

VECTORES VIRALES RECOMBINANTES Y ÁCIDOS NUCLEICOS PARA PRODUCIRLOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º de serie 62/770,202, presentada el 21 de noviembre de 2018, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos.

CAMPO

[0002] La presente descripción se refiere a los campos de la biología molecular y la terapia génica. Más específicamente, la descripción se refiere a composiciones y métodos para producir vectores virales recombinantes.

DESCRIPCIÓN DEL ARCHIVO DE TEXTO PRESENTADO DE FORMA ELECTRÓNICA

[0003] El contenido del archivo de texto presentado de forma electrónica en la presente se incorpora mediante esta referencia en su totalidad: una copia de formato legible por computadora del listado de secuencias (nombre del archivo: STRD-011-01WO_Sequence_Listing.txt, registrado el 21 de noviembre de 2019, tamaño de archivo ~145 kilobytes).

ANTECEDENTES

[0004] Los vectores virales recombinantes, incluidos los vectores de virus adenoasociados (AAV), son útiles como agentes de administración de genes y son herramientas poderosas para la terapia génica humana. Mediante el uso de AAV, se puede lograr la expresión e integración de ADN estable de alta frecuencia en una variedad de células, tanto *in vivo* como *in vitro*. A diferencia de otros sistemas de vectores virales, el AAV no requiere una división celular activa para una integración estable en las células objetivo.

[0005] Los vectores de AAV recombinantes se pueden producir en cultivo mediante el uso de líneas celulares de producción viral. La producción de AAV recombinantes requiere típicamente la presencia de tres elementos en las células: 1) un ácido nucleico que comprende un transgén flanqueado por secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, 2) genes rep y cap de AAV, y 3) secuencias de proteína del virus auxiliador. Estos tres elementos se pueden proporcionar en uno o más plásmidos y se pueden transfectar o transducir en las células.

[0006] La producción y el uso de vectores de AAV recombinantes se han visto limitados por la incapacidad de empaquetar eficazmente el ADN transgénico en cápsides virales y expresar eficazmente el transgén en células objetivo. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos mejorados para producir vectores AAV recombinantes.

COMPENDIO

[0007] En la presente se describen ácidos nucleicos que comprenden casetes de transferencia de AAV. Los ácidos nucleicos descritos pueden usarse en la producción de vectores virales adenoasociados (AAV) recombinantes. Los ácidos nucleicos y casetes de transferencia descritos comprenden las secuencias de uno o más transgenes que tienen eficacia terapéutica en la mejora, tratamiento y/o prevención de una o más enfermedades o trastornos.

[0008] En algunas modalidades, la descripción proporciona un ácido nucleico que comprende, de 5' a 3', una repetición terminal invertida (ITR) 5', un promotor, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación y una ITR 3'. En algunas modalidades, la secuencia del transgén codifica la proteína frataxina (FXN). La proteína FXN puede ser, por ejemplo, la proteína FXN humana. En algunas modalidades, la proteína FXN tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 65, o una secuencia que es al menos 95 % idéntica a esta. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-64, o una secuencia al menos 95 % idéntica a estas.

[0009] En algunas modalidades, la ITR 5' tiene la misma longitud que la ITR 3'. En algunas modalidades, la ITR 5' y la ITR 3' tienen longitudes diferentes. En algunas modalidades, al menos una de la ITR 5' y la ITR 3' tiene una longitud de alrededor de 110 a alrededor de 160 nucleótidos. Al menos una de la ITR 5' y la ITR 3' se puede aislar o derivar, por ejemplo, del genoma de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32,33, AAVrh74, AAV aviar o AAV bovino. En algunas modalidades, la ITR 5' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta. En algunas modalidades, la ITR 3' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta. En algunas modalidades, la ITR 3' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

[0010] El promotor puede impulsar la expresión del transgén. En algunas modalidades, el promotor es un promotor constitutivo. En algunas modalidades, el promotor es un promotor inducible. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de tejido. En algunas modalidades, el promotor es

una forma modificada de un promotor de tipo salvaje. Por ejemplo, debido a las restricciones de empaquetamiento de un AAV, la longitud de un promotor puede reducirse. En algunas modalidades, el promotor es una forma truncada de un promotor de tipo salvaje.

[0011] El promotor puede ser, por ejemplo, el promotor de CMV, el promotor temprano de SV40, el promotor tardío de SV40, el promotor metalotioneína, el promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor de la polihedrina, el promotor de la β -actina de pollo (CBA), el promotor de EF-1 alfa, el promotor corto de EF-1 alfa, el promotor de núcleo de EF-1 alfa, el promotor de dihidrofolato reductasa (DHFR), el promotor GUSB240, el promotor GUSB379 o el promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK). En algunas modalidades, el promotor comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-12, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

[0012] En algunas modalidades, la secuencia del transgén está optimizada por CpG. En algunas modalidades, la secuencia del transgén comprende la SEQ ID NO: 19 o 20, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

[0013] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una secuencia de Kozak inmediatamente 5' con respecto a la secuencia del transgén. La secuencia de Kozak puede comprender, por ejemplo, la secuencia de la SEQ ID NO: 17 o 18, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

[0014] En algunas modalidades, la señal de poliadenilación se selecciona de la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40), α -globina humana, α -globina de conejo, β -globina humana, β -globina de ratón, colágeno humano, virus de polio, hormona de crecimiento humano (hGH) y hormona de crecimiento bovino (bGH). En algunas modalidades, la señal de poliadenilación comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 21-24, o una secuencia al menos 95 % idéntica a estas.

[0015] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende, además, un potenciador. El potenciador puede ser, por ejemplo, un potenciador de CMV. En algunas modalidades, el potenciador comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

[0016] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende, además, una secuencia intrónica. La secuencia intrónica puede ser, por ejemplo, una secuencia quimérica o una secuencia híbrida. En algunas modalidades, la secuencia intrónica se aísla o deriva de una secuencia intrónica de uno o más de los siguientes genes: β -globina, beta actina de pollo, virus diminuto de ratón e IgG humana. En algunas

modalidades, la secuencia intrónica comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 13-16, o una secuencia al menos 95 % idéntica a estas.

[0017] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia de relleno (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 secuencias de relleno). En algunas modalidades, la al menos una secuencia de relleno comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 25-27, o una secuencia al menos 95 % idéntica a estas.

[0018] También se proporciona en la presente un vector (por ejemplo, un vector o plásmido de AAV) que comprende un ácido nucleico de la descripción.

[0019] También se proporciona una célula que comprende un ácido nucleico de la descripción.

[0020] También se proporciona un método para producir un vector AAV recombinante, el método comprende poner en contacto una célula productora de AAV con un ácido nucleico o plásmido/bácmido de la descripción. También se proporciona un vector de AAV recombinante producido por este método. El vector AAV recombinante puede comprender una proteína de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32,33, AAVrh74, AAV aviar y AAV bovino. En algunas modalidades, el vector AAV puede comprender una proteína de la cápside con una o más sustituciones o mutaciones en comparación con una proteína de la cápside de AAV de tipo salvaje. En algunas modalidades, el vector AAV recombinante es de cadena simple (ssAAV). En algunas modalidades, el vector de AAV recombinante es autocomplementario (scAAV).

[0021] También se proporcionan composiciones que comprenden un ácido nucleico, un plásmido, un bácmido, una célula o un vector AAV recombinante de la descripción.

[0022] También se proporciona un método para tratar un sujeto que lo necesite que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico, un plásmido, una célula o un vector AAV recombinante de la descripción. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto humano.

En algunas modalidades, el sujeto padece ataxia de Friedreich (FRDA).

[0023] Estas y otras modalidades se tratan con más detalle en la descripción detallada que se expone a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0024] La **FIG. 1** muestra el rendimiento de producción (genomas de vector) de AAV mediante el uso de un método de transfección de plásmido triple. Los vectores AAV se cuantificaron mediante el uso de un ensayo de PCR digital de gotas (ddPCR®).

5 [0025] La **FIG. 2** muestra el porcentaje de supervivencia de ratones deficientes en FXN ($FXN^{fllox/fllox}MCKCre^{+}$) tratados con un vector AAV que empaquetaba un transgén de FXN humana a una dosis de 5×10^{13} vg/kg (grupo 2) en comparación con ratones a los que se les inyectó solución salina (grupo 1).

10 [0026] Las **FIG. 3A-3C** muestran el resultado de un experimento en el que se trataron ratones deficientes en FXN ($FXN^{fllox/fllox}MCKCre^{+}$) de 3 semanas de edad con solución salina o un vector AAV que empaquetaba un transgén de FXN humana (dosis baja = 1×10^{13} vg/kg, dosis alta = 5×10^{13} vg/kg). Los ratones se sacrificaron 3 semanas después del tratamiento. La **FIG. 3A** muestra el número de copias del ADN del vector de FXN humana por microgramo de ADN hospedador en el tejido cardíaco. La **FIG. 3B** muestra el número de copias de ARNm de FXN, normalizado a ARNm de HPRT (hipoxantina-guanina fosfo-ribosiltransferasa). ND = no detectado. La **FIG. 3C** muestra los niveles de proteína FXN.

15 [0027] La **FIG. 4** muestra la expresión de FXN humana (ng/mg) en células Lec2 cultivadas transducidas con varias dosis de AAV9-FXN. Los niveles de FXN humana se midieron mediante el uso de ELISA estándar.

20 [0028] La **FIG. 5** muestra una versión esquemática de un esquema ilustrativo para producir AAV mediante el uso de un casete de transferencia de AAV de la descripción. Un casete de transferencia de AAV que comprende una ITR 5', un promotor, un transgén y una ITR 3' se empaqueta en un plásmido mediante el uso de técnicas de clonación estándar. Se prepara un segundo plásmido que comprende las secuencias rep y cap de AAV, y un tercer plásmido que comprende genes auxiliares de adenovirus. Los tres plásmidos se transfectan en una línea celular productora de AAV (por ejemplo, HEK293). Las células
25 luego producen AAV, que pueden purificarse y congelarse para su uso posterior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0029] La terapia genética es muy prometedora para el tratamiento y la prevención de enfermedades y trastornos genéticos que incluyen, por ejemplo, la ataxia de Friedreich (FRDA). La FRDA es un trastorno autosómico recesivo causado típicamente por mutaciones en el gen de frataxina (FXN). Alrededor de 1
30 de cada 50 000 personas en los Estados Unidos tiene FRDA. La edad típica de aparición es entre alrededor

de 5 y alrededor de 18 años. Los síntomas varían entre los sujetos, pero pueden incluir (i) pérdida de coordinación (ataxia) en los brazos y piernas, (ii) fatiga/privación de energía y pérdida muscular, (iii) deterioro de la visión, pérdida de audición y dificultad para hablar, (iv) escoliosis agresiva (curvatura de la columna), (v) diabetes mellitus (típicamente insulino dependiente) y (vi) afecciones cardíacas graves (por ejemplo, miocardiopatía hipertrófica y arritmias). Las capacidades mentales de las personas con FRDA permanecen intactas. Actualmente no existen tratamientos para FRDA; los sujetos son monitoreados para el manejo de los síntomas. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de composiciones y métodos para tratar y/o prevenir la FRDA.

[0030] En la presente se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden casetes de transferencia de AAV para producir vectores de AAV. Los vectores AAV se pueden usar para aplicaciones de terapia génica, por ejemplo, para administrar un transgén terapéutico a una célula o a un sujeto que lo necesite. Los casetes de transferencia de AAV y los vectores de la presente descripción pueden usarse para tratar o prevenir diversas enfermedades y trastornos genéticos, tales como la FRDA.

