

TRATAMIENTO DEL ANGIOEDEMA HEREDITARIO CON VECTORES DE TERAPIA DE GENES ESPECÍFICOS DEL HÍGADO

CAMPO

[0001] Aquí se proporcionan vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) y partículas de virus para tratar el angioedema hereditario consiguiendo la expresión a largo plazo del inhibidor de esterasa C1 (C1EI o C1-INH) en el hígado de un sujeto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El angioedema hereditario (HAE) está causado por mutaciones en el gen C1EI, al que se hace referencia como SERPINAG1. La mayoría de los pacientes (85%) tienen niveles bajos de C1EI (conocido como HAE tipo I), mientras que una minoría (15%) tiene niveles normales o elevados de C1EI mutado que es disfuncional (conocido como HAE tipo II). Existe un tercer tipo de HAE (HAE de Tipo III) en el que los pacientes tienen la proteína C1EI normal pero tienen una mutación en otros genes, tal como el gen del Factor XII, que causa el HAE. El HAE de tipo I y II, caracterizado por una deficiencia en el inhibidor de la esterasa C1 plasmática funcional, puede dar lugar a crisis inflamatorias debido a la activación no regulada de la vía del complemento y/o vía de activación por contacto. Las crisis se presentan con síntomas de urticaria y/o angioedema, como hinchazón de la piel y/o mucosas (edema subcutáneo o edema submucoso), incluidos los tractos respiratorio y gastrointestinal. La inflamación de la laringe puede causar asfixia fatal. Los episodios recurrentes de hinchazón severa pueden afectar brazos, piernas, cara, tracto intestinal y vías respiratorias que son dolorosas, desfigurantes y, a veces, potencialmente mortales si obstruyen la respiración. Si no se trata, la condición tiene una tasa de mortalidad del 25%. Se estima que el HAE afecta a 1 de cada 50,000 a 100,000 personas en todo el mundo.

[0003] Las crisis de HAE pueden desencadenarse por procedimientos quirúrgicos o dentales menores o traumatismos, infecciones, estrés y el uso de medicaciones, especialmente inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y estrógenos. Las crisis agudas se tratan típicamente con proteína C1EI, plasma fresco congelado, proteína C1EI derivada de plasma, ecallantida (un inhibidor de la calicreína) y/o icatibant (un antagonista del receptor de bradiquinina B2). La terapia profiláctica convencional incluye proteína C1EI derivada de plasma, andrógenos

atenuados como danazol, agentes antifibrinolíticos y progesterona, aunque cada uno de estos tiene efectos adversos. El tratamiento de mujeres embarazadas representa un problema porque los andrógenos y los agentes antifibrinolíticos están contraindicados durante el embarazo.

[0004] C1EI es un inhibidor de serina proteasa, que inhibe directa o indirectamente varias proteasas asociadas con ataques de HAE. Es un inhibidor principal de varias proteasas del complemento, como C1r y C1s, y proteasas de contacto, que incluyen el factor XIIa y la calicreína, y un inhibidor menor de las proteasas fibrinolíticas, tal como la plasmina y el factor XIa. En pacientes con HAE, la activación desinhibida de la vía de contacto debido a niveles insuficientes de C1-INH funcional da como resultado la escisión no regulada del cininógeno de alto peso molecular por la calicreína, lo que lleva a la generación de bradisinina libre excesiva, un péptido vasoactivo potente que aumenta la permeabilidad capilar y el edema. Véase, por ejemplo, Riedl M. "Recombinant human C1 esterase inhibitor in the management of hereditary angioedema." Clin Drug Investig. 2015;35(7):407–417.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0005] Las modalidades descritas aquí se refieren a un constructo de vector, una partícula de AAV de replicación recombinante deficiente, células y composiciones farmacéuticas para administrar un inhibidor de esterasa C1 humano funcional (C1EI) a un sujeto que lo necesita, particularmente un sujeto con angioedema hereditario, o una deficiencia en C1EI funcional. Las modalidades descritas aquí también se refieren al uso de tales partículas AAV o tales constructos de vector para suministrar un gen que codifica C1EI humano a células hepáticas de pacientes (sujetos humanos) diagnosticados con angioedema hereditario o una deficiencia en C1EI funcional.

[0006] En un aspecto, las modalidades descritas aquí proporcionan un constructo de vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de esterasa C1 funcional (C1EI). En una o más modalidades, el C1EI funcional comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 95% o 98% idéntica a los aminoácidos 23-500 de SEQ ID NO: 2 (un C1EI humano o "hC1EI"). En modalidades de ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el C1EI funcional es una secuencia de tipo silvestre, de la cual SEQ ID NO: 1 es un ejemplo, o tiene codones optimizados, o es una variante. Las secuencias que codifican C1EI humanas optimizadas con codones alternativos se establecen en las SEQ ID NO: 10-13, 59 o 60. En modalidades de ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el C1EI

funcional comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90% de homología con al menos 100, 200, 300, 400 o 500 bases consecutivas de SEQ ID NO: 1 o 10-13, 59 o 60, y que codifica el inhibidor de esterasa C1 humano funcional (hC1EI) al menos 95% idéntica a los aminoácidos 23-500 de SEQ ID NO: 2. La secuencia codificante de hC1EI es, en algunas modalidades, codón optimizado para la expresión en humanos. En una modalidad, el ácido nucleico de hC1EI optimizado por codones comprende un contenido reducido de nucleótidos CpG. En una modalidad específica, el contenido de dinucleótidos de CpG es menor de 25.

[0007] En una o más modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica C1EI está operativamente unida a uno o más elementos de control de expresión heterólogos. Preferiblemente, la expresión del transgén que codifica hC1EI se controla mediante elementos de control de la expresión específicos del hígado. Por tanto, en tales modalidades, en los constructos de vector descritas aquí, la secuencia de ácido nucleico que codifica C1EI está operativamente unida a una región reguladora de la transcripción heteróloga específica del hígado. En algunas modalidades, en los constructos de vector descritas aquí, los elementos de control de la expresión incluyen uno o más de los siguientes: un promotor y/o potenciador; opcionalmente un intrón; y una señal de poliadenilación (poliA). Dichos elementos se describen adicionalmente aquí.

[0008] La región reguladora de la transcripción específica del hígado puede comprender uno o más elementos de control de la expresión específicos del hígado. En una o más modalidades, la región reguladora de la transcripción específica del hígado es una secuencia promotora sintética que comprende porciones de un promotor de alfa-1-antitripsina (hAAT) humana, un potenciador de la región de control hepático (HCR) y/o un potenciador de la apolipoproteína E (ApoE). En algunas modalidades, la región reguladora de la transcripción específica del hígado comprende (a) una secuencia potenciadora de ApoE acortada al menos en un 90% idéntica a la SEQ ID NO: 16; (b) una secuencia promotora proximal de alfa anti-tripsina (hAAT) al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 3, (c) uno o más potenciadores seleccionados del grupo que consiste en (i) un potenciador de ApoE/HCR al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 4, (ii) una región X distal del promotor AAT, y (iii) una región distal del promotor AAT. En una modalidad de ejemplo, la secuencia de la región reguladora de la transcripción específica del hígado comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la región reguladora de la transcripción específica del hígado comprende (a) una secuencia

potenciadora de α -microglobulina al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 17, y/o (b) un promotor proximal alfa anti-tripsina (AAT) al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 3.

[0009] En algunas modalidades, el constructo de vector comprende uno o más intrones. En algunas modalidades, el intrón también potencia la expresión del ácido nucleico que codifica C1EI y, opcionalmente, potencia la expresión en el hígado. En una o más modalidades, el intrón es una secuencia compuesta de intrón de hAAT/hemoglobina. En una modalidad de ejemplo, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 6, o una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 61. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica C1EI comprende el intrón.

[0010] En algunas modalidades, el constructo de vector comprende una señal de poliadenilación, opcionalmente una señal poliA de hormona de crecimiento bovina (bGH) (por ejemplo, SEQ ID NO: 19) o preferiblemente una señal poliA de hormona de crecimiento humana (hGH) (por ejemplo, SEQ ID NO: 7).

[0011] El constructo de vector es preferiblemente un constructo de vector de AAV recombinante. En algunas modalidades, el constructo de vector comprende (a) una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) AAV 5' (por ejemplo, SEQ ID NO: 54); (b) un promotor y/o potenciador, por ejemplo, una región reguladora de la transcripción específica del hígado; (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína inhibidora de la esterasa C1 humana funcionalmente activa o un fragmento de la misma; y (d) una AAV3' ITR (por ejemplo, SEQ ID NO: 55). El AAV 5' ITR y/o AAV 3' ITR pueden ser de un pseudotipo de AAV heterólogo (que puede o no modificarse como se conoce en la técnica). En algunas modalidades, las secuencias 5' ITR y 3' ITR se derivan de AAV2. En una o más modalidades, el constructo de vector es un genoma de vector de AAV de aproximadamente 3 kb a aproximadamente 5 kb de tamaño, o de aproximadamente 2,7 kb a aproximadamente 4 kb de tamaño. En una o más modalidades, el constructo de vector es un genoma de vector de AAV de aproximadamente 2,7 kb a aproximadamente 3,3 kb de tamaño, o de aproximadamente 3,7 kb a aproximadamente 4,1 kb de tamaño, por ejemplo, SEQ ID NO 57 y 58.

[0012] En modalidades de ejemplo, el constructo de vector comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 9, 20-36 o 57-58.

[0013] En otro aspecto, se proporciona aquí una partícula de virus adenoasociado

recombinante (rAAV) que comprende una cápsida de AAV y el constructo de vector como se describe en una o más de las modalidades aquí. En algunas modalidades, la partícula de AAV recombinante (rAAV) usada para suministrar el gen que codifica C1EI ("rAAV.SERPINA G1" o "AAV-SERPINA G1") tiene tropismo para el hígado. En tales modalidades, el rAAV comprende una cápsida de AAV con tropismo hepático, por ejemplo, una cápsida de AAV5 al menos en un 90% idéntica a SEQ ID NO: 46, o una cápsida de AAV de simio, opcionalmente una cápsida de AAV derivada de babuino o una variante de la misma, que presenta tropismo hepático. En una o más modalidades, la cápsida de AAV es una cápsida para la que la inmunidad humoral preexistente es similar a AAV5, o está reducida en comparación con AAV5, por ejemplo, cuando se evalúa mediante neutralización de IVIG *in vitro*.

[0014] En otro aspecto, aquí se proporcionan métodos para la producción de una partícula de AAV, útil como vector de suministro de genes, el método que comprende los pasos de: (1) proporcionar una célula de insecto que comprende uno o más constructos de ácido nucleico (a) que comprende un constructo de vector como se describe aquí que comprende un ácido nucleico como se describe aquí que está flanqueado por dos secuencias de nucleótidos AAV ITR; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas Rep de AAV que está operativamente unida a un promotor que es capaz de dirigir la expresión de la(s) proteína(s) Rep en una célula de insecto (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas de la cápsida de AAV que está operativamente enlazado a un promotor que es capaz de dirigir la expresión de la(s) proteína(s) de la cápsida en la célula del insecto; en donde (b) y (c) están en el mismo casete de expresión o en dos casetes de expresión diferentes; y (d) opcionalmente genes que codifican AAP y MAAP contenidos en el VP2/3; (2) cultivar la célula de insecto definida en (1) en condiciones que conduzcan a la expresión de la Rep y las proteínas de la cápsida; y, opcionalmente (3) recuperar la partícula de AAV.

[0015] En otro aspecto más, se proporcionan aquí composiciones farmacéuticas que comprenden el constructo de vector descrito aquí o la partícula de rAAV descrita aquí, y un diluyente, excipiente o portador estéril farmacéuticamente aceptable.

[0016] En un aspecto adicional, aquí se proporcionan métodos para suministrar un gen C1EI a un sujeto mamífero. Dichos métodos incluyen métodos para expresar C1EI en un sujeto mamífero que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende el constructo de vector descrito aquí, la partícula de rAAV descrita aquí o la composición farmacéutica descrita aquí, expresando así la proteína C1EI

codificada en el sujeto. Preferiblemente, en tales métodos, el mamífero es un ser humano y el C1EI es C1EI humano funcional como se describe aquí. Dichos métodos incluyen un método para expresar C1EI en el hígado de un mamífero mediante la administración de una cantidad del constructo de vector, partícula de rAAV o composición farmacéutica efectiva para aumentar el nivel de expresión de C1EI en el hígado del mamífero. Dichos métodos también incluyen un método para aumentar el nivel de C1EI funcional en la sangre de un mamífero mediante la administración de una cantidad del constructo de vector, partícula rAAV o composición farmacéutica efectiva para aumentar el nivel de C1EI funcional en la sangre de un mamífero. Dichos métodos también incluyen un método para tratar una deficiencia en C1EI funcional en un mamífero mediante la administración de una cantidad del constructo de vector, partícula rAAV o composición farmacéutica efectiva para aumentar el nivel de C1EI funcional en la sangre de un mamífero. En algunas modalidades, la cantidad de construcción de vector, partícula de rAAV o composición farmacéutica es efectiva para aumentar el nivel de C1EI funcional en sangre a aproximadamente 0.4 UI/ml o 1 UI/ml o más, o el nivel de C1EI a aproximadamente 16 mg/dL o más.

