manera los títulos de la prueba de infecciosidad no son una medida absoluta del número de partículas "infecciosas" presentes. Sin embargo, la relación de GC encapsidadas a "unidades infecciosas" (descrita como la relación GC/IU) puede usarse como una medida de la consistencia del producto de un lote a otro. La variabilidad de este bioensayo *in vitro* es alta (CV de 30-60%) debido probablemente a la baja infecciosidad de los vectores de AAV8 *in vitro*.

8.4.6 Prueba de la expresión del transgen

La expresión del transgen se evalúa en los hígados cosechados de ratones LDLR^{-/-}-Apobec^{-/-} que reciben 1×10^{10} GC (5×10^{11} GC/kg) del vector de AAV8.TBG.hLDLR. Los animales dosificados 30 días antes con el vector son sacrificados, y los hígados cosechados y homogeneizados en regulador de pH de RIPA. 25-100 µg de homogeneizado total del hígado se someten a electroforesis en un gel de SDS-PAGE desnaturizante a 4-12%, y se sondan usando anticuerpos contra el LDLR humano para determinar la expresión del transgen. Los animales que no reciben vector alguno o un vector irrelevante se usan como controles para la prueba. Se espera que los animales tratados con el vector muestren una banda que migra en cualquier parte de 90-160 kDa debido a modificaciones post-traduccion. Los niveles de expresión relativos se determinan cuantificando la intensidad integrada de las bandas.

(Texto libre de listado de secuencias)

La siguiente información se provee para secuencias que contienen texto libre bajo identificador numérico <223>.

SEQ ID NO: (conteniendo texto libre)	Texto libre bajo <223>
1	<221> misc_característica <222> (188)..(2770) <223> isoforma 1 del LDLR codificada por CDS de longitud completa, 188-2770; otras variantes codificadas por variantes de empalme alternativas que carecen de un exón; variante más común careciendo del cuarto exón o doceavo exón <220> <221> misc_señal <222> (188)..(250) <220> <221> misc_característica <222> (251)..(2767) <223> Proteína madura de la isoforma 1
4	<223> hLDLR artificial <220> <221> misc_característica <222> (1)..(2583) <223> secuencia de codificación del hLDLR artificial
5	<223> proteína de la cápside vp1 de virus adeno-asociado 8
6	<223> pAAV.TBG.PI.hLDLRco.RGB <220> <221> region_repetición <222> (1)..(130) <223> ITR 5'

SEQ ID NO: (conteniendo texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<220> <221> intensificador <222> (221)..(320) <223> Alfa mic/bik <220> <221> intensificador <222> (327)..(426) <223> Alfa mic/bik <220> <221> promotor <222> (442)..(901) <223> TBG <220> <221> TATA_señal <222> (885)..(888) <223> TATA <220> <221> CDS <222> (969)..(3551) <223> hLTLR optimizado en codones <220> <221> poli A_señal <222> (3603)..(3729) <223> globina poli A de conejo <220> <221> region_repetición <222> (3818)..(3947) <223> ITR 3'

SEQ ID NO: (conteniendo texto libre)	Texto libre bajo <223>
	<220> <221> rep_origen <222> (4124)..(4579) <223> f1 ori <220> <221> misc_característica <222> (4710)..(5567) <223> AP(R) <220> <221> origen de rep_ <222> (5741)..(6329) <223> Origen de replicación
7	<223> Construcción sintética

Todas las publicaciones citadas en esta especificación se incorporan en su totalidad en la presente como referencia, como lo son la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 62/269,440, presentada en Diciembre 18 de 2015, y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos No. 62/266,383, presentada en Diciembre 11 de 2015. Asimismo, las SEQ ID NOs que son referidas en la presente y que aparecen en el listado de secuencias anexo, se incorporan en su totalidad en la presente como referencia. Mientras que la invención se ha descrito con relación a modalidades particulares, se apreciará que pueden hacerse modificaciones sin que se aparten del espíritu de la invención. Se pretende que dichas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.