[0031] Todos los artículos, publicaciones y patentes citados en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente mediante referencia como si se indicara específica e individualmente que cada artículo, publicación o patente individual sea incorporado por referencia y se incorporan a la presente mediante referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

[0032] A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diversas características descritas en la presente puedan usarse en cualquier combinación. Los encabezados de sección se utilizan en la presente con fines de organización y no pretenden ser limitantes.

[0033] A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones técnicas y científicas utilizadas en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. La terminología utilizada en la presente descripción tiene el propósito de únicamente describir modalidades particulares y no pretende ser taxativa.

Definiciones

[0034] Los siguientes términos se utilizan en la descripción en la presente y las reivindicaciones adjuntas:

[0035] Se pretende que las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0036] Además, la expresión “alrededor de”, tal como se usa en la presente cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de la longitud de un polinucleótido o secuencia polipeptídica, dosis, tiempo, temperatura y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

5 **[0037]** Además, tal como se utiliza en la presente, “y/o” se refiere y abarca cualquiera y todas las combinaciones posibles de uno o más de los artículos nombrados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpretan en la alternativa (“o”).

[0038] Un “ácido nucleico” o “polinucleótido” es una secuencia de bases de nucleótidos, por ejemplo, secuencias híbridas de ARN, ADN o ADN-ARN (que incluyen nucleótidos tanto naturales como no naturales). En algunas modalidades, los ácidos nucleicos de la descripción son secuencias de ADN de
10 cadena simple o de cadena doble. Un ácido nucleico puede tener una longitud de 1-1000, 1000-10 000, 10 000-100 000, 100 000-1 millón o más de 1 millón de nucleótidos. Un ácido nucleico generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener estructuras principales alternativas, que comprenden, por ejemplo, enlaces de fosforamida,
15 fosforotioato, fosforoditioato, O-metilfosforoamidita o P-etoxi o estructuras y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con estructuras principales positivas, estructuras principales no iónicas y estructuras principales sin ribosa. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos. Estas modificaciones de la estructura principal de ribosa-fosfato pueden facilitar la adición de etiquetas o
20 aumentar la estabilidad y semivida de tales moléculas en entornos fisiológicos. Los ácidos nucleicos de la descripción pueden ser lineales o pueden ser circulares (por ejemplo, un plásmido).

[0039] Los términos “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se usan indistintamente en la presente y se refieren a un compuesto que comprende residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, pero no se impone ninguna
25 limitación al número máximo de aminoácidos que pueden constituir la secuencia de una proteína o péptido.

[0040] Tal como se utilizan en la presente, las expresiones “vector de virus”, “vector viral” o “vector de administración de genes” se refieren a una partícula de virus que funciona como un vehículo de administración de ácido nucleico, y que comprende el genoma del vector empaquetado dentro de un virión.

Los vectores de virus ilustrativos de la descripción incluyen vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de lentivirus y vectores de retrovirus.

[0041] El virus adenoasociado o AAV pertenece al género *Dependovirus* de la familia Parvoviridae. El genoma de AAV de tipo salvaje de 4,7 kb codifica dos marcos de lectura abiertos principales. El gen *rep* expresa proteínas de replicación viral y el gen *cap* expresa proteínas de la cápside viral. En los extremos del genoma de AAV hay repeticiones terminales invertidas (ITR) que forman una estructura de horquilla en forma de T. Aunque el virión de AAV maduro es infeccioso en células de mamíferos, el ciclo de vida de AAV replicativo requiere una función auxiliar de, por ejemplo, adenovirus o virus del herpes. Los vectores AAV recombinantes se pueden generar al reemplazar los marcos de lectura abiertos de AAV de tipo salvaje con un casete de expresión transgénica.

[0042] Tal como se describe en la presente, un AAV puede ser AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (que incluye los tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV tipo 12, AAV tipo 13, AAV tipo rh32,33, AAV tipo rh8, AAV tipo rh10, AAV tipo rh74, AAV tipo hu,68, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, AAV de serpiente, AAV de dragón barbudo, AAV2i8, AAV2g9, AAV-LK03, AAV7m8, AAV Anc80, AAV PHP.B y cualquier otro AAV conocido ahora o que se descubra más adelante. Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS et ál., VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4.^a ed., Lippincott-Raven Publishers). Se han identificado varios serotipos y clados de AAV (véase, por ejemplo, Gao et ál., (2004) J. Virology 78:6381-6388; Moris et ál., (2004) Virology 33:-375-383; y Tabla 1).

TABLA 1: Serotipos y Clados de AAV

	Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank
Genomas completos		Clado C		Rh57	AY530569
Virus adenoasociado 1	NC_002077, AF063497	Hu9	AY530629	Rh50	AY530563

	Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank
Virus adenoasociado 2	NC_001401	Hu10	AY530576	Rh49	AY530562
Virus adenoasociado 3	NC_001729	Hu11	AY530577	Hu39	AY530601
Virus adenoasociado 3B	NC_001863	Hu53	AY530615	Rh58	AY530570
Virus adenoasociado 4	NC_001829	Hu55	AY530617	Rh61	AY530572
Virus adenoasociado 5	Y18065, AF085716	Hu54	AY530616	Rh52	AY530565
Virus adenoasociado 6	NC_001862, AAB95450,1	Hu7	AY530628	Rh53	AY530566
AAV ATCC VR-865 aviar	AY186198, AY629583, NC_004828	Hu18	AY530583	Rh51	AY530564
Cepa DA-1 de AAV aviar	NC_006263, AY629583	Hu15	AY530580	Rh64	AY530574
AAV bovino	NC_005889, AY388617, AAR26465	Hu16	AY530581	Rh43	AY530560
AAV11	AAT46339, AY631966	Hu25	AY530591	AAV8	AF513852

	Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank
AAV12	ABI16639, DQ813647	Hu60	AY530622	Rh8	AY242997
Clado A		Ch5	AY243021	Rh1	AY530556
AAV1	NC_002077, AF063497	Hu3	AY530595	Clado F	
AAV6	NC_001862	Hu1	AY530575	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu,48	AY530611	Hu4	AY530602	Hu31	AY530596
Hu 43	AY530606	Hu2	AY530585	Hu32	AY530597
Hu 44	AY530607	Hu61	AY530623	HSC1	MI332400,1
Hu 46	AY530609	Clado D		HSC2	MI332401,1
Clado B		Rh62	AY530573	HSC3	MI332402,1
Hu. 19	AY530584	Rh48	AY530561	HSC4	MI332403,1
Hu. 20	AY530586	Rh54	AY530567	HSC5	MI332405,1
Hu 23	AY530589	Rh55	AY530568	HSC6	MI332404,1
Hu22	AY530588	Cy2	AY243020	HSC7	MI332407,1
Hu24	AY530590	AAV7	AF513851	HSC8	MI332408,1
Hu21	AY530587	Rh35	AY243000	HSC9	MI332409,1
Hu27	AY530592	Rh37	AY242998	HSC11	MI332406,1
Hu28	AY530593	Rh36	AY242999	HSC12	MI332410,1
Hu 29	AY530594	Cy6	AY243016	HSC13	MI332411,1

	Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank
Hu63	AY530624	Cy4	AY243018	HSC14	MI332412,1
Hu64	AY530625	Cy3	AY243019	HSC15	MI332413,1
Hu13	AY530578	Cy5	AY243017	HSC16	MI332414,1
Hu56	AY530618	Rh13	AY243013	HSC17	MI332415,1
Hu57	AY530619	Clado E		Hu68	
Hu49	AY530612	Rh38	AY530558	Aislado clonal	
Hu58	AY530620	Hu66	AY530626	AAV5	Y18065, AF085716
Hu34	AY530598	Hu42	AY530605	AAV 3	NC_001729
Hu35	AY530599	Hu67	AY530627	AAV 3B	NC_001863
AAV2	NC_001401	Hu40	AY530603	AAV4	NC_001829
Hu45	AY530608	Hu41	AY530604	Rh34	AY243001
Hu47	AY530610	Hu37	AY530600	Rh33	AY243002
Hu51	AY530613	Rh40	AY530559	Rh32	AY243003
Hu52	AY530614	Rh2	AY243007	Otros	
Hu T41	AY695378	Bb1	AY243023	Rh74	
Hu S17	AY695376	Bb2	AY243022	AAV de dragón barbudo	

	Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank		Número de acceso de GenBank
Hu T88	AY695375	Rh10	AY243015	AAV de serpiente	NC_006148,1
Hu T71	AY695374	Hu17	AY530582		
Hu T70	AY695373	Hu6	AY530621		
Hu T40	AY695372	Rh25	AY530557		
Hu T32	AY695371	Pi2	AY530554		
Hu T17	AY695370	Pi1	AY530553		
Hu LG15	AY695377	Pi3	AY530555		

[0043] La expresión “AAV autocomplementario” o “scAAV” se refiere a un vector de AAV recombinante que forma una molécula de ADN de repetición invertida dimérica que se hibrida espontáneamente, lo cual da como resultado la expresión del transgén más temprana y más potente en comparación con genomas de AAV de cadena simple (ss) convencionales. Cabe destacar que, los scAAV pueden retener típicamente solamente alrededor de 2,4 kb, la mitad del tamaño de un vector de AAV convencional. En algunas modalidades, se puede usar una estrategia de vector dual para superar la pequeña capacidad de empaquetado del AAV. Por ejemplo, se pueden usar sistemas de activación en cis, de corte y empalme en trans, superposición e híbridos.

[0044] La expresión “casete de transferencia de AAV” se refiere a un ácido nucleico que comprende un transgén flanqueado por una primera y una segunda secuencia de ITR. Un casete de transferencia de AAV se empaqueta en un vector AAV durante la producción del vector AAV.

[0045] Los términos “célula de producción viral”, “línea celular de producción viral” o “célula productora viral” se refieren a las células utilizadas para producir vectores virales. Las células HEK293 y 239T son líneas celulares de producción viral comunes. La Tabla 2, a continuación, enumera líneas celulares de producción viral ilustrativas para varios vectores virales.

Tabla 2: líneas celulares de producción viral ilustrativas

Vector de virus	Líneas celulares de producción viral ilustrativas
Adenovirus	HEK293, 911, pTG6559, PER.C6, GH329, N52.E6, HeLa-E1, UR, VLI-293
Virus adenoasociado (AAV)	HEK293, Sf9, Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, Ha2302, Hz2E5, High Five
Retrovirus	HEK293
Lentivirus	293T

[0046] "HEK293" se refiere a una línea celular derivada originalmente de células renales embrionarias humanas cultivadas en cultivo de tejidos. La línea celular HEK293 crece fácilmente en cultivo y se usa comúnmente para la producción viral. Tal como se usa en la presente, "HEK293" también puede referirse a una o más líneas celulares HEK293 variantes, es decir, líneas celulares derivadas de la línea celular HEK293 original que comprenden además una o más alteraciones genéticas. Se han desarrollado y optimizado muchas líneas variantes HEK293 para una o más aplicaciones particulares. Por ejemplo, la línea celular 293T contiene el antígeno T grande de SV40 que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contienen el origen de replicación de SV40, lo que lleva a una mayor expresión de los productos génicos deseados.

[0047] "Sf9" se refiere a una línea celular de insecto que es un aislado clonal derivado de la línea celular parental de *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21-AE. Las células Sf9 se pueden cultivar en ausencia de suero y se pueden cultivar unidas o en suspensión.