[0017] Dichos métodos también incluyen un método para tratar el angioedema hereditario en un mamífero, o tratar o prevenir cualquier síntoma del mismo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del constructo de vector, partícula de rAAV o composición farmacéutica. En una o más modalidades, tales métodos reducen la frecuencia o gravedad del edema submucoso o subcutáneo en el mamífero, los ataques agudos de HAE o la cantidad de terapia a demanda administrada para tratar los ataques agudos de HAE.

[0018] En cualquiera de los métodos descritos aquí, la partícula rAAV se suministra a una dosis de aproximadamente 1×10^{12} a aproximadamente 1×10^{14} vg/kg, o 1×10^{15} vg/kg, o alternativamente aproximadamente 2×10^{12} a aproximadamente 6×10^{13} vg/kg, o alternativamente aproximadamente 6×10^{13} vg/kg a aproximadamente 1×10^{15} vg/kg.

[0019] En una suspensión acuosa. En cualquiera de los métodos descritos aquí, la administración del constructo de vector, partícula rAAV o composición farmacéutica puede comprender además la administración de un tratamiento profiláctico o terapéutico con corticosteroides y/o puede incluir además la administración de una segunda terapia para tratar el HAE. En cualquiera de los métodos aquí, antes de la administración de una partícula de AAV a un paciente como se describe anteriormente, el posible paciente puede ser evaluado por la presencia de anticuerpos

de la cápsida anti-AAV o anticuerpos neutralizantes anti-AAV que son capaces de bloquear la transducción celular o de lo contrario, reduzca la eficacia global del tratamiento.

[0020] Otras modalidades resultarán evidentes para un experto en la técnica al leer la presente especificación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021] Las Figuras 1A-1C representan un esquema de la organización de una variedad de constructos de vectores.

[0022] La Figura 2 representa los resultados del ELISA Serpina G1 de la transfección transitoria de células HepG2.

[0023] Las Figuras 3A y B representan los niveles de C1EI humano en la sangre de ratones a los que se administraron partículas de AAV que comprenden el constructo de vector ApoE/HCR-hAAT.hhl.SERPINA G1.hGH (HAE15) (Figura 3A en el ejemplo 2). Se ejemplificaron dos cápsidas de AAV diferentes, una cápsida de tipo AAV5 (más del 90% idéntica a la SEQ ID NO: 46) y una cápsida de AAV derivada de babuino AAVBba49 (más del 90% idéntica a la SEQ ID NO: 56). La Figura 3B ilustra los resultados del ELISA de Serpina G1 por animales individuales/grupo. Los ratones se trataron con una dosis de AAV5 HAE15 2e14vg/kg o AAVBba49 HAE15 2e14vg/kg.

[0024] Las Figuras 4 A y B representan niveles de C1EI humanos funcionales en los mismos ratones.

[0025] La Figura 5 representa el peso corporal de los mismos ratones.

[0026] La Figura 6 representa la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en plasma de ratones tratados con AAV5-HAE15 o Bba49-HAE15.

[0027] Las Figuras 7A y B representan la expresión hepática del inhibidor de C1 humano en el hígado de ratones tratados con AAV5-HAE15 o Bba49-HAE15 (Figura 7A) y mediciones del % de inhibidor de C1 (+) hepatocitos (Figura 7B).

[0028] Las Figuras 8A y B representan los niveles de ADN y ARN de HAE15, respectivamente, en el hígado medidos por qPCR.

[0029] Las Figuras 9A y B representan la proteína C1EI humana (Figura 9A) y los niveles de C1EI humano funcional (Figura 9B) en la sangre de ratones a los que se administraron varias dosis de una partícula de tipo AAV5 que comprende el constructo de vector ApoE/HCR-hAAT.hhl.SERPINA G1.hGH (HAE15) en el ejemplo 3. Se trataron ratones con cuatro dosis diferentes de AAV5-HAE15: 6e13vg/kg; 2e13vg/kg; 6e12vg/kg; o 2e12vg/kg (primera cohorte).

[0030] Las Figuras 10A-10B representan concentraciones totales de proteína C1EI humana en plasma (mg/ml) y concentraciones de proteína C1EI humana funcional en plasma (unidades internacionales, UI/ml), respectivamente, para ratones tratados con cinco dosis diferentes de AAV5-HAE15: 2e14, 6e13vg/kg; 2e13vg/kg; 6e12vg/kg; o 2e12vg/kg (segunda cohorte) en el Ejemplo 3, hasta la semana 52.

[0031] La Figura 11 representa los niveles de ALT (UI/L) para la segunda cohorte, hasta la semana 52.

[0032] La Figura 12 representa la cantidad de ADN SERPING1 humano inducido por vector en el hígado (copias de ADN por μ g de ADN), en la semana 12 para la primera cohorte, o en la semana 52 para la segunda cohorte.

[0033] La Figura 13 representa el porcentaje de hepatocitos positivos para la expresión de C1EI por inmunohistoquímica, para la primera cohorte (a las 12 semanas) y la segunda cohorte (a las 52 semanas). La Figura 13 también incluye con fines de comparación (extremo izquierdo) los datos de la administración de AAV5-HAE15 en el Ejemplo 2.

[0034] La Figura 14 representa los niveles de C1EI humanos funcionales (UI/ml) en plasma durante 6 semanas en un modelo animal de HAE (ratones SERPING1 -/- homocigotos) tratados con 6e13vg/kg; 2e13vg/kg; o 6e12vg/kg AAV5-HAE15.

[0035] Las Figuras 15A, 15B y 15C representan la cantidad de colorante azul de Evan que se acumuló en el pabellón auricular, el intestino delgado y el riñón, respectivamente, de ratones SERPING1 -/- homocigóticos tratados con 6e13vg/kg, 2e13vg/kg o 6e12vg/kg de AAV5-HAE15, según la evaluación de OD600 (densidad óptica/peso del tejido). La cantidad de tinte azul detectada se correlaciona con la permeabilidad vascular en este modelo animal de AEH.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0036] Aquí se proporcionan ácidos nucleicos o constructos de vector que codifican proteínas C1EI terapéuticas funcionalmente activas, genomas de vector de AAV y partículas de rAAV de replicación deficiente que comprenden dichos constructos de vector, y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos constructos de vector, genomas de vector y partículas de AAV. Las composiciones y métodos de la invención pueden proporcionar un rendimiento mejorado de producción de virus AAV y/o purificación simplificada y/o expresión mejorada, particularmente expresión mejorada específica del hígado. También se proporcionan aquí métodos para preparar los constructos de vector, genomas de vector de AAV y partículas de

rAAV de replicación deficiente que comprenden dichos constructos de vector. También se proporcionan aquí métodos para tratar una deficiencia en C1EI funcional, o angioedema hereditario.

Definiciones:

[0037] A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la presente descripción. Véase, por ejemplo, Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2a ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, N.Y. 1989). Para los propósitos de la presente descripción, los siguientes términos se definen a continuación.

[0038] Como se usa aquí, en el contexto del suministro de genes, el término "vector" o "vector de suministro de genes" puede referirse a una partícula que funciona como un vehículo de suministro de genes, y que comprende ácido nucleico (es decir, el genoma del vector que comprende cualquiera de los constructos de vector descritas aquí) empaquetado dentro, por ejemplo, de una envoltura o cápsida. Un vector de suministro de genes puede ser un vector de suministro de genes víricos o un vector de suministro de genes no virales. Alternativamente, en algunos contextos, el término "vector" se puede utilizar para referirse únicamente al genoma del vector o al constructo del vector. Los vectores virales adecuados para su uso aquí pueden ser un parvovirus, un adenovirus, un retrovirus, un lentivirus o un virus del herpes simple. El parvovirus puede ser un virus asociado a adenovirus (AAV).

[0039] Como se usa aquí, el término "AAV" es una abreviatura estándar de virus adenoasociado. El virus adenoasociado es un parvovirus de ADN de cadena sencilla que crece solo en células en las que un virus auxiliar coinfectante proporciona ciertas funciones. Existen numerosos serotipos de AAV que se han caracterizado. Se puede encontrar información general y revisiones de AAV en, por ejemplo, Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228; y Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York); Gao et al., 2011, Methods Mol. Biol. 807: 93-118; Ojala et al., 2018, Mol. Ther. 26(1): 304-19. Sin embargo, es de esperar que estos mismos principios sean aplicables a serotipos de AAV adicionales, ya que es bien sabido que los diversos serotipos están muy relacionados, tanto estructural como funcionalmente, incluso a nivel genético. (Véase, por ejemplo, Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; and Rose,

Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). Por ejemplo, todos los serotipos de AAV aparentemente exhiben propiedades de replicación muy similares mediadas por genes rep homólogos; y todos llevan tres proteínas de la cápsida relacionadas. El grado de parentesco lo sugiere además el análisis de heterodúplex que revela una hibridación cruzada extensa entre serotipos a lo largo del genoma; y la presencia de segmentos de autoanillado análogos en los extremos que corresponden a "secuencias repetidas de terminales invertidas" (ITR).

[0040] Como se usa aquí, un "constructo de vector de AAV" se refiere a ácidos nucleicos, ya sean de cadena sencilla o de cadena doble, que tienen una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) AAV 5' y una AAV3' ITR que flanquea una secuencia que codifica una proteína (en una modalidad, una secuencia que codifica una proteína terapéutica funcional, por ejemplo, C1EI) operativamente unida a elementos reguladores de la transcripción (también llamados "elementos de control de la expresión") que son heterólogos a la secuencia que codifica una proteína y/o heterólogos del genoma viral de AAV, es decir, uno o más promotores y/o potenciadores y, opcionalmente, una secuencia de poliadenilación y/o uno o más intrones insertados entre exones de la secuencia codificante de proteínas. Un vector de AAV de cadena sencilla se refiere a ácidos nucleicos que están presentes en el genoma de una partícula de virus AAV y pueden ser la cadena con sentido o la cadena antisentido de las secuencias de ácido nucleico descritas aquí. El tamaño de tales ácidos nucleicos de cadena sencillas se proporciona en bases. Un vector de AAV de doble cadena se refiere a ácidos nucleicos que están presentes en el ADN de plásmidos, por ejemplo, pUC19, o el genoma de un virus de doble cadena, por ejemplo, baculovirus, usado para expresar o transferir los ácidos nucleicos del vector de AAV. El tamaño de tales ácidos nucleicos bicatenarios se proporciona en pares de bases (pb).

[0041] Los constructos de vector de AAV proporcionados aquí en forma de cadena sencilla tienen menos de aproximadamente 7,0 kb de longitud, o menos de 6,5 kb de longitud, o menos de 6,4 kb de longitud, o menos de 6,3 kb de longitud, o menos de 6,2 kb de longitud, o menos de 6,0 kb de longitud, o menos de 5,8 kb de longitud, o menos de 5,6 kb de longitud, o menos de 5,5 kb de longitud, o menos de 5,4 kb de longitud, o menos de 5,3 kb de longitud, o menos de 5,2 kb de longitud o menos de 5,0 kb de longitud, o menos de 4,8 kb de longitud, o menos de 4,6 kb de longitud, o menos de 4,5 kb de longitud, o menos de 4,4 kb de longitud, o menos de 4,3 kb de longitud, o menos de 4,2 kb de longitud, o menos de 4,1 kb de longitud, o menos de 4,0 kb de

longitud, o menos de 3,9 kb de longitud, o menos de 3,8 kb de longitud, o menos de 3,7 kb de longitud, o menos de 3,6 kb de longitud, o menos de 3,5 kb de longitud, o menos de 3,4 kb de longitud, o menos de 3,3 kb de longitud, o menos de 3,2 kb de longitud, o menos de 3,1 kb de longitud, o menos de 3,0 kb de longitud. Los constructos de vector AAV proporcionados aquí en forma de cadena sencilla varían de aproximadamente 5,0 kb a aproximadamente 6,5 kb de longitud, o varían de aproximadamente 4,8 kb a aproximadamente 5,2 k de longitud, o de 4,8 kb a 5,3 kb de longitud, o varían de aproximadamente 4,9 kb a aproximadamente 5,5 kb de longitud, o aproximadamente 4,8 kb a aproximadamente 6,0 kb de longitud, o aproximadamente 5,0 kb a 6,2 kb de longitud o aproximadamente 5,1 kb a aproximadamente 6,3 kb de longitud, o aproximadamente 5,2 kb a aproximadamente 6,4 kb de longitud, o de aproximadamente 5,5 kb a aproximadamente 6,5 kb de longitud, o varían de aproximadamente 4,0 kb a aproximadamente 5,0 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,8 kb a aproximadamente 4,8 k de longitud, o de 3,6 kb a 4,6 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,4 kb a aproximadamente 4,4 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,2 kb a aproximadamente 4,2 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,0 kb a 4,0 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,5 kb a aproximadamente 4,0 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,0 kb a aproximadamente 3,5 kb de longitud.

[0042] Aunque se han informado partículas de AAV en la bibliografía que tienen genomas de AAV de > 5,0 kb, en muchos de estos casos los extremos 5' o 3' de los genes codificados parecen estar truncados (véase Hirsch et al., *Molec. Ther* 18: 6-8, 2010, y Ghosh y col., *Biotech. Genet. Engin. Rev.* 24: 165-178, 2007). Se ha demostrado, sin embargo, que se produce una recombinación homóloga solapada en células infectadas con AAV entre ácidos nucleicos que tienen truncamientos en el extremo 5' y truncamientos en el extremo 3', de modo que se genera un ácido nucleico "completo" que codifica la proteína grande, reconstruyendo así un gen de longitud completa funcional.