[0048] Un "reactivo de transfección" significa una composición que mejora la transferencia de ácido nucleico a las células. Algunos reactivos de transfección comúnmente usados en la técnica incluyen uno o más lípidos que se unen a ácidos nucleicos y a la superficie celular (por ejemplo, LipofectamineTM).

Repetición de terminal invertida

[0049] Las secuencias de repetición terminal invertida o ITR son las secuencias mínimas necesarias para la integración proviral de AAV y para el empaquetado de ADN de AAV en viriones. Las ITR

participan en una variedad de actividades en el ciclo de vida del AAV. Por ejemplo, las secuencias de ITR desempeñan funciones en la escisión del plásmido después de la transfección, la replicación del genoma del vector y la integración y rescate del genoma de una célula hospedadora.

[0050] Los ácidos nucleicos de la descripción pueden comprender una ITR 5' y/o una ITR 3'. Las secuencias de ITR pueden tener de alrededor de 110 a alrededor de 160 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 o 160 nucleótidos. En algunas modalidades, la ITR 5' tiene la misma longitud que la ITR 3'. En algunas modalidades, la ITR 5' y la ITR 3' tienen longitudes diferentes. En algunas modalidades, la ITR 5' es más larga que la ITR 3', y en otras modalidades, la ITR 3' es más larga que la ITR 5'.

[0051] Las ITR pueden aislarse o derivarse del genoma de cualquier AAV, por ejemplo, los AAV enumerados en la Tabla 1. En algunas modalidades, al menos una de la ITR 5' y la ITR 3' se aísla o deriva del genoma de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32,33, AAVrh74, AAV aviar o AAV bovino. En algunas modalidades, al menos una de la ITR 5' y la ITR 3' puede ser una ITR de tipo salvaje o mutada, aislada y derivada de un miembro de otra especie de parvovirus aparte del AAV. Por ejemplo, en algunas modalidades, una ITR puede ser una ITR de tipo salvaje o mutante aislada o derivada de bocavirus o parvovirus B19.

[0052] En algunas modalidades, la ITR comprende una modificación para promover la producción de un AAV autocomplementario (scAAV). En algunas modalidades, la modificación para promover la producción de un scAAV es la delección de la secuencia de resolución terminal (TRS) del ITR. En algunas modalidades, la ITR 5' es una ITR de tipo salvaje y la ITR 3' es una ITR mutada que carece de la secuencia de resolución terminal. En algunas modalidades, la ITR 3' es una ITR de tipo salvaje y la ITR 5' es una ITR mutada que carece de la secuencia de resolución terminal. En algunas modalidades, la secuencia de resolución terminal está ausente tanto en la ITR 5' como la ITR 3'. En otras modalidades, la modificación para promover la producción de un scAAV es el reemplazo de una ITR con una secuencia formadora de horquilla diferente, tal como una secuencia formadora de ARNhc.

[0053] En algunas modalidades, la ITR 5' o la ITR 3' puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos

99 % idéntica a esta. En algunas modalidades, la ITR 5' o la ITR 3' puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia que es al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a esta. En algunas modalidades, la ITR 5' o la ITR 3' puede comprender la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia que es al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a esta. En algunas modalidades, la ITR 5' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y la ITR 3' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, la ITR 5' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y la ITR 3' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

[0054] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una o más ITR "sustitutas", es decir, secuencias no ITR que cumplen la misma función que las ITR. Véase, por ejemplo, Xie, J. et ál., Mol. Ther., 25 (6): 1363-1374 (2017). En algunas modalidades, una ITR se reemplaza por una ITR sustituta. En algunas modalidades, la ITR sustituta comprende una secuencia formadora de horquilla. En algunas modalidades, la ITR sustituta es una secuencia formadora de ARN horquilla corta (hc).

Promotores, potenciadores, represores y otras secuencias reguladoras

[0055] La expresión génica puede controlarse mediante secuencias de nucleótidos tales como promotores, potenciadores y/o represores unidos operativamente con el gen. El término "operativamente enlazado" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (como un promotor o una matriz de sitios de unión de factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

[0056] En algunas modalidades, los ácidos nucleicos o casetes de transferencia de AAV descritos en la presente comprenden un promotor. El promotor puede ser, por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor inducible. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de tejido. Tal como se usa en la presente, el término "promotor" se refiere a una o más secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico unido de forma operativa. Los promotores pueden incluir secuencias de ácido nucleico cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como un elemento TATA. Los promotores también pueden incluir secuencias de polinucleótidos que actúan en cis que pueden unirse mediante factores de transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo en regulación ambiental y de desarrollo.

[0057] Los ejemplos de promotores que pueden usarse en los ácidos nucleicos y casetes descritos en la presente incluyen un promotor de CMV, un promotor de SV40 (por ejemplo, un promotor de SV40 temprano o tardío), un promotor de metalotioneína, un promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor de polihedrina, un promotor de β -actina de pollo (CBA), un promotor de EF-1 alfa, un promotor de dihidrofolato reductasa (DHFR), un promotor GUSB240 (por ejemplo, un promotor GUSB240 humano (hGUSB240)), un promotor GUSB379 (por ejemplo, un promotor GUSB379 humano (hGUSB379)) y un promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK) (por ejemplo, un promotor de PGK humana (hPGK)). En algunas modalidades, el EF-1 alfa se selecciona de un promotor de EF-1 alfa de tipo salvaje, un promotor corto de EF-1 alfa y un promotor de núcleo de EF-1 alfa. En algunas modalidades, el promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor de β -actina de pollo (CBA), un promotor corto de EF-1 alfa, un promotor de EF-1 alfa de tipo salvaje, un promotor de núcleo alfa de EF-1, un promotor de hPGK, un promotor hGUSB240 y un promotor hGUSB379. En algunas modalidades, el promotor comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-12, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a esta.

[0058] Una lista no taxativa de potenciadores y promotores específicos del tejido que se pueden usar en los ácidos nucleicos y casetes descritos en la presente incluyen: promotor de la reductasa HMG-COA; elemento regulador del colesterol 1 (SRE-1); promotor del fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK); promotor de la proteína C reactiva humana (CRP); promotor de la glucoquinasa humana; promotor del colesterol 7-alfa hidroxilasa (CYP-7); promotor de la beta-galactosidasa alfa-2,6 sialiltransferasa; promotor de la proteína de unión del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1); promotor de la aldolasa B; promotor de la transferrina humana; promotor del colágeno tipo I; promotor de la fosfatasa ácida prostática (PAP); promotor de la proteína 94 secretora prostática (PSP 94); promotor del complejo de antígenos específicos de la próstata; promotor del gen de la calicreína glandular humana (hgt-1); el factor de unión del potenciador específico de miocitos MEF-2; promotor de la creatina-cinasa muscular; promotor de la proteína asociada a la pancreatitis (PAP); potenciador transcripcional de la elastasa 1; promotor de amilasa y elastasa específica del páncreas; promotor del gen de la esterasa del colesterol pancreático; promotor de la uteroglobina; promotor de la escisión de la cadena lateral del colesterol (SCC); promotor de la enolasa gamma-gamma (enolasa específica de la neurona, NSE); promotor de la cadena pesada de neurofilamentos (NF-H); promotor de la CGL-1/granzima B humana; promotor de la desoxi-

transferasa terminal (TdT), lambda 5, VpreB e lck (proteína tirosina quinasa específica de los linfocitos p56lck); promotor de la CD2 humana y su potenciador transcripcional 3'; el promotor de la activación específica de las células NK y T humanas (NKG5); el promotor de la tirosina quinasa pp60c-src; los neoantígenos específicos de los órganos (OSN), el promotor mw 40 kDa (p40); el promotor del antígeno-P específico del colon; el promotor de la alfa-lactalbúmina humana; promotor del fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), promotor de HER2/neu, promotor de la caseína, promotor de IgG, promotor del antígeno coriónico embrionario, promotor de la elastasa, promotor del porfobilinógeno desaminasa, promotor de la insulina, promotor del factor de la hormona del crecimiento, promotor de la tirosina hidroxilasa, promotor de albúmina, promotor de alfa-fetoproteína, promotor del receptor de acetilcolina, promotor de la deshidrogenasa del alcohol, promotor de la globina alfa o beta, promotor del receptor de linfocitos T, promotor de la osteocalcina, promotor del IL-2, promotor del receptor de IL-2, promotor del suero de leche (wap) y promotor del MHC Clase II.

[0059] La expresión génica también puede estar controlada por uno o más elementos "potenciadores" o "represores" distales, que pueden ubicarse hasta varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Los elementos potenciadores o represores regulan la transcripción de una manera análoga a los elementos que actúan en cis cerca del sitio de inicio de la transcripción, con la excepción de que los elementos potenciadores pueden actuar a distancia del sitio de inicio de la transcripción.

[0060] En algunas modalidades, los ácidos nucleicos o casetes de transferencia de AAV descritos en la presente comprenden un potenciador. El potenciador puede estar unido operativamente a un promotor. El potenciador puede ser, por ejemplo, un potenciador de CMV. En algunas modalidades, el potenciador comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o 5, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a esta.

Transgén

[0061] Los ácidos nucleicos y casetes de transferencia de AAV descritos en la presente comprenden una secuencia de transgén para su expresión en una célula objetivo.

[0062] El transgén puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico heteróloga de interés. Los ácidos nucleicos de interés pueden codificar a polipéptidos, que incluyen polipéptidos terapéuticos (por ejemplo, para uso médico o veterinario) o inmunogénicos (por ejemplo, para vacunas) o ARN. En algunas modalidades, el transgén es una secuencia de ADNc.

[0063] En algunas modalidades, el transgén codifica un polipéptido terapéutico. Los polipéptidos terapéuticos incluyen, de modo no taxativo, la proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), distrofina (incluidas las minidistrofinas y microdistrofinas; véase, por ejemplo, Vincent et ál., (1993) *Nature Genetics* 5: 130; publicación de patente estadounidense n.º 2003/017131; publicación internacional WO/2008/088895, Wang et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1 3714-13719 (2000); y Gregorevic et ál., *Mol. Ther.* 16:657-64 (2008)), propéptido de miostatina, follistatina, receptor soluble de activina tipo 11, IGF- 1, polipéptidos antiinflamatorios, tales como el mutante dominante Ikappa B, sarcospan, utrofina (Tinsley et ál., (1996) *Nature* 384:349), mini-utrofina, factores de coagulación (por ejemplo, factor VIII, factor IX, factor X, etc.), eritropoyetina, angiostatina, endostatina, catalasa, tirosina hidroxilasa, superóxido dismutasa, leptina, el receptor LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, alfa-1-antitripsina, adenosina deaminasa, hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, β -glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica A, cetodeshidrogenasa de cadena ramificada, proteína RP65, citocinas (por ejemplo, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleucina-2, interleucina-4, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, linfoxina y similares), factores de crecimiento peptídico, factores neurotróficos y hormonas (por ejemplo, somatotropina, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de los fibroblastos, factor de crecimiento de los nervios, factor neurotrófico 3 y 4, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas morfógenas óseas [incluidas RANKL y VEGF], factor de crecimiento derivado de la glándula, factor de crecimiento transformante α y β , y similares), ácido lisosómico alfa-glucosidasa, alfa-galactosidasa A, receptores (por ejemplo, el receptor soluble del factor de crecimiento de la necrosis tumoral), S100A1, parvalbúmina, adenil ciclasa tipo 6, una molécula que modula la manipulación del calcio (por ejemplo, SERCA_{2A}, inhibidor 1 de PP1 y sus fragmentos [por ejemplo, WO 2006/029319 y WO 2007/100465]), una molécula que efectúa la reducción del receptor cinasa acoplado a la proteína G tipo 2, como un bARKct activo truncado constitutivamente, factores antiinflamatorios como el IRAP, proteínas antimioestatina, aspartoacilasa, anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de cadena única; un ejemplo de Mab es Herceptin[®] Mab), neuropéptidos y fragmentos de éstos (por ejemplo, galanina, neuropéptido Y (véase, U.S. 7,071,172)), los inhibidores de la angiogénesis como las vasohibinas y otros inhibidores del VEGF (por ejemplo, Vasohibin 2 [véase, WO JP2006/073052]). Otros polipéptidos terapéuticos ilustrativos incluyen productos

de genes suicidas (por ejemplo, timidina cinasa, citosina deaminasa, toxina de difteria y factor de necrosis tumoral), proteínas que mejoran o inhiben la transcripción de factores del hospedador (por ejemplo, la nucleasa muerta Cas9 vinculada a un elemento potenciador o inhibidor de la transcripción, proteínas de dedos de cinc vinculadas a un elemento potenciador o inhibidor de la transcripción, efectores similares a los activadores de la transcripción (TAL) vinculados a un elemento potenciador o inhibidor de la transcripción), proteínas que confieren resistencia a un medicamento utilizado en la terapia cancerígena, productos genéticos supresores de tumores (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1), TRAIL, frataxina (FXN), ligando FAS y cualquier otro polipéptido que tenga un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesite. Un transgén también puede ser un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra miostatina (véase, por ejemplo, Fang et ál., *Nature Biotechnology* 23:584-590 (2005)). Los polipéptidos terapéuticos también incluyen aquellos que codifican polipéptidos informantes (por ejemplo, una enzima). En la técnica se conocen los polipéptidos indicadores e incluyen, de modo no taxativo, la proteína verde fluorescente, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, luciferasa y el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa.

15 **[0064]** De manera opcional, el transgén codifica un polipéptido secretado (por ejemplo, un polipéptido que es un polipéptido secretado en su estado nativo o que ha sido modificado para ser secretado, por ejemplo, por asociación operativa con una secuencia de señal secretora, tal como se conoce en la técnica).

[0065] De manera alternativa, en algunas modalidades, el transgén puede codificar un ácido nucleico antisentido, una ribozima (por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5,877,022),

20 ARN que efectúan el corte y emplume mediado por espliceosoma/ram (véase, Puttaraju et ál., (1999) *Nature Biotech.* 17:246; patente estadounidense n.º 6,013,487; patente estadounidense n.º 6,083,702), ARN interferente (ARNi), que incluye ARNip, ARNhc o miARN que median el silenciamiento de genes (véase, Sharp et ál., (2000) *Science* 287:2431) y otros ARN no traducidos, como los ARN “guía” y similares. Los ARN no traducidos ilustrativos son el ARNi contra un producto génico de resistencia a

25 múltiples fármacos (MDR) (por ejemplo, para tratar y/o prevenir tumores y/o para su administración al corazón para evitar daños por quimioterapia), ARNi contra la miostatina (por ejemplo, para la distrofia muscular de Duchenne), ARNi contra el VEGF (por ejemplo, para tratar y/o prevenir tumores), ARNi contra el fosfolambán (por ejemplo, para tratar enfermedades cardiovasculares, véase, por ejemplo, Andino et ál., *J. Gene Med.* 10: 132-142 (2008) y Li et ál., *Acta Pharmacol Sin.* 26:51-55 (2005));

30 moléculas inhibidoras de fosfolambán o dominantes negativas como el fosfolambán S 16E (por ejemplo,

para tratar las enfermedades cardiovasculares, véase, por ejemplo, Hoshijima et ál. Nat. Med. 8:864-871 (2002)), ARNi a la adenosina cinasa (por ejemplo, para la epilepsia) y ARNi dirigidos contra organismos y virus patógenos (por ejemplo, virus de la hepatitis B y/o C, virus de la inmunodeficiencia humana, CMV, virus del herpes simple, el virus del papiloma humano, etc.).

5 **[0066]** Además, la secuencia del transgén puede dirigir el corte y empalme alternativo. A modo ilustrativo, puede administrarse una secuencia antisentido (u otra secuencia inhibitoria) complementaria al sitio de empalme 5' y/o 3' del exón 51 de la distrofina en conjunto con un promotor de ARN nuclear pequeño (np) U1 o U7 para inducir la omisión de este exón. Por ejemplo, una secuencia de ADN que comprende un promotor de ARNnp U1 o U7 localizado en 5' de las secuencias antisentido/inhibidoras
10 puede empaquetarse en un casete y administrarse en un vector AAV de la descripción.

[0067] En algunas realizaciones, la secuencia de transgén puede dirigir la edición génica. Por ejemplo, el transgén puede codificar una molécula de edición génica, tal como un ARN guía o una nucleasa. En algunas modalidades, el transgén puede codificar una nucleasa de dedos de cinc, una endonucleasa autodirigida, una TALEN (nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción), una NgAgo
15 (endonucleasa argonauta), una SGN (endonucleasa guiada por estructura) o una RGN (nucleasa guiada por ARN) como una nucleasa Cas9 o una nucleasa Cpf1.

[0068] El transgén puede compartir homología y recombinarse con un locus en un cromosoma hospedador. Este enfoque puede utilizarse, por ejemplo, para corregir un defecto genético en la célula hospedadora.

20 **[0069]** El transgén puede ser un polipéptido inmunogénico, por ejemplo, para vacunación. El transgén puede codificar cualquier inmunógeno de interés conocido en la técnica, que incluye, de modo no taxativo, inmunógenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV), el virus de la gripe, las proteínas gag del VIH o del SIV, antígenos de tumores, antígenos de cáncer, antígenos bacterianos, antígenos virales y similares.

25 **[0070]** Los vectores de virus según la presente descripción proporcionan un medio para administrar transgenes en una amplia gama de células, incluidas las células en división y las que no se dividen. Los vectores de virus se pueden emplear para suministrar un transgén a una célula *in vitro*, por ejemplo, para producir un polipéptido *in vitro* o para terapia génica *ex vivo*. Los vectores de virus son además útiles en un método para administrar un transgén a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, para expresar un
30 polipéptido inmunogénico o terapéutico o un ARN funcional. De esta manera, el polipéptido o el ARN

funcional pueden producirse in vivo en el sujeto. El sujeto puede necesitar el polipéptido porque tiene una deficiencia de este. Además, el método puede practicarse porque la producción del polipéptido o del ARN funcional en el sujeto puede tener algún efecto beneficioso.

[0071] Los vectores del virus también pueden utilizarse para producir un polipéptido de interés o ARN funcional en células cultivadas o en un sujeto (por ejemplo, mediante el uso del sujeto como biorreactor para producir el polipéptido o para observar los efectos del ARN funcional en el sujeto, por ejemplo, en relación con los métodos de detección).

[0072] En general, los ácidos nucleicos y vectores de virus de la presente descripción pueden emplearse para administrar un transgén que codifica un polipéptido o ARN funcional para tratar y/o prevenir cualquier estado patológico para el que sea beneficioso administrar un polipéptido terapéutico o ARN funcional. Los estados patológicos ilustrativos incluyen, de modo no taxativo: la fibrosis quística (proteína reguladora de la fibrosis quística transmembrana) y otras enfermedades del pulmón, hemofilia A (factor VIII), hemofilia B (factor IX), talasemia (β -globina), anemia (eritropoyetina) y otros trastornos de la sangre. La enfermedad de Alzheimer (GDF; neprilisina), esclerosis múltiple (β -interferón), enfermedad de Parkinson (factor neurotrófico derivado de la línea celular glial [GDNF]), enfermedad de Huntington (ARNi para eliminar las repeticiones), esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia (galanina, factores neurotróficos), y otros trastornos neurológicos, cáncer (endostatina, angiostatina, TRAIL, ligando FAS, citocinas incluyendo interferones; ARNi incluyendo ARNi contra VEGF o el producto del gen de resistencia a múltiples fármacos, mir-26a [por ejemplo, para el carcinoma hepatocelular]), la diabetes mellitus (insulina), las distrofias musculares, incluida Duchenne (distrofina, minidistrofina, factor de crecimiento similar a la insulina I, un sarcoglicano [por ejemplo, α , β , γ], ARN contra el propéptido de miostatina miostática, la follistatina, el receptor soluble de activina de tipo II, los polipéptidos antiinflamatorios como el mutante dominante Ikappa B, sarcospan, utrofina, mini-utrofina, antisentido o ARN contra las uniones de empalme en el gen de la distrofina para inducir la omisión de exón [véase, por ejemplo, WO/2003/095647], antisentido contra ARNs U7 para inducir la omisión de exón [véase, por ejemplo, WO/2006/021724], y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra la miostatina o el propéptido de miostatina) y Becker, enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa), enfermedad de Hurler (α -L-iduronidasa), deficiencia de adenosina deaminasa (adenosina deaminasa), enfermedades por almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, enfermedad de Fabry (α -galactosidasa) y enfermedad de Pompe (alfa-glucosidasa del ácido lisosómico)) y otros trastornos metabólicos, enfisema congénito (alfa-

1-antitripsina), síndrome de Lesch-Nyhan (hipoxantina guanina fosforibosil transferasa), enfermedad de Niemann-Pick (esfingomielinasa), enfermedad de Tay-Sachs (hexosaminidasa lisosómica A), enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (keto deshidrogenasa ácida de cadena ramificada), enfermedades degenerativas de la retina (y otras enfermedades del ojo y la retina; por ejemplo, FDPF para la degeneración macular y/o vasohibina u otros inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis para tratar/prevenir los trastornos de la retina; por ejemplo, en la diabetes de tipo I), enfermedades de órganos sólidos como el cerebro (incluida la enfermedad de Parkinson [GDNF], astrocitomas [endostatina, angiostatina y/o ARN contra el VEGF], glioblastomas [endostatina, angiostatina y/o ARN contra el VEGF]), el hígado, el riñón, el corazón, incluida la insuficiencia cardíaca congestiva o la enfermedad arterial periférica (PAD) (por ejemplo, mediante la administración del inhibidor de la fosfatasa proteica I (I-1) y sus fragmentos (por ejemplo, IIC), serca2a, proteínas de dedo de zinc que regulan el gen del fosfolamban, Barkct, [receptor 32-adrenérgico, receptor 2-adrenérgico cinasa (BARK), fosfoinositido-3 cinasa (PI3 cinasa), S100A1, parvalbúmina, adenil ciclasa tipo 6, una molécula que afecta a la proteína G acoplada a la disminución de la expresión del receptor cinasa tipo 2 como un bARKct truncado constitutivamente activo; cal sarcina, ARNi contra fosfolamban; moléculas inhibitoras o dominantes negativas de fosfolamban como el fosfolamban S16E, etc.), artritis (factores de crecimiento similares a la insulina), trastornos articulares (factor de crecimiento similar a la insulina 1 y/o 2), hiperplasia íntima (por ejemplo, mediante la administración de enos, inos), mejorar la supervivencia de los trasplantes de corazón (superóxido dismutasa), el SIDA (CD4 soluble), la atrofia muscular (factor de crecimiento similar a la insulina I), la deficiencia renal (eritropoyetina), la anemia (eritropoyetina), la artritis (factores antiinflamatorios como el I RAP y el receptor soluble TNFa), hepatitis (a-interferón), deficiencia del receptor LDL (receptor LDL), hiperamonemia (ornitina transcarbamilasa), enfermedad de Krabbe (galactocerebrosidasa), enfermedad de Batten, ataxia de Friedreich (FRDA), ataxias cerebrales espinales incluyendo SCA1, SCA2 y SCA3, fenilcetonuria (fenilalanina hidroxilasa), enfermedades autoinmunes y similares. La descripción puede utilizarse además luego del trasplante de órganos para aumentar el éxito del trasplante y/o reducir los efectos secundarios negativos del trasplante de órganos o de las terapias complementarias (por ejemplo, administrando agentes inmunosupresores o ácidos nucleicos inhibidores para bloquear la producción de citocinas). Como otro ejemplo, se pueden administrar proteínas morfógenas óseas (incluidos BNP 2, 7, etc., RANKL y/o VEGF) con un aloinjerto óseo, por ejemplo, tras una rotura o una extirpación quirúrgica en un paciente con cáncer.