[0043] Los vectores AAV de gran tamaño se truncan aleatoriamente en los extremos 5' y carecen de una ITR AAV 5'. Debido a que el VAA es un virus de ADN monocatenario y empaqueta la cadena con sentido o antisentido, la cadena con sentido en los vectores AAV de gran tamaño carece de la ITR de AAV 5' y posiblemente porciones del extremo 5' del gen que codifica la proteína diana, y la cadena antisentido en los vectores AAV de gran tamaño carece de la ITR 3' y posiblemente porciones del extremo 3' del gen codificante de la proteína objetivo. Se

produce un transgén funcional en células infectadas con vector AAV de gran tamaño mediante la hibridación de los genomas truncados sentido y antisentido dentro de la célula diana. Por tanto, en determinadas modalidades, los vectores AAV C1EI y / o las partículas virales comprenden al menos una ITR.

[0044] El término "repetición terminal invertida (ITR)" como se usa aquí se refiere a las regiones reconocidas en la técnica que se encuentran en los extremos 5' y 3' del genoma de AAV que funcionan en cis como orígenes de la replicación del ADN y como señales de empaquetamiento para el genoma viral. Las AAVITR, junto con la región de codificación rep de AAV, proporcionan una escisión y rescate eficientes e integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos ITR flanqueantes en el genoma de una célula hospedera. Las secuencias de ciertas ITR asociadas a AAV se describen en Yan et al., *J. Virol.* (2005) vol. 79, pp. 364-379 que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Las secuencias de ITR que encuentran uso aquí pueden ser AAV ITR de tipo silvestre de longitud completa o fragmentos de las mismas que conservan la capacidad funcional, o pueden ser variantes de secuencia de AAV ITR de tipo silvestre de longitud completa que son capaces de funcionar en cis como orígenes de replicación. Las AAV ITR útiles en los vectores AAV C1EI recombinantes de las modalidades proporcionadas aquí pueden derivarse de cualquier serotipo de AAV conocido y, en ciertas modalidades, derivarse del serotipo de AAV2 o AAV5.

[0045] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedero particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0046] Un "elemento regulador de la transcripción" se refiere a las secuencias de nucleótidos de un gen implicado en la regulación de la transcripción genética, que incluye un promotor, más elementos de respuesta, secuencias activadoras y potenciadoras para la unión de factores de transcripción para ayudar a la unión de la ARN polimerasa y promover la expresión, y o secuencias silenciadoras a las que se unen las proteínas represoras para bloquear la unión de la ARN polimerasa y prevenir la expresión. El término "elemento regulador de la transcripción específico del hígado" o "región reguladora de la transcripción específica del hígado" se refiere a un elemento o región reguladora que produce la expresión génica preferida específicamente en el

tejido hepático. Ejemplos de elementos reguladores específicos del hígado incluyen, pero no se limitan a, el promotor de tirretina de ratón (mTTR), el promotor del factor VIII humano endógeno (F8), la región de control hepático de apolipoproteína E humana y sus fragmentos activos, el promotor de alfa-1-antitripsina humana (hAAT) y fragmentos activos del mismo, promotor de alfa-1-microglobulina humana y fragmentos del mismo, promotor de protrombina humana y fragmentos activos del mismo, promotor mínimo de albúmina humana y promotor de albúmina de ratón. También se contemplan potenciadores derivados de sitios de unión a factores de transcripción específicos del hígado, tales como EBP, DBP, HNF1, HNF3, HNF4, HNF6 y Enh1.

[0047] Como se usa aquí, el término "enlazado operativamente" se usa para describir la conexión entre elementos reguladores y un gen o su región codificante. Normalmente, la expresión génica se coloca bajo el control de uno o más elementos reguladores, por ejemplo, sin limitación, promotores constitutivos o inducibles, elementos reguladores específicos de tejido y potenciadores. Se dice que un gen o región codificante está "operativamente enlazado a" o "operativamente enlazado" o "operativamente asociado con" los elementos reguladores, lo que significa que el gen o región codificante está controlado o influenciado por el elemento regulador. Por ejemplo, un promotor está operativamente enlazado a una secuencia codificante si el promotor efectúa la transcripción o expresión de la secuencia codificante.

[0048] En una modalidad, el constructo de vector comprende un ácido nucleico que codifica una proteína C1EI funcionalmente activa. La secuencia que codifica C1EI puede ser de tipo silvestre, con codones optimizados o una variante.

[0049] Como se usa aquí, SERPINA G1 de tipo silvestre (gen que codifica C1EI) tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

```
ATGGCCTCCAGGCTGACCCTGCTGACCCTCCTGCTGCTGCTGCTGGCTGGGGAT
AGAGCCTCCTCAAATCCAAATGCTACCAGCTCCAGCTCCCAGGATCCAGAGAGTT
TGCAAGACAGAGGCGAAGGGAAGGTCGCAACAACAGTTATCTCCAAGATGCTATT
CGTTGAACCCATCCTGGAGGTTTCCAGCTTGCCGACAACCAACTCAACAACCAAT
TCAGCCACCAAAATAACAGCTAATACCACTGATGAACCCACCACACAACCCACCA
CAGAGCCCACCACCCAACCCACCATCCAACCCACCCAACCAACTACCCAGCTCCC
AACAGATTCTCCTACCCAGCCCACTACTGGGTCCTTCTGCCCAGGACCTGTTACT
CTCTGCTCTGACTTGGAGAGTCATTCAACAGAGGCCGTGTTGGGGGATGCTTTGG
TAGATTTCTCCCTGAAGCTCTACCACGCCTTCTCAGCAATGAAGAAGGTGGAGAC
CAACATGGCCTTTTCCCCATTCAGCATCGCCAGCCTCCTTACCCAGGTCCTGCTC
```

GGGGCTGGGGGAGAACACCAAAACAAACCTGGAGAGCATCCTCTCTTACCCCAAG
 GACTTCACCTGTGTCCACCAGGCCCTGAAGGGCTTCACGACCAAAGGTGTACCT
 CAGTCTCTCAGATCTTCCACAGCCCAGACCTGGCCATAAGGGACACCTTTGTGAA
 TGCCTCTCGGACCCTGTACAGCAGCAGCCCCAGAGTCCTAAGCAACAACAGTGA
 CGCCAACTTGGAGCTCATCAACACCTGGGTGGCCAAGAACACCAACAACAAGATC
 AGCCGGCTGCTAGACAGTCTGCCCTCCGATACCCGCCTTGTCTCTCTCAATGCTA
 TCTACCTGAGTGCCAAGTGGAAGACAACATTTGATCCCAAGAAAACAGAAATGGA
 ACCCTTTCACTTCAAAAACCTCAGTTATAAAAGTGCCCATGATGAATAGCAAGAAGT
 ACCCTGTGGCCCATTTTCATTGACCAAACCTTTGAAAGCCAAGGTGGGGCAGCTGCA
 GCTCTCCCACAATCTGAGTTTGGTGATCCTGGTACCCAGAACCTGAAACATCGT
 CTTGAAGACATGGAACAGGCTCTCAGCCCTTCTGTTTTCAAGGCCATCATGGAGA
 AACTGGAGATGTCCAAGTTCCAGCCCCTCTCCTAACACTACCCCGCATCAAAGT
 GACGACCAGCCAGGATATGCTCTCAATCATGGAGAAATTGGAATTCTTCGATTTTT
 CTTATGACCTTAACCTGTGTGGGCTGACAGAGGACCCAGATCTTCAGGTTTCTGC
 GATGCAGCACCAGACAGTGCTGGAAGTACAGAGACTGGGGTGGAGGCGGCTG
 CAGCCTCCGCCATCTCTGTGGCCCGCACCTGCTGGTCTTTGAAGTGCAGCAGC
 CCTTCCTCTTCGTGCTCTGGGACCAGCAGCACAAGTTCCCTGTCTTCATGGGGCG
 AGTATATGACCCAGGGCCTGA (SEQ ID NO:1).

[0050] Como se usa aquí, C1-INH de tipo silvestre (proteína C1EI) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MASRLTLLTLLLLLAGDRASSNP NATSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLFVEPI
 LEVSSLPTTNSTTNSATKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTT
 GSFCPGPVTLCSDLSEHSTEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASL
 LTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTF
 VNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNNKISRLLDSLPSDTRLVLLNAIYLS
 AKWKTTFDPKKTRMEPFHFKNSVIKVPMMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNL
 SLVILVPQNLKHRLEDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLLPRIKVTTSDMLSIM
 EKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTVELETTETGVEAAAASAVISVARTLLVFE
 VQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPRA (SEQ ID NO: 2).

[0051] Los constructos de vector descritos aquí pueden comprender una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre pero aún codifica una secuencia de aminoácidos inhibidora de la esterasa C1 funcional al menos 90%, 95% o 98% idéntica a los aminoácidos 23-500 de la SEQ ID NO: 2. De acuerdo con este aspecto, la secuencia de nucleótidos puede comprender una porción que tenga al menos 80%, 85% o 90% de homología con al menos 100 bases

consecutivas de SEQ ID NO: 1 o 10-12, siempre que la secuencia de nucleótidos codifica un inhibidor de esterasa C1 humano funcional al menos 90%, 95% o 98% idéntica a los aminoácidos 23-500 de SEQ ID NO: 2. En modalidades de ejemplo, la secuencia de nucleótidos puede comprender una porción que tiene al menos 90% de homología hasta al menos 100, 200, 300, 400 o 500 bases consecutivas de SEQ ID NO: 1 o 10-12, siempre que la secuencia de nucleótidos codifique inhibidor de esterasa C1 humana funcional al menos 90% idéntica a los aminoácidos 23-500 de SEQ ID NO: 2. En modalidades de ejemplo, la secuencia de nucleótidos tiene homología con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 10-12 y codifica C1EI funcional. El término homología sustancial se puede definir adicionalmente con referencia a un porcentaje (%) de homología, por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90% o 95% homólogo. Esto se discute con más detalle en otra parte aquí.

[0052] El término "aislado" cuando se usa en relación con una molécula de ácido nucleico de la presente descripción se refiere típicamente a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos un ácido nucleico contaminante con el que normalmente está asociado en su fuente natural. El ácido nucleico aislado puede estar presente en una forma o configuración diferente de aquella en la que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales.

[0053] Como se usa aquí, el término "variante" se refiere a un polinucleótido (o polipéptido) que tiene una secuencia sustancialmente similar a un polinucleótido (o polipéptido) de referencia. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para la introducción de cambios de nucleótidos y aminoácidos en un polinucleótido, proteína o polipéptido (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989)). En el caso de un polinucleótido, una variante puede tener deleciones, sustituciones, adiciones de uno o más nucleótidos en el extremo 5', extremo 3' y/o uno o más sitios internos en comparación con el polinucleótido de referencia. Las similitudes y/o diferencias en las secuencias entre una variante y el polinucleótido de referencia pueden detectarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación. Los polinucleótidos variantes también incluyen polinucleótidos derivados sintéticamente, tales como los generados, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio. Generalmente, una variante de un polinucleótido, que incluye, pero no se limita a, un ADN, puede tener al menos aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%,

aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%,
aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%,
aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%,
aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más
identidad de secuencia con la referencia polinucleótido determinado mediante
programas de alineación de secuencias conocidos por los expertos en la técnica. En el
caso de un polipéptido, una variante puede tener deleciones, sustituciones, adiciones
de uno o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de referencia. Las
similitudes y/o diferencias en las secuencias entre una variante y el polipéptido de
referencia pueden detectarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica,
por ejemplo, Western blot. Generalmente, una variante de un polipéptido puede tener
al menos aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%,
aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%,
aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%,
aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%,
aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%,
aproximadamente 99% o más de identidad de secuencia con el polipéptido de
referencia según se determina mediante programas de alineación de secuencia
conocidos por los expertos en la técnica.

[0054] El término "identidad", "homología" y variaciones gramaticales de los
mismos, significan que dos o más entidades referenciadas son iguales, cuando son
secuencias "alineadas". Así, a modo de ejemplo, cuando dos secuencias de
polipéptidos son idénticas, tienen la misma secuencia de aminoácidos, al menos
dentro de la región o porción referenciada. Cuando dos secuencias de polinucleótidos
son idénticas, tienen la misma secuencia de polinucleótidos, al menos dentro de la
región o porción referenciada. La identidad puede estar en un área definida (región o
dominio) de la secuencia. Un "área" o "región" de identidad se refiere a una parte de
dos o más entidades referenciadas que son iguales. Por tanto, cuando dos secuencias
de proteínas o ácidos nucleicos son idénticas en una o más áreas o regiones de
secuencia, comparten identidad dentro de esa región. Una secuencia "alineada" se
refiere a múltiples secuencias de polinucleótidos o proteínas (aminoácidos), que a
menudo contienen correcciones para bases o aminoácidos (espacios) faltantes o
adicionales en comparación con una secuencia de referencia. "Homología sustancial"
significa que una molécula se conserva estructural o funcionalmente de manera que
tiene o se predice que tiene al menos una estructura o función parcial de una o más de

las estructuras o funciones (por ejemplo, una función o actividad biológica) de la molécula de referencia, o región o porción relevante/correspondiente de la molécula de referencia con la que comparte homología.