[0073] En algunas modalidades, los vectores de virus descritos en la presente pueden emplearse para administrar un transgén que codifica un polipéptido o ARN funcional para tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno hepático. La enfermedad o trastorno hepático puede ser, por ejemplo, cirrosis biliar primaria, enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), hepatitis autoinmune, hepatitis B, hepatitis C, enfermedad de hígado alcohólico, fibrosis, ictericia, colangitis esclerosante primaria (PSC), síndrome de Budd-Chiari, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, fibrosis alcohólica, fibrosis no alcohólica, esteatosis hepática, síndrome de Gilbert, atresia biliar, deficiencia de alfa-1-antitripsina, síndrome de Alagille, colestasis intrahepática familiar progresiva, hemofilia B, angioedema hereditario (HAE), hipercolesterolemia familiar homocigótica (HoFH), Hipercolesterolemia familiar heterocigótica (HeFH), enfermedad de Von Gierke (GSD I), Hemofilia A, Acidemia metilmalónica, Acidemia propiónica, Homocistinuria, Fenilcetonuria (PKU), Tirosinemia tipo 1, deficiencia de arginasa 1, deficiencia de argininosuccinato de liasa, deficiencia de carbamoil-fosfato sintetasa 1, Citrullinemia Tipo 1, deficiencia de Citrina, Síndrome de Crigler-Najjar Tipo 1, Cistinosis, enfermedad de Fabry, enfermedad por Almacenamiento de glucógeno 1b, deficiencia de LPL, deficiencia de N-acetilglutamato sintetasa, deficiencia de Ornitina Transcarbamilasa, deficiencia de Ornitina Translocasa, Hiperoxaluria Primaria Tipo 1, o ADA SCID.

[0074] Los vectores de virus de la presente descripción se pueden emplear para administrar un transgén usado para producir células madre pluripotentes inducidas (iPS). Por ejemplo, un vector del virus de la descripción puede ser utilizado para entregar ácidos nucleicos asociados a la célula madre en una célula no pluripotente, como fibroblastos adultos, células de la piel, células hepáticas, células renales, células adiposas, células cardíacas, células neurales, células epiteliales, células endoteliales y similares. Los transgenes que codifican los factores asociados con las células madre son conocidos en la técnica. Los ejemplos no taxativos de tales factores asociados con células madre y la pluripotencia incluyen Oct-3/4, la familia SOX (por ejemplo, SOX 1, SOX2, SOX3 y/o SOX 15), la familia Klf (por ejemplo, Klf1, Klf2, Klf3, Klf4 y/o Klf5), la familia Myc (por ejemplo, C-myc, L-myc y/o N-myc), NANOG y/o LIN28.

[0075] Los vectores de virus de la presente descripción pueden emplearse para administrar un transgén para tratar y/o prevenir un trastorno metabólico, tal como la diabetes (por ejemplo, insulina), hemofilia (por ejemplo, Factor IX o Factor VIII), un trastorno de almacenamiento lisosómico, tal como un trastorno de mucopolisacaridosis (por ejemplo, síndrome de Sly [β -glucuronidasa], síndrome de Hurler [alfa-L-iduronidasa], síndrome de Scheie [alfa-L-iduronidasa], síndrome de Hurler-Scheie [alfa-L-iduronidasa],

síndrome de Hunter [iduronato sulfatasa], síndrome de Sanfilippo A [heparán sulfamidasa], B [N-acetilglucosaminidasa], C [acetil-CoA:alfa-glucosaminida acetiltransferasa], D [N-acetilglucosamina 6-sulfatasa], síndrome de Morquio A [galactosas-sulfato sulfatasa], B [β -galactosidasa], síndrome de Maroteaux-Lamy [N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa], etc.), enfermedad de Fabry (alfa-galactosidasa), enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa) o un trastorno de almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, enfermedad de Pompe; alfa-glucosidasa del ácido lisosómico).

[0076] En algunas modalidades, el transgén es útil para tratar la ataxia de Friedreich. En algunas modalidades, el transgén codifica la proteína frataxina (FXN). La proteína frataxina puede ser, por ejemplo, la proteína frataxina humana. A continuación, se proporciona una secuencia de proteína de frataxina humana ilustrativa (SEQ ID NO: 65):

MWTLGRRVAGLLASPSPAQAQTLTRVPRPAELAPLCGRRGLRTDIDATCTPRRASSNQRLN
 QIWNVKKQSVYLMNLRKSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAEFFEDLADKPYTFEDYDVS
 FSGSVLTVKLGGDLGTYVINKQTPNKQIWLSSPSSGPKRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAA
 ELTKALKTKLDLSSLAYSGKDA

Véase también el n.º de acceso de Uniprot Q16595, incorporado mediante referencia en su totalidad. En algunas modalidades, la proteína frataxina tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, al menos 96 % idéntica, al menos 97 % idéntica, al menos 98 % idéntica, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de la proteína frataxina humana. En algunas modalidades, la proteína frataxina tiene una secuencia que es al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, al menos 96 % idéntica, al menos 97 % idéntica, al menos 98 % idéntica, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, la proteína frataxina humana es una isoforma, variante (por ejemplo, una variante de corte y empalme alternativa) o forma mutante de frataxina. En algunas modalidades, la frataxina mutante tiene una o más de las sustituciones mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3: sustituciones de aminoácidos frataxina ilustrativas

Posición de la sustitución (numeración de aminoácidos basada en la SEQ ID NO: 65)	Mutación
106	L → S

122	D → Y
130	G → V
154	I → F
155	W → R
165	R → C
182	L → F
198	L → R
202	W → S
39-40	RR → GG
53-54	RR → GG
78-79	LR → GG
79-80	RK → GG

[0077] En algunas modalidades, el transgén comprende un ADNc de frataxina optimizado por codones en relación con una secuencia de tipo salvaje. Por ejemplo, el ADNc puede modificarse para eliminar sitios donantes/aceptores de empalme crípticos, reducir el uso de codones raros, eliminar sitios de entrada ribosomal, etc. En algunas modalidades, el transgén comprende un ADNc de frataxina optimizado por CpG. Por ejemplo, el ADNc puede modificarse para reducir el número de dinucleótidos CpG.

[0078] En algunas modalidades, el transgén comprende un ADNc de frataxina que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 19, o una secuencia al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, al menos 96 % idéntica, al menos 97 % idéntica, al menos 98 % idéntica, o al menos 99 % idéntica a esta.

En algunas modalidades, el transgén comprende un ADNc de frataxina que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 20, o una secuencia al menos 90 % idéntica, al menos 95 % idéntica, al menos 96 % idéntica, al menos 97 % idéntica, al menos 98 % idéntica, o al menos 99 % idéntica a esta.

Señal de poliadenilación (poliA)

[0079] Las señales de poliadenilación son secuencias de nucleótidos que se encuentran en casi todos los genes de mamíferos y controlan la adición de una hebra de aproximadamente 200 residuos de adenosina (la cola poli (A)) al extremo 3' de la transcripción del gen. La cola de poli (A) contribuye a la estabilidad del ARNm, y los ARNm que carecen de la cola de poli (A) se degradan rápidamente. También existe

evidencia de que la presencia de la cola poli (A) contribuye positivamente a la traducibilidad del ARNm al afectar el inicio de la traducción.

[0080] En algunas modalidades, los ácidos nucleicos y los casetes de transferencia de AAV de la descripción comprenden una o más señales de poliadenilación. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos y los casetes de transferencia de AAV comprenden dos, tres, cuatro o más señales de poliadenilación. La señal de poliadenilación puede ser la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40), α -globina (por ejemplo, α -globina humana, α -globina de ratón o α -globina de conejo), β -globina (por ejemplo, β -globina humana, β -globina de ratón o β -globina de conejo), colágeno humano, virus del polio, hormona de crecimiento humano (hGH) u hormona de crecimiento bovino (bGH), o una variante de estas.

[0081] En algunas modalidades, la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (bGH), por ejemplo, una señal de poliadenilación de bGH que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 21. En algunas modalidades, la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humano (hGH), por ejemplo, una señal de poliadenilación de hGH que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 22. En algunas modalidades, la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación de beta globina humana, por ejemplo, una señal de poliadenilación de beta globina humana que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 23. En algunas modalidades, la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación de beta globina de conejo, por ejemplo, una señal de poliadenilación de beta globina de conejo que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 24. En algunas modalidades, la señal de poliadenilación comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 21-24, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a esta.

[0082] En algunas modalidades, la señal de poliadenilación puede estar presente en el ácido nucleico o casete en orientación inversa. En la orientación inversa, la señal de poliadenilación puede actuar como factor de seguridad. Por ejemplo, la señal de poliadenilación en orientación inversa puede evitar una transcripción significativa del promotor en la dirección inversa.

[0083] En algunas modalidades, un casete de transferencia de AAV o ácido nucleico comprende dos señales de poliadenilación, tales como las señales de poliadenilación de las SEQ ID NO: 21 y 22. En modalidades en las que el casete de transferencia de ácido nucleico o AAV comprende dos señales de poliadenilación, una de las señales puede estar presente en la orientación inversa.

Secuencias de relleno

[0084] Los vectores AAV típicamente aceptan inserciones de ADN que tienen un intervalo de tamaño definido que es generalmente de alrededor de 4 kb a alrededor de 5.2 kb, o un poco más. Por lo tanto, para secuencias de transgén más cortas, puede ser necesario incluir ácido nucleico adicional en el fragmento de inserción con el fin de lograr la longitud requerida que sea aceptable para el vector AAV. La secuencia de relleno puede aislarse o derivarse de una región no codificante (por ejemplo, una región intrónica) de un gen o secuencia de ácido nucleico conocido. La secuencia de relleno puede ser, por ejemplo, una secuencia entre 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1000, 1000-1500, 1500-2000, 2000-2500, 2500- 3000, 3000-3500, 3500-4,000, 4000-4500, 4500-5000, 5500-6,000, 6000-7000, 7000- 8000, o 8000-9000 nucleótidos de longitud. La secuencia de relleno se puede ubicar en el ácido nucleico o casete en cualquier posición deseada de manera que no impida una función o actividad.

[0085] En algunas modalidades, los ácidos nucleicos o casetes de transferencia de AAV de la descripción comprenden una secuencia de relleno. En algunas modalidades, la secuencia de relleno comprende una secuencia intrónica, o una secuencia aislada o derivada de esta. En algunas realizaciones, la secuencia de relleno es una secuencia quimérica. En algunas modalidades, la secuencia de relleno se aísla o deriva de un gen, tal como alfa1-antitripsina o albúmina. En algunas modalidades, la secuencia de relleno se selecciona de la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 25-27, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a esta.