[0055] El "porcentaje (%) de identidad u homología de secuencia de ácido nucleico" se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a una secuencia de referencia después de alinear las secuencias respectivas e introducir espacios, si es necesario, para lograr la identidad de secuencia de porcentaje máximo. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico se puede lograr de diversas formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software de computadora disponible públicamente, tal como ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, que incluyen los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

[0056] El "porcentaje (%) de identidad u homología de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de aminoácidos de C1EI identificadas aquí se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticas a los residuos de aminoácidos en una secuencia de polipéptido C1EI, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software de computadora disponible públicamente, tal como software ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

[0057] La "optimización de codones" o "codones optimizados" se refiere a cambios realizados en la secuencia de nucleótidos de modo que es más probable que se exprese a un nivel relativamente alto en comparación con la secuencia sin codones optimizados. No cambia el aminoácido que codifica cada codón.

[0058] Como se usa aquí, un "intrón" se define ampliamente como una secuencia de nucleótidos que se puede eliminar mediante empalme de ARN. "Empalme de ARN" significa la escisión de intrones de un pre-ARNm para formar un ARNm maduro. Los intrones pueden estar corriente arriba, corriente abajo o dentro de la región codificante

de un gen. La inserción de un intrón en una secuencia de nucleótidos se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica. La única limitación de dónde se inserta el intrón es en consideración de las limitaciones de empaquetamiento de las partículas de virus AAV (aproximadamente 5 kpb).

[0059] En ciertas modalidades, el constructo de vector de AAV recombinante comprende (a) un ácido nucleico que comprende una repetición terminal invertida (ITR) AAV2 5' (que puede o no modificarse como se conoce en la técnica), (b) una región reguladora de la transcripción específica del hígado, (c) una región codificante de la proteína C1EI funcional, (d) opcionalmente uno o más intrones, (e) una secuencia de poliadenilación, y (f) una AAV2 3' ITR (que puede o no modificarse como es conocido en la técnica).

[0060] Otras modalidades proporcionadas aquí están dirigidas a constructos de vector que codifican un polipéptido C1EI funcional, en donde los constructos comprenden uno o más de los elementos individuales de los constructos descritos anteriormente y combinaciones de los mismos, en una o más orientaciones diferentes. Otra modalidad proporcionada aquí se dirige a los constructos descritos anteriormente en una orientación opuesta. En otra modalidad, se proporcionan partículas de virus AAV recombinantes que comprenden los constructos de vector AAV descritos aquí y su uso para el tratamiento de HAE o deficiencia en C1EI funcional en sujetos. En una modalidad, los sujetos son sujetos juveniles.

[0061] Un "virión de AAV" o "partícula viral de AAV" o "partícula de vector de AAV" o "virus de AAV" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápsida de AAV y un constructo de vector de AAV encapsidada como se describe aquí. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo silvestre, tal como un transgén que se administrará a una célula de mamífero), normalmente se denomina "partícula de vector de AAV recombinante" o simplemente "vector AAV". La producción de partículas de vector de AAV incluye necesariamente la producción del genoma de vector de AAV, ya que dicho genoma de vector está contenido dentro de una partícula de vector de AAV. Se entiende que la referencia al constructo del vector AAV polinucleotídico encapsulado dentro de la partícula del vector, y su replicación, se refiere al genoma del vector AAV.

[0062] Como se usa aquí, "virus de AAV terapéutico" se refiere a un virión de AAV, una partícula viral de AAV, una partícula de vector de AAV o un virus de AAV que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína terapéutica tal

como el C1EI descrito aquí. Un "constructo de vector de AAV" o "genoma de vector de AAV" como se usa aquí se refiere a un constructo de vector que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una proteína de interés (también llamados transgenes) que están flanqueados por al menos una secuencia de repetición terminal (ITR) AAV y operativamente enlazado a uno o más elementos de control de expresión. Tales constructos de vector de AAV se pueden replicar y empaquetar en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula hospedera que ha sido transfectada con un vector que codifica y expresa productos génicos rep y cap.

[0063] Como se usa aquí, "proteína terapéutica" se refiere a un polipéptido que tiene una actividad biológica que reemplaza o compensa la pérdida o reducción de la actividad de una proteína endógena. Por ejemplo, un inhibidor de esterasa C1 funcional (C1EI) es una proteína terapéutica para el angioedema hereditario (HAE).

[0064] "Angioedema hereditario (HAE)", como se usa aquí, se refiere a una enfermedad metabólica hereditaria que se caracteriza por ataques recurrentes o síntomas de edema (hinchazón) subcutáneo y/o submucoso, particularmente en la piel, el tracto gastrointestinal y el tracto respiratorio debido a activación de la vía del complemento y/o vía de activación por contacto. Los episodios recurrentes de hinchazón severa pueden afectar brazos, piernas, cara, tracto intestinal y vías respiratorias que son dolorosas, desfigurantes y, a veces, potencialmente mortales si obstruyen la respiración. Si no se trata, la condición tiene una tasa de mortalidad del 25%.

[0065] El HAE de tipo I y el HAE de tipo II están provocados por una deficiencia de la proteína inhibidora de la esterasa C1 funcional (C1EI). El HAE de tipo I se caracteriza por niveles bajos de expresión de C1EI. El HAE de tipo II se caracteriza por niveles de expresión normales o elevados de un C1EI no funcional. El HAE de tipo III se caracteriza por niveles normales de C1EI funcional pero una mutación en otros genes, como el factor XII.

[0066] "Deficiencia del inhibidor de esterasa C1 (C1EI)" o una "deficiencia en C1EI funcional", como se usa aquí, se refiere a una condición hereditaria causada por una deficiencia de la proteína inhibidora de esterasa C1 funcional (C1EI). Esto incluye HAE Tipo I y Tipo II. La activación desinhibida del complemento y/o la vía de activación por contacto debido a niveles insuficientes de C1EI funcional da como resultado la escisión no regulada del cininógeno de alto peso molecular por la calicreína, lo que conduce a la generación de bradicinina libre excesiva, un péptido vasoactivo potente que aumenta la permeabilidad capilar y el edema.

[0067] "Terapéuticamente efectiva para HAE" o "terapia HAE" como se usa aquí se refiere a cualquier intervención terapéutica de un sujeto que tiene HAE que mejora los síntomas de HAE o reduce la frecuencia, duración o gravedad de los ataques agudos de HAE, o reduce la cantidad de terapia en demanda (por ejemplo, proteína C1EI humana, inhibidor de calicreína, antagonista de bradicinina, etc.) necesaria para tratar ataques agudos de HAE, o reduce la frecuencia con la que se administra la terapia en demanda para tratar ataques agudos de HAE. "Terapia génica de HAE" usada aquí se refiere a cualquier intervención terapéutica de un sujeto que tiene HAE que implica el reemplazo o restauración o aumento de la actividad de C1EI a través del suministro de una o más moléculas de ácido nucleico a las células del sujeto que expresan la proteína C1EI funcional. En ciertas modalidades, la terapia génica con HAE se refiere a la terapia génica que implica una partícula viral adenoasociada (AAV) que comprende un constructo de vector que expresa C1EI humana.

[0068] "Tratar" o "tratamiento" como se usa aquí se refiere a un tratamiento terapéutico que se refiere a un tratamiento administrado a un sujeto que exhibe signos o síntomas de patología, es decir, HAE, con el propósito de disminuir o eliminar esos signos o síntomas. Los signos o síntomas pueden ser bioquímicos, celulares, histológicos, funcionales, subjetivos u objetivos. "Tratar" o "tratamiento" o "terapéuticamente efectivo" se refiere a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad (o síntoma relacionado con la misma) asociada con la deficiencia de C1EI o HAE, por ejemplo, frecuencia o gravedad del edema subcutáneo y/o edema submucoso, o niveles de bradicinina anormalmente elevados. El tratamiento puede ocurrir antes o después del edema. Pueden producirse síntomas reducidos con el tratamiento que restablece los niveles normales de C1EI funcional en sangre, por ejemplo, de aproximadamente 16 mg/dL (aproximadamente 1 UI/ml) a aproximadamente 32 mg/dL, o que restaura aproximadamente el 40% o más de los niveles normales de C1EI que se puede esperar que mejoren los síntomas de HAE. Véase, por ejemplo, Zuraw et al., Allergy 2015; 70: 1319-1328, lo que sugiere que se observan efectos clínicamente significativos con aproximadamente el 40% de los niveles normales de C1EI. El tratamiento es preferiblemente un tratamiento estable que restaura el C1EI funcional a niveles terapéuticamente eficaces durante un período de tiempo clínicamente significativo.

[0069] "Mejorar", como se usa aquí, se refiere a la acción de disminuir la gravedad de los síntomas, la progresión o la duración de una enfermedad.

[0070] Como se usa aquí, "tratamiento estable" o "tratamiento estable" se refiere

al uso de un constructo de vector terapéutico, partícula o célula de AAV administrada a un sujeto donde el sujeto expresa de manera estable una proteína terapéutica expresada por el constructo de vector, partícula o célula de AAV. Proteína terapéutica expresada de manera estable significa que la proteína se expresa durante un período de tiempo clínicamente significativo. "Período de tiempo clínicamente significativo", como se usa aquí, significa expresión a niveles terapéuticamente eficaces durante un período de tiempo que tiene un impacto significativo en la calidad de vida del sujeto. En ciertas modalidades, se demuestra un impacto significativo en la calidad de vida por la falta de la necesidad de administrar terapias alternativas por vía intravenosa o subcutánea. En ciertas modalidades, el período de tiempo clínicamente significativo es la expresión durante al menos seis meses, durante al menos ocho meses, durante al menos un año, durante al menos dos años, durante al menos tres años, durante al menos cuatro años, durante al menos cinco años, durante al menos seis años, durante al menos siete años, durante al menos ocho años, durante al menos nueve años, durante al menos diez años, o durante la vida del sujeto. Preferiblemente, la expresión terapéuticamente efectiva continúa durante al menos un año.

[0071] Como se usa aquí, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para lograr resultados biológicos y/o clínicos beneficiosos o deseables.

[0072] Como se usa aquí, un "sujeto" se refiere a un animal que es objeto de tratamiento, observación o experimento. "Animal" incluye vertebrados e invertebrados de sangre fría y caliente tales como peces, mariscos, reptiles y, en particular, mamíferos. El término "aviar" como se usa aquí incluye, pero no se limita a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes. "Mamífero", como se usa aquí, se refiere a un individuo que pertenece a la clase Mammalia e incluye, pero no se limita a, humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, deportes y animales de compañía. Los ejemplos no limitantes de mamíferos incluyen ratones; ratas; conejos; conejillos de indias; perros; gatos; oveja; cabras; vacas; caballos; primates, tales como monos, chimpancés y simios y, en particular, humanos. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano. Sin embargo, en algunas modalidades, el mamífero no es un ser humano.

[0073] En general, un "portador farmacéuticamente aceptable" es uno que no es tóxico ni perjudicial indebidamente para las células. Los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen agua estéril sin pirógenos y solución salina tamponada con fosfato estéril y libre de pirógenos. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen portadores fisiológicamente aceptables. El término "portador

farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles.

[0074] En otra modalidad, se proporcionan métodos para producir partículas de virus adenoasociado (AAV) recombinantes que comprenden cualquiera de los constructos de vector de AAV proporcionadas aquí. Los métodos comprenden los pasos de cultivar una célula que ha sido transfectada con cualquiera de los constructos de vector de AAV proporcionadas aquí (en asociación con varios genes cap y rep de AAV) y recuperar partículas de AAV terapéuticas recombinantes del sobrenadante de la célula transfectada.

[0075] Las células útiles para la producción de AAV recombinantes proporcionadas aquí son cualquier tipo de célula susceptible a la infección por baculovirus, que incluyen las células de insectos tal como High Five, Sf9, Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, BM-N, Ha2302, Hz2E5 y Ao38. En otra modalidad, se pueden usar células de mamíferos tal como HEK293, HeLa, CHO, NSO, SP2/0, PER.C6, Vero, RD, BHK, HT 1080, A549, Cos-7, ARPE-19 y MRC-5.

[0076] En otra modalidad, aquí se proporciona el uso de una cantidad efectiva de ácido nucleico de vector, constructo de vector o partícula de AAV para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece deficiencia de HAE o C1EI. En una modalidad, el sujeto que padece HAE es un ser humano. En una modalidad, el medicamento se administra mediante administración intravenosa (IV). En otra modalidad, la administración del medicamento da como resultado la expresión de la proteína C1EI en el torrente sanguíneo del sujeto suficiente para aumentar los niveles de proteína C1EI funcional en la sangre del sujeto, para mejorar los síntomas del HAE. En ciertas modalidades, el medicamento también es para la coadministración con un corticosteroide profiláctico y/o terapéutico para la prevención y/o tratamiento de cualquier hepatotoxicidad asociada con la administración del virus AAV-C1EI. El tratamiento profiláctico o terapéutico con corticosteroides puede comprender al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más mg/día del corticosteroide. En ciertas modalidades, el corticosteroide profiláctico o terapéutico se puede administrar durante un período continuo de al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas o más.

[0077] En otra modalidad, la terapia HAE proporcionada aquí opcionalmente incluye además la administración, por ejemplo, administración concurrente de otras

terapias que se utilizan para tratar el HAE, por ejemplo, un andrógeno atenuado tal como danazol, estanozolol, oxandrolona, metiltestosterona, tibolona, oximetolona. En algunas modalidades, la terapia HAE proporcionada aquí comprende la administración adjunta de uno o más de los siguientes: una proteína C1EI, opcionalmente recombinante o derivada de plasma, un inhibidor de calicreína, un antagonista de bradicinina y/o un andrógeno atenuado, para ataques agudos de HAE.

CONSTRUCTOS VECTORIALES Y VECTORES AAV

[0078] La construcción de vector recombinante de la divulgación puede usarse por sí misma como terapia génica, o puede usarse para producir partículas de rAAV mediante métodos descritos en el presente documento, que comprenden proporcionar a una célula huésped adecuada el constructo de vector recombinante, junto con los genes Rep y Cap. Las construcciones de vector descritas en el presente documento comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de esterasa C1 funcional (C1EI). La construcción de vector recombinante puede comprender un ácido nucleico que codifica C1EI humano funcional unido operativamente a un elemento de control de expresión heterólogo, por ejemplo, un promotor y/o potenciador; opcionalmente un intrón; y opcionalmente una señal de poliadenilación (poliA). El elemento de control de la expresión heterólogo puede ser una región reguladora de la transcripción heteróloga específica del hígado, por ejemplo, como se describe aquí.

[0079] Cuando se usa para producir partículas de rAAV, el constructo del vector recombinante puede comprender (a) una o ambas de (i) una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV 5' y (ii) una AAV ITR 3', (b) una región reguladora de la transcripción heteróloga específica del hígado, y (c) un ácido nucleico que codifica una C1EI humana funcional, en la que opcionalmente las de AAV ITR son de AAV2 ITR. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica el C1EI funcional está unido operativamente a elementos de control de la expresión específicos del hígado. La construcción de vector puede incluir elementos de control de expresión adicionales, por ejemplo: un promotor y/o potenciador; un intrón; opcionalmente, un exón del mismo gen que el intrón; y una señal de poliadenilación (poliA). Dichos elementos se describen adicionalmente en el presente documento. Preferiblemente, las partículas de rAAV también comprenden una cápside de AAV con tropismo hepático, opcionalmente una cápsida de tipo AAV5.

[0080] En una o más modalidades, el C1EI funcional comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 95% o 98% idéntica a los aminoácidos 23-500 de SEQ

ID NO: 2 (un C1EI humano o "hC1EI"). En modalidades de ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el C1EI funcional es una secuencia de SERPIN G1 de tipo salvaje, de la cual SEQ ID NO: 1 es un ejemplo, o tiene codones optimizados, o es una variante.

[0081] En una o más modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica C1EI está operativamente enlazada a uno o más elementos de control de expresión heterólogos. Preferiblemente, el elemento de control de la expresión es un elemento de control de la expresión específica del hígado. Ejemplos de elementos de control específicos del hígado incluyen, pero no se limitan a, el promotor de tirretina de ratón (mTTR), el promotor del factor VIII humano endógeno (F8), la región de control hepático de apolipoproteína E humana y sus fragmentos activos, el promotor de alfa-1-antitripsina humana (hAAT) y fragmentos activos del mismo, promotor de alfa-1-microglobulina humana y fragmentos del mismo, promotor de protrombina humana y fragmentos activos del mismo, promotor mínimo de albúmina humana y promotor de albúmina de ratón. También se contemplan potenciadores derivados de sitios de unión a factores de transcripción específicos del hígado, tales como EBP, DBP, HNF1, HNF3, HNF4, HNF6 y Enh1.

[0082] En algunas modalidades, los constructos de vector comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica C1EI funcional que está operativamente enlazada a una región reguladora de la transcripción heteróloga específica del hígado. Los constructos de vector pueden comprender otros elementos reguladores. En algunas modalidades, en los constructos de vector descritas aquí, los elementos de control de la expresión incluyen uno o más de los siguientes: un promotor y/o potenciador; opcionalmente un intrón; y una señal de poliadenilación (poliA).

[0083] La región reguladora de la transcripción específica del hígado puede comprender uno o más elementos de control de la expresión específicos del hígado. En una o más modalidades, la región reguladora de la transcripción específica del hígado es una secuencia promotora sintética que comprende porciones de un promotor de alfa-1-antitripsina (hAAT) humana, un potenciador de la región de control hepático (HCR) y/o un potenciador de apolipoproteína E (ApoE).

[0084] En algunas modalidades, el constructo de vector comprende al menos una o ambas de una repetición terminal invertida 5' (ITR) de AAV y una 3' AAV ITR, un promotor, un ácido nucleico que codifica C1EI funcional y, opcionalmente, un elemento regulador postranscripcional, donde el promotor, el ácido nucleico que codifica C1EI y el elemento regulador postranscripción están ubicados corriente abajo de 5' AAV ITR y

corriente arriba de la 3' AAV ITR. El constructo de vector se puede usar, por ejemplo, para producir altos niveles de C1EI en un sujeto con fines terapéuticos.

[0085] En ciertas modalidades, el constructo del vector de AAV recombinante comprende un ácido nucleico que comprende (a) una repetición terminal invertida (ITR) AAV2 5' (que puede o no modificarse como se conoce en la técnica), (b) una región reguladora de la transcripción específica del hígado, una región codificante de la proteína C1EI funcional, (d) opcionalmente uno o más intrones, (e) una secuencia de poliadenilación, y (f) una AAV2 3' ITR (que puede o no modificarse como se conoce en la técnica).

[0086] En algunas modalidades, la región reguladora de la transcripción específica del hígado comprende una secuencia potenciadora de ApoE acortada (SEQ ID NO: 16) o una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la misma; un promotor proximal de alfa anti-tripsina humana (hAAT) de 186 bases, que incluye 42 bases de la región no traducida 5' (UTR) (SEQ ID NO: 15) o una secuencia de nucleótidos de al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica al mismo; uno o más potenciadores seleccionados del grupo que consiste en (i) un potenciador de ApoE/HCR humano de 34 bases (SEQ ID NO: 4) o una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la misma, (ii) una región X distal del promotor de AAT humana de 32 bases o una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la misma, y (iii) 80 bases adicionales del elemento distal del promotor proximal de AAT humano o una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la misma; y un ácido nucleico que codifica C1EI humano. En otra modalidad, la región reguladora de la transcripción específica del hígado comprende una secuencia potenciadora de α -microglobulina (SEQ ID NO: 17) o una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la misma y el promotor proximal de alfa anti-tripsina (AAT) humana de 186 bases (SEQ ID NO: 15) o una secuencia de nucleótidos al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntica a la misma.

[0087] Otras modalidades proporcionadas aquí están dirigidas a constructos de vector que codifican un polipéptido C1EI funcional, en donde los constructos comprenden uno o más de los elementos individuales de los constructos descritos anteriormente y combinaciones de los mismos, en una o más orientaciones diferentes. Otra modalidad proporcionada aquí se dirige a los constructos descritos anteriormente en una orientación opuesta. En otra modalidad, se proporcionan partículas de AAV recombinantes que comprenden los constructos de vector aquí descritos y su uso para

el tratamiento de la deficiencia de HAE o C1EI en sujetos. En una modalidad, los sujetos son sujetos juveniles.

[0088] Los constructos de vector de AAV proporcionados aquí en forma de cadena sencilla tienen menos de aproximadamente 7,0 kb de longitud, o menos de 6,5 kb de longitud, o menos de 6,4 kb de longitud, o menos de 6,3 kb de longitud, o menos de 6,2 kb de longitud, o menos de 6,0 kb de longitud, o menos de 5,8 kb de longitud, o menos de 5,6 kb de longitud, o menos de 5,5 kb de longitud, o menos de 5,4 kb de longitud, o menos de 5,3 kb de longitud, o menos de 5,2 kb de longitud o menos de 5,0 kb de longitud, o menos de 4,8 kb de longitud, o menos de 4,6 kb de longitud, o menos de 4,5 kb de longitud, o menos de 4,4 kb de longitud, o menos de 4,3 kb de longitud, o menos de 4,2 kb de longitud, o menos de 4,1 kb de longitud, o menos de 4,0 kb de longitud, o menos de 3,9 kb de longitud, o menos de 3,8 kb de longitud, o menos de 3,7 kb de longitud, o menos de 3,6 kb de longitud, o menos de 3,5 kb de longitud, o menos de 3,4 kb de longitud, o menos de 3,3 kb de longitud, o menos de 3,2 kb de longitud, o menos de 3,1 kb de longitud, o menos de 3,0 kb de longitud. Los constructos de vector AAV proporcionados aquí en forma de cadena sencilla varían de aproximadamente 5,0 kb a aproximadamente 6,5 kb de longitud, o varían de aproximadamente 4,8 kb a aproximadamente 5,2 k de longitud, o de 4,8 kb a 5,3 kb de longitud, o varían de aproximadamente 4,9 kb a aproximadamente 5,5 kb de longitud, o aproximadamente 4,8 kb a aproximadamente 6,0 kb de longitud, o aproximadamente 5,0 kb a 6,2 kb de longitud o aproximadamente 5,1 kb a aproximadamente 6,3 kb de longitud, o aproximadamente 5,2 kb a aproximadamente 6,4 kb de longitud, o aproximadamente 5,5 kb a aproximadamente 6,5 kb de longitud, o varían de aproximadamente 4,0 kb a aproximadamente 5,0 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,8 kb a aproximadamente 4,8 k de longitud, o de 3,6 kb a 4,6 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,4 kb a aproximadamente 4,4 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,2 kb a aproximadamente 4,2 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,0 kb a 4,0 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,5 kb a aproximadamente 4,0 kb de longitud, o varían de aproximadamente 3,0 kb a aproximadamente 3,5 kb de longitud. Las construcciones de vector AAV proporcionadas aquí también pueden variar de aproximadamente 2,7 kb a aproximadamente 3,3 kb de longitud, o aproximadamente 3,7 kb a aproximadamente 4,1 kb de longitud, o aproximadamente 2,7 kb a aproximadamente 4 kb de longitud, o aproximadamente 2,7 kb a aproximadamente 4,1 kb de longitud, por ejemplo, SEQ ID NOs 57 (HAE23) y 58 (HAE24). Entre los constructos de vectores de la divulgación,

los constructos de vectores de un intervalo de tamaño más pequeño proporcionan niveles de expresión más altos.

[0089] Cuando los vectores AAV se producen a partir de construcciones de vector recombinante de gran tamaño, pueden carecer de una parte de los extremos 5' o 3' del constructo de vector recombinante. Debido a que el VAA es un virus de ADN monocatenario y empaqueta la cadena con sentido o antisentido, la cadena con sentido en los vectores AAV de gran tamaño carece de AAV ITR 5' y posiblemente porciones del extremo 5' del gen que codifica la proteína objetivo, y la cadena antisentido en los vectores AAV de gran tamaño carece de la ITR 3' y posiblemente porciones del extremo 3' del gen codificante de la proteína objetivo. Se produce un transgén funcional en células infectadas con vector AAV de gran tamaño mediante la hibridación de los genomas truncados sentido y antisentido dentro de la célula objetivo. Por lo tanto, en ciertas modalidades, las partículas de rAAV de la invención pueden comprender construcciones de vectores recombinantes que comprenden al menos una ITR y una porción sustancial de una secuencia de nucleótidos que codifica una C1EI funcional, como un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 10-13, 59 o 60 que es superior al 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la longitud de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, el constructo de vector recombinante puede comprender al menos una ITR, una región reguladora de la transcripción específica del hígado y una porción sustancial de una secuencia de nucleótidos que codifica una C1EI funcional. Las partículas de rAAV de la invención también pueden comprender una parte sustancial de cualquiera de las SEQ NO: 8, 9, 20-36, 57 y 58, por ejemplo, un fragmento que es mayor del 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la longitud de la secuencia de nucleótidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 8, 9, 20-36, 57 y 58, que incluye la región reguladora de la transcripción específica del hígado.

[0090] La generación de los constructos de vector se puede lograr usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada bien conocida en la técnica, que incluyen, sin limitación, las técnicas estándar de digestión, ligación, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN con endonucleasas de restricción, por ejemplo como descrito en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)).

[0091] Los constructos de vector pueden incorporar secuencias del genoma de cualquier organismo conocido. Las secuencias se pueden incorporar en su forma nativa o se pueden modificar de cualquier forma para obtener una actividad deseada. Por ejemplo, las secuencias pueden comprender inserciones, delecciones o

sustituciones.

[0092] Los constructos de vector de AAV se pueden replicar y empaquetar en partículas de AAV infecciosas, preferiblemente partículas de AAV de replicación deficiente, cuando están presentes en una célula hospedera que ha sido transfectada con un polinucleótido que codifica y expresa productos génicos rep y cap.

[0093] Los constructos de vector o partículas de AAV descritas aquí también pueden producir efectos beneficiosos en un modelo de ratón deficiente en C1EI que comparte características asociadas con HAE en humanos, incluyendo niveles reducidos de C1EI en plasma. Fenotípicamente, estos ratones tienen una mayor permeabilidad vascular de la piel y los órganos internos.