Secuencias intrónicas

[0086] En algunas modalidades, los ácidos nucleicos y/o casetes de transferencia de la descripción pueden comprender una secuencia intrónica. La inclusión de una secuencia intrónica puede reclutar factores para un ARNm transcripto que son importantes para una exportación y traducción nuclear eficaces. Por lo tanto, la inclusión de una secuencia intrónica puede potenciar la expresión en comparación con la expresión en ausencia de la secuencia intrónica.

[0087] En algunas modalidades, la secuencia intrónica es una secuencia híbrida o quimérica. En algunas modalidades, la secuencia intrónica se aísla o se deriva de una secuencia intrónica de uno o más de β -globina, beta-actina de pollo, virus diminuto de ratones (MVM), factor IX, SV40 y/o IgG humana (cadena pesada o ligera). En algunas modalidades, la secuencia intrónica comprende la secuencia de cualquiera de

las SEQ ID NO: 13-16, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a esta.

Secuencias de Kozak

[0088] Una secuencia de Kozak es una secuencia corta que se centra alrededor del sitio de inicio de traducción de los ARNm eucariotas que permiten la iniciación eficiente de la traducción del ARNm. La máquina de traducción ribosómica reconoce el codón de inicio de AUG en el contexto de la secuencia de Kozak.

[0089] En algunas modalidades, los casetes de transferencia de AAV de la descripción pueden comprender una secuencia de Kozak. La secuencia de Kozak puede mejorar la eficacia de la traducción y la expresión general del transgén. La secuencia de Kozak se puede colocar inmediatamente en posición 5' con respecto a la secuencia del transgén o superponerse con la secuencia del transgén.

[0090] Una secuencia de Kozak en un casete de transferencia de ácido nucleico o AAV de la descripción puede ser una secuencia de consenso o una versión modificada de esta. La secuencia de Kozak puede comprender la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 17-18 o 66-70, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a esta.

Ácidos nucleicos y casetes de transferencia de AAV

[0091] En algunas modalidades, un casete de transferencia de ácido nucleico o virus adenoasociado (AAV) comprende uno o más de un potenciador, un promotor, una secuencia intrónica, una secuencia de Kozak, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación y/o una secuencia de relleno. En algunas modalidades, un casete de transferencia de ácido nucleico o virus adenoasociado (AAV) comprende cualquier combinación de un potenciador, un promotor, una secuencia intrónica, una secuencia de Kozak, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación y/o una secuencia de relleno.

[0092] En algunas modalidades, un ácido nucleico o un casete de transferencia de virus adenoasociado (AAV) comprende, de 5' a 3', una repetición terminal invertida (ITR) 5', un promotor, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación y una ITR 3'.

[0093] En algunas modalidades, un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', una ITR 5', un potenciador, un promotor, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación y una ITR 3'.

[0094] En algunas modalidades, un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', una ITR 5', un potenciador, un promotor, una secuencia intrónica, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación y una ITR 3'.

[0095] En algunas modalidades, un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', una ITR 5', un promotor, una secuencia intrónica, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación y una ITR 3'.

[0096] En algunas modalidades, un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', una ITR 5', una señal de poliA (en orientación inversa), un promotor, una secuencia intrónica, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación, una secuencia de relleno y una ITR 3'.

[0097] En algunas modalidades, un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', una ITR 5', una secuencia de relleno, una señal de poliadenilación (en orientación inversa), un promotor, una secuencia intrónica, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación, una secuencia de relleno y una ITR 3'.

[0098] En algunas modalidades, un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', una ITR 5', una secuencia de relleno, una señal de poliadenilación (en orientación inversa), un promotor, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación, una secuencia de relleno y una ITR 3'.

[0099] En algunas modalidades, un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', una ITR 5', un promotor, una secuencia intrónica, una secuencia de transgén, una señal de poliadenilación, una secuencia de relleno y una ITR 3'.

[0100] En cualquiera de las modalidades anteriores, el ácido nucleico o casete de transferencia de AAV puede comprender además una secuencia de Kozak. La secuencia de Kozak puede ubicarse inmediatamente en la posición 5' con respecto a la secuencia del transgén. La secuencia de Kozak puede tener la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 17-18.

[0101] En algunas modalidades, el ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', los elementos mostrados en la Tabla 4, o cualquier subconjunto de estos. En cada fila de la tabla se muestra un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV ilustrativo diferente. Una "x" indica que el elemento indicado está incluido en el ácido nucleico o casete de transferencia de AAV.

Tabla 4: ácidos nucleicos o casetes de transferencia de AAV ilustrativos (de 5' a 3')

ITR 5'	Relleno	poliA	Potenciador	Promotor	Intrón	Kozak	Transgén	PoliA	Relleno	ITR 3'
X			X	X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X			X	X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X		X		X	X	X	X	X	X	X
X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
X	X	X		X		X	X	X	X	X
X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
X		X		X	X	X	X	X	X	X
X				X	X	X	X	X	X	X
X				X	X	X	X	X		X
X		X		X	X	X	X	X		X
X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
X	X	X		X		X	X	X	X	X

ITR 5'	Relleno	poliA	Potenciador	Promotor	Intrón	Kozak	Transgén	PoliA	Relleno	ITR 3'
X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
X		X		X	X	X	X	X	X	X
X				X	X	X	X	X	X	X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X
X				X	X	X	X	X		X

[0102] En cualquiera de las modalidades anteriores, la secuencia del transgén puede codificar la proteína frataxina (FXN). La secuencia del transgén puede tener la secuencia de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 19 o la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el transgén puede codificar una proteína FXN que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 65.

[0103] En cualquiera de las modalidades anteriores, la ITR 5' puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 1, y la ITR 3' puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o 3.

[0104] En cualquiera de las modalidades anteriores, el potenciador puede tener la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 4-5.

[0105] En cualquiera de las modalidades anteriores, el promotor puede tener la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-12.

[0106] En cualquiera de las modalidades anteriores, la secuencia intrónica puede tener la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 13-16.

[0107] En cualquiera de las modalidades anteriores, la señal de poliadenilación puede comprender la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 21-24.

[0108] En cualquiera de las modalidades anteriores, la secuencia de relleno puede comprender la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 25-27.

[0109] En algunas modalidades, el ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende, de 5' a 3', los elementos y secuencias mostrados en la Tabla 5, o cualquier subconjunto de estos. Cada fila de

la tabla muestra un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV ilustrativo diferente. Los números proporcionados en la tabla corresponden a las SEQ ID NO.

Tabla 5: ácidos nucleicos o casetes de transferencia de AAV ilustrativos (de 5' a 3')

ITR 5'	Relleno	poliA	Potenciador	Promotor	Intrón	Kozak	Transgén	PoliA	Relleno	ITR 3'
1			5	6	13	17	19	21		2
1				7	15	17	19	22		2
1				7	14	17	19	21		2
1				11	15	17	19	22		2
1				11	14	17	19	21		2
1				11	16	17	19	22		2
1				12	16	17	19	22		2
1			5	6	13	18	19	21		2
1				7	15	18	19	22		2
1				7	15	18	19	21		2
1				11	15	18	19	22		2
1				11	14	18	19	21		2
1				11	16	18	19	22		2
1				12	16	18	19	22		2
1		23		10	14	18	19	22 + 24	25	3
1	26	23		6	14	18	19	22 + 24	27	3
1	26	23		7	14	18	19	22 + 24	27	3
1	26	23		8		18	19	22 + 24	27	3
1	26	23		10	14	18	19	22 + 24	27	3

ITR 5'	Relleno	poliA	Potenciador	Promotor	Intrón	Kozak	Transgén	PoliA	Relleno	ITR 3'
1		23		7	15	18	19	22 + 24	25	3
1				9	14	18	20	22 + 24	25	2
1				9	14	18	20	22		2
1		23		10	14	17	19	22 + 24		3
1	26	23		6	14	17	19	22 + 24	27	3
1	26	23		7	14	17	19	22 + 24	27	3
1	26	23		8		17	19	22 + 24	27	3
1	26	23		10	14	17	19	22 + 24	27	3
1		23		7	15	17	19	22 + 24	25	3
1				9	14	17	20	22 + 24	25	2
1				9	14	17	20	22		2
1				7	15	17	20	22		2
1				7	15	17	20	22		2
1				7	15	18	19	22		2
1				7	18	18	20	22		2

[0110] En algunas modalidades, el ácido nucleico o casete de transferencia de AAV comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-64, o una secuencia que es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % idéntica a esta.

[0111] Los ácidos nucleicos o casetes de transferencia de AAV descritos en la presente pueden incorporarse en un vector (por ejemplo, un plásmido o un bácmido) mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular. El vector (por ejemplo, plásmido o bácmido) puede comprender además uno o más elementos genéticos usados durante la producción de AAV, que incluye, por ejemplo, genes rep y cap de AAV, y secuencias de proteínas del virus auxiliar.

Métodos de producción de AAV y AAV recombinantes

[0112] Los ácidos nucleicos y casetes de transferencia de AAV, y los vectores (por ejemplo, plásmidos) que comprenden los ácidos nucleicos y casetes de transferencia de AAV descritos en la presente se pueden usar para producir vectores de AAV recombinantes. Los vectores de AAV pueden comprender un genoma de cadena simple o un genoma de cadena doble (es decir, un scAAV). Pueden producirse preparaciones de AAV de título alto mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, tales como métodos de producción de baculovirus o de triple transfección estándar.

[0113] Típicamente, los métodos para la producción de vectores AAV incluyen 4 componentes: plásmidos que actúan en trans y el transgén que actúa en cis. Estos componentes incluyen: 1) un plásmido que contiene los genes Rep y Cap de AAV para la formación y replicación de la cápside, 2) un plásmido que contiene genes auxiliares de adenovirus, 3) un casete que contiene el transgén encerrado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) y 4) una línea celular de empaquetamiento viral. Dado que el AAV es altamente infeccioso y está presente de forma natural en un gran porcentaje de la población humana, los cultivos celulares y todos los materiales pueden analizarse minuciosamente para detectar una infección transitoria por AAV de tipo salvaje antes de su uso.

[0114] En algunas modalidades, un método para producir un vector AAV recombinante comprende poner en contacto una célula productora de AAV (por ejemplo, una célula HEK293) con un ácido nucleico, casete de transferencia o vector (por ejemplo, plásmido) de AAV de la descripción. En algunas modalidades, el método comprende además poner en contacto la célula productora de AAV con uno o más vectores (por ejemplo, plásmidos) adicionales que codifican, por ejemplo, genes rep y cap de AAV, y secuencias de proteínas de virus auxiliares. En algunas modalidades, el método comprende además mantener la célula productora de AAV en condiciones tales que se produzca el AAV.

[0115] En algunas modalidades, un método para producir un vector AAV recombinante comprende poner en contacto una célula productora de AAV (por ejemplo, una célula de insecto, tal como una célula Sf9) con al menos un vector compatible con células de insecto que comprende un ácido nucleico o casete

de transferencia de AAV de la descripción. Un “vector compatible con células de insecto” es cualquier compuesto o formulación, biológica o química, cuya formulación facilite la transformación o transfección de una célula de insecto con un ácido nucleico. En algunas modalidades, el vector compatible con células de insecto es un vector baculoviral. En algunas modalidades, el método comprende además mantener la

5 célula de insecto en condiciones tales que se produzca el AAV.