Elementos o región reguladores de la transcripción

Promotores y potenciadores

[0094] Se pueden enlazar operativamente varios promotores con un ácido nucleico que comprende la región codificante de la proteína de interés, C1EI humana, en los constructos de vector descritos aquí. En algunas modalidades, el promotor puede impulsar la expresión de la proteína de interés en una célula infectada con un virus derivado del vector viral, tal como una célula objetivo. El promotor puede ser de origen natural o de origen no natural. En algunas modalidades, el promotor es un promotor sintético. En una modalidad, el promotor sintético comprende secuencias que no existen en la naturaleza y que están diseñadas para regular la actividad de un gen enlazado operativamente. En otra modalidad, el promotor sintético comprende fragmentos de promotores naturales para formar nuevos tramos de secuencia de ADN que no existen en la naturaleza. Los promotores sintéticos se componen típicamente de elementos reguladores, promotores, potenciadores, intrones, donantes y aceptores de empalme que están diseñados para producir una expresión mejorada específica de tejido. Los ejemplos de promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores virales, promotores de plantas y promotores de mamíferos. En otra modalidad, el promotor es un promotor específico del hígado. Los ejemplos específicos de promotores específicos del hígado incluyen LP1, HLP, HCR-hAAT, ApoE-hAAT, LSP, TBG y TTR. Estos promotores se describen con más detalle en las siguientes referencias: LP1 (secuencia central de ApoE HCR humana (192 pb) con promotor AAT humano (255 pb)): Nathwani A. *et al.* Blood. 2006 1 de abril; 107 (7): 2653-2661; promotor híbrido específico del hígado (HLP) (fragmento de la región de control hepático (HCR) de apolipoproteína E humana (ApoE) (34 pb) con promotor de α -1-antitripsina (α AT)

humana modificado (217 pb)): McIntosh J. *et al.* Blood. 25 de abril de 2013; 121 (17): 3335–3344; HCR-hAAT (ApoE-HCR (319 pb) con potenciador de ApoE (1-4x154 pb) con promotor AAT humano (408 pb) e incluye un Intron A (1,4 kbp) y 3'UTR (1,7 kbp)): Miao CH *et al.* Mol Ther. 2000; 1: 522-532; ApoE-hAAT: Okuyama T *et al.* Human Gene Therapy, 7, 637- 645 (1996); LSP: Wang L *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 30 de marzo; 96 (7): 3906-3910, promotor de globulina de unión a tiroxina (TBG): Yan *et al.*, Gene 506: 289-294 (2012), y promotor de transtiretina (TTR): Costa *et al.*, Mol. Célula. Biol. 8: 81-90 (1988).

[0095] Por ejemplo, De Simone *et al.* (EMBO Journal vol. 6, no. 9, pp. 2759-2766, 1987) describe varios promotores derivados del promotor de α -1-antitripsina humana. Por ejemplo, caracteriza los elementos que actúan en cis y trans requeridos para la actividad específica del hígado dentro del promotor AAT humano de -1200 a +44. El promotor AAT humano en HLP consta del elemento X distal (32 pb) y los elementos A y B proximales (185 pb). Frain *et al.* (MOL CELL BIO, Mar. 1990, Vol. 10, No. 3, p. 991-999) describe varios promotores derivados del promotor de albúmina humana. Por ejemplo, caracteriza los elementos promotores y potenciadores dentro del gen de la albúmina humana de -1022 a -1.

[0096] Dang *et al.* (J BIOL CHEM, Vol. 270, No. 38, Edición del 22 de septiembre, pp. 22577-22585, 1995) describe la región de control hepático (HCR) del gen de la apolipoproteína E humana (774 pb). Shachter *et al.* (J. Lipid Res. 1993. Vol.34: pp1699-1707) caracteriza un potenciador específico del hígado en la ApoE HCR (154 pb). Estos fragmentos de HCR pueden combinarse con otros elementos reguladores de la transcripción tal como el promotor AAT humano o fragmentos del mismo. Chow *et al.* (J Biol Chem. Oct 5, 1991; 266 (28): 18927-33) caracteriza el potenciador de protrombina humana de -940 a -860 (80 pb). Rouet *et al.* (Vol. 267, No. 29, edición del 15 de octubre, pp. 20765-20773, 1992; Nucleic Acids Res. 1995, 11 de febrero; 23 (3): 395-404; y Biochemical Journal, 15 de septiembre de 1998, 334 (3) 577-584) caracterizan la secuencia del potenciador de α -1-microglobulina/bikunina humana específico del hígado. La patente de E.U.A. No. 7,323,324 también describe el promotor de AAT humano, potenciadores de α -microglobulina/bikunen humanos, promotor de albúmina humana y potenciadores de protrombina humana.

[0097] En algunas modalidades, el promotor comprende el complejo promotor alfa1 anti-tripsina humana (hAAT). En algunas modalidades, el promotor comprende al menos una porción del promotor hAAT. La porción del promotor hAAT puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente el

90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99%, o más, identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3.

[0098] En algunas modalidades, el promotor comprende un potenciador específico del hígado. En algunas modalidades, el promotor comprende un potenciador de apolipoproteína E (ApoE)/región de control hepático (HCR). En algunas modalidades, el promotor comprende al menos una porción del potenciador de ApoE/HCR. Por ejemplo, el potenciador de ApoE/HCR puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99%, o más, de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4.

[0099] En algunas modalidades, el promotor es un promotor sintético que comprende al menos una porción del promotor hAAT, al menos una porción del potenciador ApoE/HCR. En algunas modalidades, el promotor puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o más, de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.

[00100] En algunas modalidades, el promotor comprende múltiples copias de uno o más de los potenciadores identificados anteriormente. En algunas modalidades, los constructos promotores comprenden uno o más de los elementos potenciadores individuales descritos anteriormente y combinaciones de los mismos, en una o más orientaciones diferentes.

[00101] En algunas modalidades, el promotor está operativamente enlazado con un polinucleótido que codifica una o más proteínas de interés. En algunas modalidades, el promotor está operativamente enlazado con un polinucleótido que codifica la proteína C1E1.

[00102] El tamaño del promotor puede variar. Debido a la limitada capacidad de empaquetamiento de AAV, se prefiere usar un promotor que sea de tamaño pequeño, pero que al mismo tiempo permita un alto nivel de producción de la(s) proteína(s) de interés en las células hospederas. Por ejemplo, en algunas modalidades, el promotor tiene como máximo aproximadamente 1,5 kb, como máximo aproximadamente 1,4 kb, como máximo aproximadamente 1,35 kb, como máximo aproximadamente 1,3 kb, como máximo aproximadamente 1,25 kb, como máximo aproximadamente 1,2 kb,

como máximo aproximadamente 1,15 kb, como máximo aproximadamente 1,1 kb, como máximo aproximadamente 1,05 kb, como máximo aproximadamente 1 kb, como máximo aproximadamente 800 pares de bases, como máximo aproximadamente 600 pares de bases, como máximo aproximadamente 400 pares de bases, como máximo aproximadamente 200 pares de bases, o como máximo aproximadamente 100 pares de bases.

Otros elementos regulatorios

[00103] Se pueden usar varios elementos reguladores adicionales en los constructos de vector, por ejemplo potenciadores para aumentar aún más el nivel de expresión de la proteína de interés en una célula hospedera, una señal de poliadenilación, una secuencia de unión a ribosoma y/o un aceptor de empalme de consenso o empalme sitio donante. En algunas modalidades, el elemento regulador puede facilitar el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante extracromosómicamente en una célula hospedera y/o mejorar la potencia del vector (por ejemplo, regiones de unión de andamio/matriz (S/MAR)). Dichos elementos reguladores son bien conocidos en la técnica.

[00104] Los constructos de vectores descritos aquí pueden incluir elementos reguladores tales como una región de inicio de la transcripción y/o una región de terminación de la transcripción. Los ejemplos de una región de terminación de la transcripción incluyen, pero no se limitan a, secuencias señal de poliadenilación. Los ejemplos de secuencias señal de poliadenilación incluyen, pero no se limitan a, hormona del crecimiento humano (hGH) poli (A), hormona del crecimiento bovino (bGH) poli (A), poli (A) tardío de SV40, beta-globina de conejo (rBG) poli (A), secuencias de timidina quinasa (TK) poli (A) y cualquier variante de las mismas. En algunas modalidades, la región de terminación de la transcripción está ubicada corriente abajo del elemento regulador postranscripcional. En algunas modalidades, la región de terminación de la transcripción es una secuencia señal de poliadenilación. En algunas modalidades, la región de terminación de la transcripción es la secuencia poli (A) de hGH (SEQ ID NO: 7).

[00105] En algunas modalidades, los constructos de vector pueden incluir secuencias de iniciación de la transcripción y traducción adicionales, y/o terminadores de la traducción y transcripción adicionales, que son conocidos en la técnica.

Proteína de interés y ácidos nucleicos que codifican la proteína de interés

[00106] Como se usa aquí, una "proteína de interés" es cualquier proteína C1EI funcional, que incluye sus variantes de origen natural y de origen no natural. En algunas modalidades, se puede insertar un polinucleótido que codifica una o más proteínas C1EI de interés en los vectores virales descritos aquí, en donde el polinucleótido está enlazado operativamente con el promotor. En algunos casos, el promotor puede impulsar la expresión de la(s) proteína(s) de interés en una célula hospedera (por ejemplo, una célula de hígado humano).

[00107] En un primer aspecto, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína C1EI de tipo silvestre funcional (por ejemplo, SEQ ID NO: 2). La secuencia de nucleótidos puede ser homóloga a la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre de SEQ ID NO: 1.

[00108] Como se describe aquí, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína C1EI puede modificarse para mejorar la eficiencia de expresión de la proteína. Los métodos que se pueden usar para mejorar la transcripción y/o traducción de un gen aquí no están particularmente limitados. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos se puede modificar para reflejar mejor el uso del codón del hospedero para aumentar la expresión génica (por ejemplo, la producción de proteínas) en el hospedero (por ejemplo, un mamífero). Como otro ejemplo no limitante para la modificación, se modifica uno o más de los donantes de empalme y/o aceptores de empalme en la secuencia de nucleótidos de la proteína de interés para reducir el potencial de empalme extraño. Como otro ejemplo no limitante para la modificación, se pueden insertar uno o más intrones dentro o adyacentes a la secuencia de nucleótidos de la proteína de interés para optimizar el empaquetamiento del vector de AAV y mejorar la expresión.

[00109] La molécula de ácido nucleico codifica una proteína C1EI funcional al menos en un 90% idéntica a los aminoácidos 23-500 de SEQ ID NO: 2, y preferiblemente al menos 95% o 98% idéntica a una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre. Si el ácido nucleico codifica una proteína que comprende una secuencia que tiene cambios en cualquiera de los aminoácidos de tipo silvestre, la proteína aún debería ser una proteína funcional. Una persona con experiencia apreciará que se pueden realizar cambios menores en algunos de los aminoácidos de la proteína sin afectar adversamente la función de la proteína.

[00110] En ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico tiene al menos 75%,

al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% de homología, o al menos 98% de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEQ. ID NO: 1 o 10-12, o al menos 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 o 10-12. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína C1EI funcional, es decir, codifica C1EI que, cuando se expresa, tiene la funcionalidad de C1EI de tipo silvestre. En ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico, cuando se expresa en un sistema adecuado (por ejemplo, una célula hospedera), produce una proteína C1EI funcional y a un nivel relativamente alto. Dado que el C1EI que se produce es funcional, tendrá una conformación que es la misma que al menos una porción del C1EI de tipo silvestre. En ciertas modalidades, una proteína C1EI funcional producida como se describe aquí trata eficazmente a un sujeto que padece deficiencia de C1EI y/o HAE.

[00111] En otra modalidad, la secuencia de nucleótidos que codifica un C1EI funcional tiene un sesgo de uso de codones mejorado para la célula humana en comparación con la secuencia de nucleótidos de origen natural que codifica la correspondiente secuencia sin codón optimizado. La adaptabilidad de una secuencia de nucleótidos que codifica un C1EI funcional al uso de codones de células humanas puede expresarse como índice de adaptación de codones (CAI). Un índice de adaptación de codones se define aquí como una medida de la adaptabilidad relativa del uso de codones de un gen hacia el uso de codones de genes humanos altamente expresados. La adaptabilidad relativa (w) de cada codón es la relación entre el uso de cada codón y el del codón más abundante para el mismo aminoácido. El CAI se define como la media geométrica de estos valores de adaptabilidad relativa. Se excluyen los codones no sinónimos y los codones de terminación (que dependen del código genético). Los valores de CAI varían de 0 a 1, y los valores más altos indican una mayor proporción de los codones más abundantes (véase Sharp and Li, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 1281-1295; véase también: Kim et al., *Gene*. 1997, 199:293-301; zur Megede et al., *Journal of Virology*, 2000, 74: 2628-2635). En ciertas modalidades, una molécula de ácido nucleico que codifica un C1EI tiene un CAI de al menos 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 o 0,99.

[00112] La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NOS: 10-12 son secuencias de ácido nucleico de C1EI humano optimizadas por codones que se basaron en la secuencia de la secuencia de nucleótidos de C1EI humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

[00113] La optimización de codones se puede realizar, por ejemplo, utilizando el

algoritmo de optimización de codones DNA2.0, véase Villalobos et al., “Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments,” BMC Bioinformatics, vol. 7, artículo no: 285 (2006) o el software de optimización de codones Operon/Eurofins Genomics.

[00114] Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos se puede modificar para reflejar mejor el uso de codones del hospedero para aumentar la expresión génica (por ejemplo, producción de proteínas) en el hospedero (por ejemplo, un mamífero). Como otro ejemplo no limitante para la modificación, se modifica uno o más de los donantes de empalme y/o aceptores de empalme en la secuencia de nucleótidos de la proteína de interés para reducir el potencial de empalme extraño. Como otro ejemplo no limitante para la modificación, se pueden insertar uno o más intrones dentro o adyacentes a la secuencia de nucleótidos de la proteína de interés para optimizar el empaquetamiento del vector de AAV y mejorar la expresión.

[00115] En otra modalidad, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés tiene un sesgo de uso de codones mejorado para la célula humana en comparación con la secuencia de nucleótidos de origen natural que codifica la correspondiente secuencia optimizada sin codones. La adaptabilidad de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés para el uso de codones de células humanas puede expresarse como índice de adaptación de codones (CAI). Un índice de adaptación de codones se define aquí como una medida de la adaptabilidad relativa del uso de codones de un gen hacia el uso de codones de genes humanos altamente expresados. La adaptabilidad relativa (w) de cada codón es la relación entre el uso de cada codón y el del codón más abundante para el mismo aminoácido. El CAI se define como la media geométrica de estos valores de adaptabilidad relativa. Se excluyen los codones no sinónimos y los codones de terminación (que dependen del código genético). Los valores de CAI varían de 0 a 1, y los valores más altos indican una mayor proporción de los codones más abundantes (véase Sharp and Li, 1987, Nucleic Acids Research 15: 1281-1295; véase también: Kim et al., Gene. 1997, 199:293-301; zur Megede et al., Journal of Virology, 2000, 74: 2628-2635). En ciertas modalidades, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés tiene un CAI de al menos 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95 o 0,99.

[00116] Esto se puede hacer junto con la reducción manual del contenido de dinucleótidos de CpG y la eliminación de cualquier ORF adicional en la dirección sentido y antisentido. Se ha demostrado que el contenido de di-nucleótidos de CpG activa TLR9 en células dendríticas, lo que conduce a una posible activación

inmunitaria y respuestas de CTL. Nuestro producto en el genoma del vector AAV entregado es ADNss, lo que reduce el contenido de CpG, que puede reducir la inflamación del hígado y la ALT.

[00117] Generalmente, la optimización de codones no cambia el aminoácido que codifica cada codón. Simplemente cambia la secuencia de nucleótidos para que sea más probable que se exprese a un nivel relativamente alto en comparación con la secuencia sin codón optimizado. Esto significa que las secuencias de nucleótidos del ácido nucleico proporcionadas aquí y, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o 10-12 pueden ser diferentes pero cuando se traducen, la secuencia de aminoácidos de la proteína que se produce es la misma.

[00118] En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico de hC1EI con codones optimizados tiene un contenido de dinucleótidos CpG de menos de 25, menos de 20, menos de 15 o menos de 10. En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico de hC1EI con codones optimizados tiene un contenido de GC de menos del 65%, menos del 60% o menos del 58%.

[00119] Estaría bien dentro de las capacidades de una persona experta producir una molécula de ácido nucleico proporcionada aquí. Esto podría hacerse, por ejemplo, mediante la síntesis química de una secuencia determinada. Además, los métodos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la técnica para determinar si un ácido nucleico descrito aquí expresa una proteína funcional. Por ejemplo, un método *in vitro* adecuado implica insertar el ácido nucleico en un vector, tal como un vector AAV, transducir células hospederas, tales como células 293T o HeLa, con el vector, y analizar la actividad C1EI. Alternativamente, un método *in vivo* adecuado implica la transducción de un vector que contiene el ácido nucleico en ratones HAE y el ensayo de C1EI funcional en el plasma de los ratones. Los métodos adecuados se describen con más detalle a continuación.

[00120] En algunas modalidades, el vector comprende uno o más intrones. Los intrones pueden facilitar el procesamiento de la transcripción de ARN en células hospederas de mamíferos, aumentar la expresión de la proteína de interés y/u optimizar el empaquetamiento del vector en partículas de AAV. Ejemplos no limitantes de tal intrón son un intrón de hemoglobina (β -globina), un intrón de hAAT y/o un intrón de A1AT. En algunas modalidades, el intrón es un intrón sintético. Por ejemplo, el intrón sintético puede incluir una secuencia de nucleótidos que tenga al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente

98%, al menos aproximadamente el 99%, o más, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6. La ubicación y el tamaño del intrón en el vector pueden variar. En algunas modalidades, el intrón está ubicado entre el promotor y la secuencia que codifica la proteína de interés. En algunas modalidades, el intrón está situado corriente abajo de la secuencia que codifica la proteína de interés. En algunas modalidades, el intrón está ubicado dentro del promotor. En algunas modalidades, el intrón incluye un elemento potenciador. En algunas modalidades, el intrón está ubicado dentro de la secuencia que codifica la proteína de interés, preferiblemente entre los exones de la secuencia que codifica la proteína de interés. En algunas modalidades, el intrón puede comprender todo o una porción de un intrón de origen natural dentro de la secuencia que codifica la proteína de interés. En algunas modalidades, el intrón un intrón C1EI, por ejemplo, es el segundo intrón C1EI. En otras modalidades, la secuencia intrónica es un intrón compuesto de hAAT/hemoglobina. En algunas modalidades, el intrón también potencia la expresión del ácido nucleico que codifica C1EI.

[00121] En algunas modalidades, el constructo de vector puede comprender además una secuencia de exón o fragmento de la misma, preferiblemente adyacente a una secuencia de intrón, p. un intrón hAAT adyacente a un exón hAAT (SEQ ID NO: 72) o un fragmento del mismo y / o un intrón de hemoglobina (SEQ ID NO: 70) adyacente a un exón de hemoglobina (SEQ ID NO: 71) o fragmento del mismo.

[00122] En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 61, y el intrón puede tener aproximadamente 100 a aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 nucleótidos de longitud. En modalidades de ejemplo, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 61 y tiene aproximadamente 50-300 nucleótidos, aproximadamente 100-250 nucleótidos, aproximadamente 100-225 nucleótidos, aproximadamente 100-200 nucleótidos, aproximadamente 150-225 nucleótidos, aproximadamente 150-200 nucleótidos, aproximadamente 175-300 nucleótidos, aproximadamente 175-250 nucleótidos o aproximadamente 150-250 nucleótidos de longitud.

[00123] En algunas modalidades, el intrón comprende SEQ ID NO: 67 o un fragmento de la misma. En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 64, y el intrón puede tener aproximadamente 300 a aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 400 hasta aproximadamente 500 nucleótidos de

longitud. En modalidades de ejemplo, el intrón comprende SEQ ID NO: 64 o un fragmento de la misma y tiene aproximadamente 100-900 nucleótidos, aproximadamente 200-800 nucleótidos, aproximadamente 200-700 nucleótidos, aproximadamente 200-600 nucleótidos, aproximadamente 200-500 nucleótidos, aproximadamente 300 -700 nucleótidos, aproximadamente 300-600 nucleótidos, aproximadamente 300-500 nucleótidos, 4 aproximadamente 00-700 nucleótidos, aproximadamente 400-600 nucleótidos o aproximadamente 400-500 nucleótidos de longitud.

[00124] En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 62, y el intrón puede tener aproximadamente 200 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 400 nucleótidos de longitud.

[00125] En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 63, y el intrón puede tener aproximadamente 200 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 400 nucleótidos de longitud.

[00126] En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 65, y el intrón puede tener una longitud de aproximadamente 600 a aproximadamente 1000 nucleótidos, o de aproximadamente 800 a aproximadamente 900 nucleótidos de longitud.

[00127] En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 66, y el intrón puede tener aproximadamente 1000 a aproximadamente 2000 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 1300 a aproximadamente 1500 nucleótidos de longitud.

[00128] En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 67, y el intrón puede tener una longitud de aproximadamente 1500 a aproximadamente 2000 nucleótidos, o aproximadamente 1800 a aproximadamente 1900 nucleótidos de longitud.

[00129] En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 68, y el intrón puede tener aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nucleótidos de longitud.

[00130] En una o más modalidades, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 69, y el intrón

puede tener aproximadamente 50 a aproximadamente 125 nucleótidos de longitud.

[00131] En algunas modalidades, los constructos de vector pueden comprender además una secuencia de exón o un fragmento de la misma; preferiblemente adyacente a una secuencia de intrones. En una modalidad de ejemplo, el constructo de vector comprende un intrón hAAT adyacente a un exón que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 72. En una modalidad de ejemplo adicional, el constructo de vector comprende un intrón de hemoglobina adyacente a una secuencia de exón que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 70. En una modalidad de ejemplo, el vector comprende tanto (a) un intrón hAAT adyacente a un exón que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 72 y (b) un intrón de hemoglobina adyacente a una secuencia de exón que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% idéntico a SEQ ID NO: 70. En una modalidad de ejemplo, el constructo de vector comprende un intrón hAAT y un intrón de hemoglobina adyacente a una secuencia de exón de hemoglobina que comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80% u 85% o 90% idéntica a SEQ ID NO: 71.

[00132] La inclusión de un elemento intrón puede potenciar la expresión en comparación con la expresión en ausencia del elemento intrón (véase, por ejemplo, Kurachi et al., 1995, J Biol Chem. 10 de marzo de 1995; 270 (10): 5276-81). Los vectores AAV aceptan típicamente insertos de ADN que tienen un intervalo de tamaño definido que generalmente es de aproximadamente 4 kb a aproximadamente 5,2 kb, o un poco más. Sin embargo, no existe un tamaño mínimo para el empaquetado y los genomas de vectores pequeños se empaquetan de manera muy eficiente. Los intrones y los fragmentos de intrones cumplen este requisito al tiempo que mejoran la expresión. Por tanto, la presente descripción no se limita a la inclusión de secuencias de intrones C1EI en el vector AAV, e incluye otros intrones u otras secuencias de ADN en lugar de porciones de un intrón C1EI. Además, otras regiones 5' y 3' no traducidas de ácido nucleico pueden usarse en lugar de las enumeradas para C1EI humana.

[00133] Se pueden preparar polinucleótidos y polipéptidos que incluyen formas modificadas usando diversas técnicas de clonación estándar, tecnología de ADN recombinante, mediante expresión celular o traducción *in vitro* y técnicas de síntesis química conocidas por los expertos en la técnica (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a edición).

Métodos de suministro de genes

[00134] También se proporciona un método para usar el constructo de vector o partícula de AAV como se describe aquí para administrar un gen que codifica la proteína de interés. En una modalidad, un vector de administración de genes puede ser un vector de administración de genes víricos, tal como una partícula viral, o un vector de administración de genes no virales, como un constructo de vector o ácido nucleico que codifica la proteína de interés. Los vectores virales incluyen vectores virales lenti-, adeno-, herpes. Es preferiblemente un vector viral adenoasociado recombinante (rAAV). Alternativamente, se pueden usar sistemas no virales, incluido el uso de ADN desnudo (con o sin regiones de unión de cromatina) o ADN conjugado que se introduce en las células mediante varios métodos de transfección tales como lípidos o electroporación.

[00135] Se proporciona un ejemplo no limitante de un constructo de vector viral como se describe aquí en SEQ ID NO: 9, e incluye un promotor ApoE/HCR-hAAT, hAAT/intrón de hemoglobina (hhl), secuencia codificante de tipo silvestre para C1EI humanos y secuencia poli (A) de hormona de crecimiento humana (hGH) ("HAE15" o "ApoE/HCR-hAAT.hhl.SERPINA G1.hGH"). Otros ejemplos no limitantes de un constructo de vector viral como se describe aquí se proporcionan en cualquiera de las SEQ ID NO: 20-36, 57 y 58. Otro constructo de vector que comprende un promotor derivado de la secuencia promotora de β -actina (CBA) de pollo, una secuencia de codificación de tipo silvestre para C1EI humana y una secuencia poli(A) de factor de crecimiento bovino (bGH) se establece en SEQ ID NO: 8 ("CBA-HAE" o "CBA.SERPINA G1.bGH").

[00136] En algunas modalidades, el constructo de vector o genoma de vector de AAV comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 80%, 85% 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o más, de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, el constructo del vector o el genoma del vector AAV comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99%, o más, de identidad de secuencia con cualquiera de SEQ ID NO: 20-36. En algunas modalidades, el constructo del vector o el genoma del vector AAV comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%,

al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99%, o más, de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 57. En algunas modalidades, el constructo del vector o el genoma del vector AAV comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99%, o más, identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 58.

[00137] La presente descripción encuentra uso en aplicaciones tanto veterinarias como médicas. Los sujetos adecuados para los métodos de suministro de genes como se describen aquí incluyen tanto aves como mamíferos, siendo los mamíferos los preferidos y los humanos más preferidos. Los sujetos humanos incluyen neonatos, lactantes, jóvenes y adultos.