[0116] En algunas modalidades, una célula productora de AAV se transfecta (por ejemplo, mediante el uso de un reactivo de transfección) con tres plásmidos: (1) un primer plásmido que comprende un ácido nucleico o casete de transferencia de AAV de la descripción, (2) un segundo plásmido que comprende secuencias del gen rep y cap de AAV, y (3) un tercer plásmido que comprende secuencias de proteínas del virus auxiliar. Véase, por ejemplo, la FIG. 5. La célula productora de AAV puede ser cualquiera de las células enumeradas en la Tabla 2. La célula productora de AAV puede mantenerse posteriormente en condiciones tales que se produzca el AAV. A continuación, el AAV puede purificarse mediante el uso de técnicas estándar, tales como centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (CsCl) o técnicas de cromatografía en columna.

[0117] Los vectores de AAV recombinantes producidos pueden comprender una cápside de cualquier serotipo, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32,33, AAVrh74, AAV aviar y AAV bovino. En algunas modalidades, los vectores de AAV recombinantes producidos pueden comprender una proteína de la cápside con una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones y/o deleciones) de aminoácidos en comparación con la cápside de AAV nativa. Por ejemplo, los vectores de AAV recombinantes pueden comprender cápsides de AAV modificados derivados de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32,33, AAVrh74, AAV aviar y AAV bovino. En algunas modalidades, el vector AAV producido es un AAV9. En algunas modalidades, el vector AAV producido es un AAV1. En algunas modalidades, el vector AAV producido es un AAV4.

[0118] Los vectores de AAV recombinantes pueden usarse para transducir células objetivo con la secuencia del transgén, por ejemplo, al poner en contacto el vector de AAV recombinante con una célula objetivo.

Composiciones

[0119] También se proporcionan composiciones que comprenden un ácido nucleico, casete de transferencia de AAV, plásmido, célula o vector de AAV recombinante de la descripción. En algunas modalidades, las composiciones son composiciones líquidas. En algunas modalidades, las composiciones son composiciones sólidas.

[0120] En algunas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico, un casete de transferencia de AAV, un plásmido, una célula o un vector de AAV recombinante de la descripción. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente descripción, y para su uso de acuerdo con la presente descripción, pueden comprender, además de un ácido nucleico, un casete de transferencia de AAV, un plásmido, una célula o un vector de AAV recombinante, un excipiente, portador, amortiguador, estabilizador u otros materiales (por ejemplo, diluyentes, adyuvantes, cargas, conservantes, antioxidantes, lubricantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascarantes, agentes colorantes, agentes saborizantes y agentes edulcorantes). Preferentemente, dichos materiales deberían ser no tóxicos. Es posible encontrar portadores, diluyentes, excipientes adecuados, etc., en textos farmacéuticos estándares. Véanse, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2.^a edición (eds. M. Ash e I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE. UU.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20.^a edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2.^a edición, 1994. La naturaleza exacta del portador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral o mediante inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

[0121] Las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden encontrar en forma de comprimido, cápsula, en polvo o líquida. Un comprimido puede comprender un portador sólido o un adyuvante. En general, las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden un portador líquido, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un portador sólido, tal como gelatina.

[0122] Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o la inyección en el sitio de aflicción, la composición farmacéutica puede encontrarse en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógenos y con pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Las soluciones adecuadas pueden comprender, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como cloruro de sodio, solución de Ringer y/o

solución de Ringer lactato. De ser necesario, se pueden incluir conservantes, estabilizantes, soluciones amortiguadoras, antioxidantes y/u otros aditivos.

Métodos de tratamiento

[0123] Los vectores de AAV de la descripción, incluidos los vectores de AAV preparados mediante el uso de los ácidos nucleicos o casetes de transferencia de AAV de la descripción, se pueden usar para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno u otra afección de un sujeto que lo necesite. El sujeto puede ser un mamífero o un ave. En algunas modalidades, el mamífero es un gato, perro, ratón, rata, caballo, vaca, cerdo, cobayo o primate no humano. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. El ser humano puede ser un sujeto pediátrico, un sujeto adulto o un sujeto geriátrico.

[0124] Los vectores de AAV de la descripción, o las composiciones que los comprenden, pueden ponerse en contacto con una célula *in vivo* o *ex vivo*. A continuación, la célula puede mantenerse en condiciones suficientes para la expresión del transgén en la célula.

[0125] Los vectores de AAV de la descripción, o las composiciones que los comprenden, pueden administrarse a un sujeto que los necesite. La administración puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica. Opcionalmente, el vector y/o la composición de virus se administra en una dosis terapéuticamente eficaz en un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, se administra una dosis terapéuticamente eficaz del vector y/o composición de virus.

[0126] Las dosificaciones del vector del virus y/o las composiciones que se administrarán a un sujeto dependen del modo de administración, la enfermedad o afección a tratar y/o prevenir, la afección del sujeto individual, el vector o composición de virus particular, el ácido nucleico que se va a administrar y similares, y se pueden determinar de manera rutinaria. Las dosis ilustrativas para lograr los efectos terapéuticos son títulos de al menos alrededor de 10^5 , al menos alrededor de 10^6 , al menos alrededor de 10^7 , al menos alrededor de 10^8 , al menos alrededor de 10^9 , al menos alrededor de 10^{10} , al menos alrededor de 10^{11} , al menos alrededor de 10^{12} , al menos alrededor de 10^{13} , al menos alrededor de 10^{14} , al menos alrededor de 10^{15} unidades de transducción, opcionalmente de alrededor de 10^8 a alrededor de 10^{13} unidades de transducción.

[0127] En modalidades particulares, se puede emplear más de una administración (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más administraciones) para lograr el nivel deseado de expresión génica durante un período de varios intervalos, por ejemplo, diaria, semanal, mensual, anual, etc.

[0128] Los modos de administración ilustrativos incluyen oral, rectal, transmucosal, intranasal, por inhalación (por ejemplo, a través de un aerosol), bucal (por ejemplo, sublingual), vaginal, intratecal, intraocular, transdérmico, en el útero (o in ovo), parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular (incluida la administración al músculo esquelético, del diafragma y/o cardíaco), intradérmica, intrapleural, intracerebral e intraarticular), tópica (por ejemplo, tanto en la piel como en las superficies mucosas, incluidas las superficies de las vías respiratorias, y la administración transdérmica), intralinfática y similares, así como inyección directa en tejidos u órganos (por ejemplo, en el hígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo del diafragma o cerebro). La administración también puede hacerse a un tumor (por ejemplo, en un tumor o un ganglio linfático o cerca de él). La vía más adecuada en cada caso dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección que se trate y/o se prevenga y de la naturaleza del vector concreto que se utilice.

[0129] En algunas modalidades, un vector AAV o composición que comprende el vector puede administrarse mediante inyección directa en tejido cardíaco o sistema nervioso central (SNC). En algunas modalidades, el vector AAV o composición que comprende el vector puede administrarse intracranealmente, incluida la administración intratecal, intraneural, intracerebral o intraventricular. En algunas modalidades, el vector AAV o la composición que comprende el vector, se puede administrar al corazón mediante administración directa en el miocardio mediante inyección epicárdica seguida de minitoractomía, inyección intracoronaria o inyección endomiocárdica.

[0130] La administración a un tejido objetivo también puede lograrse mediante la administración de un depósito que comprenda el vector del virus y/o la cápside. En modalidades representativas, se implanta un depósito que comprende el vector y/o cápside del virus en el tejido muscular esquelético, cardíaco y/o del diafragma, o bien se puede poner en contacto el tejido con una película u otra matriz que comprenda el vector y/o cápside del virus. Tales matrices o sustratos implantables se describen en la patente estadounidense núm. 7,201,898.

[0131] La administración de un AAV puede dar como resultado una expresión transgénica potente y persistente en una célula o tejido objetivo. Por ejemplo, la expresión transgénica puede persistir durante al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses o más.

[0132] En algunas modalidades, un método para tratar a un sujeto que lo necesita comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico, un casete de transferencia de AAV, un plásmido, una célula o un AAV recombinante de la descripción. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto humano. En algunas modalidades, el sujeto padece ataxia de Friedrich.

5 La administración puede dar como resultado la expresión de una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína FXN en un tejido del SNC (por ejemplo, un tejido neuronal) o en un tejido cardíaco del sujeto.

[0133] En algunas modalidades, la administración puede dar como resultado el alivio de uno o más síntomas de la ataxia de Friedrich. Por ejemplo, la administración puede (1) mejorar la coordinación (ataxia) en los brazos y piernas del sujeto, (2) aumentar los niveles de energía y/o disminuir la fatiga y la
10 pérdida muscular en el sujeto, (3) mejorar la visión, la pérdida de audición o habla en el sujeto, (3) disminuir la escoliosis o la velocidad de progresión de esta, (4) mejorar los síntomas de diabetes, tales como sensibilidad a la insulina, o (5) mejorar afecciones cardíacas, tales como miocardiopatía hipertrófica o arritmia. La mejora en el sujeto debido al tratamiento puede ser una mejora en comparación con el sujeto antes del tratamiento o en comparación con sujetos típicos con ataxia de Friedrich.

15 **[0134]** En algunas modalidades, la administración puede dar como resultado una extensión de la vida del sujeto. Por ejemplo, la administración puede extender la vida del sujeto en alrededor de 1 año, alrededor de 2 años, alrededor de 3 años, alrededor de 4 años, alrededor de 5 años, alrededor de 5-10 años o más de 10 años en comparación con un sujeto típico que tiene ataxia de Friedrich.

EJEMPLOS

20 **[0135]** Los siguientes ejemplos, que se incluyen en la presente únicamente con fines ilustrativos, no pretenden ser taxativos.

Ejemplo 1: Preparación de un vector de AAV recombinante en células de mamífero

[0136] Se proporcionan tres plásmidos. El primer plásmido comprende un casete de transferencia que comprende un ADNc que codifica frataxina humana (SEQ ID NO: 19 o 20) flanqueado por dos ITR (SEQ
25 ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o 3) y tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-64. El segundo plásmido comprende secuencias que codifican los genes Rep y Cap. El tercer plásmido comprende varias secuencias “auxiliares” necesarias para la producción de AAV (E4, E2a y VA).

[0137] Los tres plásmidos se transfectan en células de producción viral (por ejemplo, HEK293) mediante el uso de un reactivo de transfección apropiado (por ejemplo, LipofectamineTM). Después de la

incubación a 37 °C durante un período de tiempo predeterminado, las partículas de AAV se recogen del medio o las células se lisan para liberar las partículas de AAV. Las partículas de AAV se entonces se purifican, titulan y se pueden almacenar a -80°C para su uso posterior.

Ejemplo 2: Preparación de un vector AAV recombinante en células de insectos

5 **[0138]** Se proporciona un primer vector baculoviral recombinante. El primer vector baculoviral recombinante comprende una secuencia de casete de transferencia que comprende un ADNc que codifica frataxina humana (SEQ ID NO: 19 o 20) flanqueado por dos ITR (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o 3), donde el casete de transferencia tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-64.

10 **[0139]** Las células de insecto (por ejemplo, Sf9) se coinfectan en cultivo en suspensión con el primer vector baculoviral recombinante y al menos un vector baculoviral recombinante adicional que comprende secuencias que codifican las proteínas Rep y Cap de AAV. Después de la incubación a 28°C durante un período de tiempo predeterminado, las partículas de AAV se recogen del medio o las células se lisan para liberar las partículas de AAV. Las partículas de AAV se entonces se purifican, titulan y se pueden almacenar a -80°C para su uso posterior.

15

Ejemplo 3: el transgén de FXN de empaquetamiento de AAV recombinante transduce células cardíacas *in vivo* y extiende la vida de los ratones deficientes en FXN

20 **[0140]** Se preparó un plásmido que comprendía un casete de transferencia de AAV (SEQ ID NO: 32), que incluía un transgén de FXN humana, mediante el uso de técnicas de clonación estándar (plásmido de FXN). Se preparó una composición que comprende el plásmido de FXN, un segundo plásmido que comprende secuencias que codifican los genes Rep y Cap de AAV(AAV9) y un tercer plásmido que comprende secuencias que codifican secuencias auxiliares de AAV y se usó para transfectar células HEK293 mediante el uso de un protocolo estándar de “triple transfección”. Las células HEK293 se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar (37 °C, CO₂ al 5 %) para permitir la producción de

25 vectores AAV9 autocomplementarios recombinantes. Este procedimiento se repitió varias veces y el rendimiento del vector AAV9 se cuantificó mediante el uso de ddPCR®. Tal como se muestra en la **FIG. 1**, el rendimiento de AAV9 que empaqueta el transgén de FXN (AAV9-FXN) en cada corrida fue de entre 10¹³ y 10¹⁴ genomas de vector.

[0141] El AAV9-FXN recombinante se utilizó para transducir células Lec2 en cultivo. **FIG. 4** muestra la expresión de FXN humana (ng/mg) en células Lec2 cultivadas transducidas con varias dosis de AAV9-FXN. Se observó una mayor expresión de hFXN a las dosis más altas de vector utilizadas.

[0142] El AAV9-FXN recombinante también se usó para infectar ratones que carecían de FXN en el músculo cardíaco y esquelético ($FXN^{fllox/fllox}MCKCre^{+}$). Los ratones se trataron con solución salina o AAV9-FXN (5×10^{13} vg/kg) a las 3 semanas de edad y se controló la supervivencia. Tal como se muestra en la **FIG. 2**, el tratamiento con AAV9-FXN aumentó significativamente la vida. La mediana de supervivencia de los ratones inyectados con solución salina fue de 64 días, mientras que la mediana de supervivencia de los ratones inyectados con AAV9-FXN fue de 138,5 días.

[0143] En un experimento separado, los ratones deficientes en FXN se trataron con solución salina o con una dosis baja o alta de AAV9-FXN (1×10^{13} o 5×10^{13} vg/kg, respectivamente) a las 3 semanas de edad. Los ratones se sacrificaron 3 semanas después del tratamiento y se analizó el tejido cardíaco. Tal como se muestra en la **FIG. 3A**, el ADN de FXN humana (hFXN) fue detectable en tejido cardíaco de ratones tratados con AAV9-FXN. El ADN de hFXN se transcribió a ARN (**FIG. 3B**) y se tradujo a proteína (**FIG. 3C**). La dosis más alta de AAV9-FXN condujo a niveles más altos de ADN, ARN y proteína de FXN en las muestras de corazón.

[0144] Tomados en conjunto, estos datos muestran que un casete de transferencia de AAV de la descripción que comprende el transgén de FXN puede usarse para producir vectores AAV recombinantes y puede usarse para transducir las células de un sujeto *in vivo*.

MODALIDADES NUMERADAS

[0145] Sin perjuicio de las reivindicaciones adjuntas, la descripción establece las siguientes modalidades numeradas de la descripción:

[0146] 1. Un ácido nucleico que comprende, de 5' a 3': una repetición terminal invertida (ITR) 5';
5 un promotor; un transgén; una señal de poliadenilación; y una ITR 3'; donde el transgén codifica la proteína frataxina (FXN).

[0147] 2. El ácido nucleico de la modalidad 1, donde al menos una de la ITR 5' y la ITR 3' tiene una longitud de alrededor de 110 a alrededor de 160 nucleótidos.

[0148] 3. El ácido nucleico de la modalidad 1 o 2, donde la ITR 5' tiene la misma longitud que la
10 ITR 3'.

[0149] 4. El ácido nucleico de la modalidad 1 o 2, donde la ITR 5' y la ITR 3' tienen longitudes diferentes.

[0150] 5. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-4, donde al menos una de la ITR 5' y la ITR 3' se aísla o derivar del genoma de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8,
15 AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32,33, AAVrh74, AAV aviar o AAV bovino.

[0151] 6. El ácido nucleico de la modalidad 1, donde la ITR 5' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

[0152] 7. El ácido nucleico de la cualquiera de las modalidades 1-6, donde la ITR 3' comprende la
20 secuencia de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

[0153] 8. El ácido nucleico de la cualquiera de las modalidades 1-7, donde la ITR 3' comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

[0154] 9. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-8, donde el promotor dirige la expresión del transgén.

[0155] 10. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-9, donde el promotor es un promotor
25 constitutivo.

[0156] 11. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-9, donde el promotor es un promotor inducible.

[0157] 12. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-11, donde el promotor es un promotor
30 específico del tejido.

- [0158]** 13. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-12, donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor de CMV, el promotor temprano de SV40, el promotor tardío de SV40, el promotor metalotioneína, el promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor de la polihedrina, el promotor de la β -actina de pollo (CBA), el promotor de EF-1 alfa, el promotor corto de EF-1 alfa, el promotor de núcleo de EF-1 alfa, el promotor de dihidrofolato reductasa (DHFR), el promotor GUSB240, el promotor GUSB379 y el promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK).
- [0159]** 14. El ácido nucleico de la modalidad 13, donde el promotor es el promotor de β -actina de pollo (CBA).
- [0160]** 15. El ácido nucleico de la modalidad 13, donde el promotor es el promotor de EF-1 alfa, el promotor corto de EF-1 alfa o el promotor de núcleo de EF-1 alfa.
- [0161]** 16. El ácido nucleico de la modalidad 13, donde el promotor es el promotor GUSB240.
- [0162]** 17. El ácido nucleico de la modalidad 13, donde el promotor es el promotor GUSB379.
- [0163]** 18. El ácido nucleico de la modalidad 13, donde el promotor es el promotor de PGK.
- [0164]** 19. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-12, donde el promotor comprende una secuencia seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 6-12, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.
- [0165]** 20. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-19, donde la proteína FXN es una proteína FXN humana.
- [0166]** 21. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-20, donde la proteína FXN tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 65, o una secuencia que es al menos 95 % idéntica a esta.
- [0167]** 22. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1 a 21, donde la secuencia de transgén está optimizada por CpG.
- [0168]** 23. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-21, donde la secuencia de transgén comprende la SEQ ID NO: 19 o 20, o una secuencia que es al menos 95 % idéntica a esta.
- [0169]** 24. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-24, donde el ácido nucleico comprende una secuencia de Kozak inmediatamente 5' con respecto a la secuencia de transgén.
- [0170]** 25. El ácido nucleico de la modalidad 24, donde la secuencia de Kozak comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17 o 18, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.

- [0171]** 26. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-25, donde la señal de poliadenilación se selecciona de la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40), α -globina humana, α -globina de conejo, β -globina humana, β -globina de ratón, colágeno humano, virus de polio, hormona de crecimiento humano (hGH) y hormona de crecimiento bovino (bGH).
- 5 **[0172]** 27. El ácido nucleico de la modalidad 26, donde la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino.
- [0173]** 28. El ácido nucleico de la modalidad 26, donde la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humano.
- [0174]** 29. El ácido nucleico de la modalidad 26, donde la señal de poliadenilación es la señal de
10 poliadenilación de β -globina humana.
- [0175]** 30. El ácido nucleico de la modalidad 26, donde la señal de poliadenilación es la señal de poliadenilación de β -globina de conejo.
- [0176]** 31. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-25, donde la señal de poliadenilación comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 21-24, o una secuencia al menos 95 % idéntica
15 a esta.
- [0177]** 32. El ácido nucleico de una cualquiera de las modalidades 1-31, donde el ácido nucleico comprende además un potenciador.
- [0178]** 33. El ácido nucleico de la modalidad 32, donde el potenciador es un potenciador de CMV.
- [0179]** 34. El ácido nucleico de la modalidad 32, donde el potenciador comprende la secuencia de la
20 SEQ ID NO: 4 o 5, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.
- [0180]** 35. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-34, donde el casete comprende además una secuencia intrónica.
- [0181]** 36. El ácido nucleico de la modalidad 35, donde la secuencia intrónica es una secuencia quimérica.
- 25 **[0182]** 37. El ácido nucleico de la modalidad 35, donde la secuencia intrónica es una secuencia híbrida.
- [0183]** 38. El ácido nucleico de la modalidad 35, donde la secuencia intrónica comprende secuencias aisladas o derivadas de secuencias intrónicas de una o más de β -globina, beta-actina de pollo, virus diminuto de ratón e IgG humana.

- [0184]** 39. El ácido nucleico de la modalidad 35, donde la secuencia intrónica comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 13-16, o una secuencia al menos 95 % idéntica a estas.
- [0185]** 40. El ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-39, donde el ácido nucleico comprende además al menos una secuencia de relleno.
- 5 **[0186]** 41. El ácido nucleico de la modalidad 40, donde el ácido nucleico comprende dos secuencias de relleno.
- [0187]** 42. El ácido nucleico de la modalidad 40, donde la al menos una secuencia de relleno comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 25-27, o una secuencia al menos 95 % idéntica a estas.
- 10 **[0188]** 43. El ácido nucleico de la modalidad 1, donde el ácido nucleico comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-64, o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta.
- [0189]** 44. Un plásmido que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-43.
- [0190]** 45. Una célula que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-43 o el plásmido de la modalidad 44.
- 15 **[0191]** 46. Un método para producir un vector de AAV recombinante, donde el método comprende poner en contacto una célula productora de AAV con el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-43 o el plásmido de la modalidad 44.
- [0192]** 47. Un vector de AAV recombinante producido por el método de la modalidad 46.
- [0193]** 48. El vector AAV recombinante de la modalidad 47, donde el vector AAV recombinante es
- 20 un AAV de cadena simple (ssAAV).
- [0194]** 49. El vector de AAV recombinante de la modalidad 47, donde el vector AAV recombinante es un AAV autocomplementario (scAAV).
- [0195]** 50. El vector AAV recombinante de cualquiera de las modalidades 47-49, donde el vector AAV comprende una proteína de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh32,33, AAVrh74, AAV aviar o AAV bovino.
- 25 **[0196]** 51. El vector de AAV recombinante de cualquiera de las modalidades 47-49, donde el vector AAV comprende una proteína de la cápside con una o más sustituciones o mutaciones en comparación con una proteína de la cápside de AAV de tipo salvaje.

[0197] 52. Una composición que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-43, el plásmido de la modalidad 44, la célula de la modalidad 45 o el vector AAV recombinante de cualquiera de las modalidades 47-51.

[0198] 53. Un método para tratar un sujeto que lo necesita que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 1-43, el plásmido de la modalidad 44, la célula de la modalidad 45 o el vector AAV recombinante de cualquiera de las modalidades 47-41.

[0199] 54. El método de la modalidad 53, donde el sujeto tiene ataxia de Friedreich.

[0200] 55. El método de la modalidad 53 o 54, donde el sujeto es un sujeto humano.

[0201] 56. El método de cualquiera de las modalidades 53-55, donde el ácido nucleico, el plásmido, la célula o el vector AAV recombinante se administra mediante inyección directa en el sistema nervioso central.

[0202] Lo que antecede es ilustrativo de la presente invención, y no se debe interpretar como que la limita. La invención se define por las siguientes reivindicaciones, con los equivalentes de las reivindicaciones que se incluyen en esta.