Suministro de genes no virales

[00138] El suministro de genes no virales se puede llevar a cabo utilizando ADN desnudo, que es el método más simple de transfección no viral. Puede ser posible, por ejemplo, administrar los constructos de vector proporcionadas aquí utilizando ADN plasmídico desnudo. Alternativamente, se pueden utilizar métodos tal como la electroporación, la sonoporación o el uso de una "pistola de genes", que dispara partículas de oro recubiertas de ADN en la célula utilizando, por ejemplo, se puede usar gas a alta presión o una pistola calibre .22 invertida (Helios® Sistema de pistola génica BIO-RAD)).

[00139] Para mejorar el suministro de un constructo de vector a una célula, puede ser necesario protegerla de daños y se puede facilitar su entrada en la célula. Con este fin, se pueden usar lipoplejos y poliplexos que tienen la capacidad de proteger un ácido nucleico de una degradación indeseable durante el proceso de transfección.

[00140] Los constructos de vector se pueden recubrir con lípidos en una estructura organizada, tal como una micela o un liposoma. Cuando la estructura organizada forma un complejo con el ADN, se llama lipoplex. Pueden usarse lípidos aniónicos y neutros para el constructo de lipoplejos para vectores sintéticos. En una modalidad, los lípidos catiónicos, debido a su carga positiva, se pueden usar para condensar moléculas de ADN cargadas negativamente para facilitar la encapsulación de ADN en liposomas. Si puede ser necesario agregar lípidos auxiliares (generalmente lípidos electroneutros, tal como DOPE) a los lípidos catiónicos para formar lipoplejos

(Dabkowska et al., J R Soc Interface. 2012 Mar 7; 9 (68): 548–561).

[00141] En ciertas modalidades, se pueden utilizar complejos de polímeros con ADN, denominados poliplejos, para suministrar un constructo de vector. La mayoría de los poliplejos consisten en polímeros catiónicos y su producción está regulada por interacciones iónicas. Los poliplejos normalmente no pueden liberar su carga de ADN en el citoplasma. Por lo tanto, puede ser necesaria la cotransfección con agentes endosoma líticos (para lisar el endosoma que se produce durante la endocitosis, el proceso por el cual el poliplejo ingresa a la célula), tal como el adenovirus inactivado (Akinc et al., *The Journal of Gene Medicine*. 7 (5): 657-63).

[00142] En ciertas modalidades, se pueden usar métodos híbridos para suministrar un constructo de vector que combina dos o más técnicas. Los virosomas son un ejemplo; combinan liposomas con un virus de influenza o VIH inactivado. En otra modalidad, otros métodos implican mezclar otros vectores virales con lípidos catiónicos o virus de hibridación y pueden usarse para suministrar un ácido nucleico (Khan, Firdos Alam, *Biotechnology Fundamentals*, CRC Press, Nov. 18, 2015, p. 395).

[00143] En ciertas modalidades, se puede usar un dendrímero para suministrar un constructo de vector, en particular, un dendrímero catiónico, es decir, uno con una carga superficial positiva. Cuando está en presencia de material genético como ADN o ARN, la complementariedad de carga conduce a una asociación temporal del ácido nucleico con el dendrímero catiónico. Al llegar a su destino, el complejo dendrímero-ácido nucleico se importa a la célula mediante endocitosis (Amiji, Mansoor M. ed., *Polymeric Gene Delivery: Principles and Applications*, CRC Press, Sep 29, 2004, p. 142).

Partículas virales

[00144] En una modalidad, se puede usar un vector de suministro de genes víricos adecuado, tal como una partícula viral, para suministrar un ácido nucleico. En ciertas modalidades, los vectores de suministro de genes virales adecuados para su uso aquí pueden ser un parvovirus, un adenovirus, un retrovirus, un lentivirus o un virus del herpes simple. El parvovirus puede ser un virus asociado a adenovirus (AAV).

[00145] Por consiguiente, la presente descripción proporciona partículas virales para su uso como vectores de suministro de genes (que comprenden un constructo de vector proporcionada aquí) basados en parvovirus animales, en particular dependovirus tales como AAV infecciosos humanos o de simios, y los componentes de los mismos (por ejemplo, un animal genoma de parvovirus) para la introducción y/o

expresión de un C1EI en una célula de mamífero. El término "parvovírico", como se usa aquí, comprende por tanto dependovirus tales como cualquier tipo de AAV.

[00146] Los virus de la familia Parvoviridae son pequeños virus de ADN de animales. La familia Parvoviridae se puede dividir en dos subfamilias: Parvovirinae, que infecta a los vertebrados, y Densovirinae, que infecta a los insectos. Los miembros de la subfamilia Parvovirinae se denominan aquí parvovirus e incluyen el género Dependovirus. Como puede deducirse del nombre de su género, los miembros del Dependovirus son únicos en el sentido de que generalmente requieren coinfección con un virus auxiliar como el adenovirus o el virus del herpes para una infección productiva en cultivo celular. El género Dependovirus incluye AAV, que normalmente infecta a humanos (por ejemplo, serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6), primates (por ejemplo, serotipos 1 y 4) y virus relacionados que infectan a otros animales de sangre caliente. (por ejemplo, virus adenoasociados de ganado bovino, canino, equino, ratón, rata y ovino) además de aves y reptiles. Se describe más información sobre los parvovirus y otros miembros de Parvoviridae en Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Capítulo 69 en Fields Virology (3a Ed. 1996). Por conveniencia, la presente descripción se ejemplifica y describe adicionalmente aquí por referencia a AAV. Sin embargo, se entiende que la presente descripción no se limita a AAV sino que se puede aplicar igualmente a otros parvovirus.

[00147] La producción de partículas de AAV requiere genes "rep" y "cap" de AAV, que son genes que codifican proteínas de replicación y encapsidación, respectivamente. Se han encontrado genes rep y cap de AAV en todos los serotipos de AAV examinados hasta la fecha, y se describen aquí y en las referencias citadas. En AAV de tipo silvestre, los genes rep y cap se encuentran generalmente adyacentes entre sí en el genoma viral (es decir, están "acoplados" entre sí como unidades transcripcionales adyacentes o superpuestas), y generalmente se conservan entre los serotipos de AAV. Los genes rep y cap de AAV también se denominan individual y colectivamente "genes de empaquetamiento de AAV". Los genes cap de AAV para su uso aquí codifican proteínas Cap que son capaces de empaquetar vectores de AAV en presencia de la función rep y adeno auxiliar y son capaces de unirse a receptores celulares objetivo. En algunas modalidades, el gen cap de AAV codifica una proteína de la cápsida que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de un serotipo de AAV particular.

[00148] Las secuencias de AAV empleadas para la producción de AAV pueden derivarse del genoma de cualquier serotipo de AAV. Generalmente, los serotipos de

AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa en los niveles de aminoácidos y ácidos nucleicos, proporcionan un conjunto similar de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente física y funcionalmente equivalentes, y se replican y ensamblan mediante mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los serotipos de AAV y una discusión de las similitudes genómicas. (Véase, por ejemplo, GenBank número de acceso U89790; GenBank número de acceso J01901; GenBank número de acceso AF043303; GenBank número de acceso AF085716; Chiorini et al., *J. Vir.* (1997) vol. 71, pp. 6823-6833; Srivastava et al., *J. Vir.* (1983) vol. 45, pp. 555-564; Chiorini et al., *J. Vir.* (1999) vol. 73, pp. 1309-1319; Rutledge et al., *J. Vir.* (1998) vol. 72, pp. 309-319; y Wu et al., *J. Vir.* (2000) vol. 74, pp. 8635-8647).

[00149] La organización genómica de todos los serotipos de AAV conocidos es muy similar. El genoma de AAV es una molécula de ADN lineal de una sola cadena que tiene menos de aproximadamente 5,000 nucleótidos (nt) de longitud. Las repeticiones terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias de nucleótidos codificantes únicas para las proteínas de replicación no estructural (Rep) y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas VP forman la cápsida. La proteína de activación del ensamblaje (AAP) acompaña rápidamente al ensamblaje de la cápsida y previene la degradación de las proteínas libres de la cápsida (Grosse et al., *J. Virol.* 91 (20): e01198-17, 2017). Los 145 nt terminales son autocomplementarios y están organizados de modo que se pueda formar un dúplex intramolecular energéticamente estable que forma una horquilla en forma de T. Estas estructuras en horquilla funcionan como un origen para la replicación del ADN viral, sirviendo como cebadores para el complejo de ADN polimerasa celular. Los genes Rep codifican las proteínas Rep, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 Rep78 y Rep68 se transcriben a partir del promotor p5, y Rep 52 y Rep40 se transcriben a partir del promotor p19. Los genes cap codifican las proteínas VP, VP1, VP2 y VP3. Los genes cap se transcriben a partir del promotor p40. Las ITR empleadas en los vectores de la presente modalidad pueden corresponder al mismo serotipo que los genes cap asociados, o pueden diferir. En una modalidad, las ITR empleadas aquí corresponden a un serotipo AAV2 y los genes cap corresponden a un serotipo AAV5.

[00150] Se sabe que las proteínas AAV VP determinan la tropicidad celular del virión de AAV. Las secuencias que codifican la proteína VP están significativamente menos conservadas que las proteínas Rep y los genes entre los diferentes serotipos de AAV. La capacidad de las secuencias Rep e ITR para complementar de forma

cruzada las secuencias correspondientes de otros serotipos permite la producción de partículas de AAV pseudotipadas que comprenden las proteínas de la cápsida de un serotipo (por ejemplo, AAV1, 5 u 8) y las secuencias Rep y/o ITR de otro serotipo AAV (por ejemplo, AAV2). Tales partículas pseudotipadas de rAAV son parte de la presente descripción.

[00151] Las partículas de AAV descritas aquí (y los genomas del vector de AAV que codifican) pueden comprender cualquiera de las proteínas de la cápsida descritas en WO 2018/022608 o PCT/US19/32097, incorporados aquí como referencia en su totalidad para su descripción de cápsidas de AAV de humano y simio y sus propiedades tales como eficiencia de transducción, tropismo tisular, unión a glucanos y resistencia a la neutralización por IVIG, que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las cápsidas en la lista de secuencias y variantes de las mismas, por ejemplo, con regiones variables intercambiadas quiméricas y/o secuencias de unión a glucanos y/o bucle de GH.

[00152] En una modalidad, las secuencias AAV ITR para su uso en el contexto de la presente descripción se derivan de AAV1, AAV2, AAV4 y/o AAV6. Asimismo, las secuencias codificantes de Rep (por ejemplo, Rep78 y Rep52) se derivan en una modalidad de AAV1, AAV2, AAV4 y/o AAV6. Sin embargo, las secuencias que codifican las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 para su uso en el contexto de la presente descripción pueden tomarse de cualquier serotipo, tal como de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV12, o de AAV de simios, incluyendo cualquiera de las proteínas de la cápsida descritas en WO 2018/022608 o PCT/US19/32097, o partículas similares a AAV recientemente desarrolladas obtenidas por ejemplo, de técnicas de barajado de cápsidas y bibliotecas de cápsidas de AAV, o cualquier cápsida idéntica al menos en un 90% a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-53 o 56.

[00153] Por ejemplo, se publican las secuencias de aminoácidos de varias cápsidas. Véase, por ejemplo,

[00154] AAVRh.1 / hu.14 / AAV9 AAS99264.1 (SEQ ID NO: 37)

[00155] AAVRh.8 SEQ97 de Pub. Pat. US. 2013/0045186 (SEQ ID NO: 38)

[00156] AAVRh.10 SEQ81 de Pub. Pat. US. 2013/0045186 (SEQ ID NO: 39)

[00157] AAVRh.74 SEQ 1 de Pub. Pat. Int'l WO 2013/123503 (SEQ ID NO: 40)

[00158] AAV1 AAB_95452.1 (SEQ ID NO: 41)

[00159] AAV2 YP_680426.1 (SEQ ID NO: 42)

[00160] AAV3 NP_043941.1 (SEQ ID NO: 43)

- [00161]** AAV3B AAB95452.1 (SEQ ID NO: 44)
- [00162]** AAV4 NP_044927.1 (SEQ ID NO: 45)
- [00163]** AAV5 YP_068409.1 (SEQ ID NO: 46)
- [00164]** AAV6 AAB95450.1 (SEQ ID NO: 47)
- [00165]** AAV7 YP_077178.1 (SEQ ID NO: 48)
- [00166]** AAV8 YP_077180.1 (SEQ ID NO: 49)
- [00167]** AAV10 AAT46337.1 (SEQ ID NO: 50)
- [00168]** AAV11 AAT46339.1 (SEQ ID NO: 51)
- [00169]** AAV12 ABI16639.1 (SEQ ID NO: 52)
- [00170]** AAV13 ABZ10812.1 (SEQ ID NO: 53)
- [00171]** Las secuencias de "AAV" modificadas también pueden usarse en el contexto de la presente descripción, por ejemplo, para la producción de vectores de terapia génica de AAV. Tales secuencias modificadas, por ejemplo, secuencias que tienen al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95% o más identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos (por ejemplo, una secuencia que tiene aproximadamente 75-99% de identidad de secuencia de nucleótidos) a un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 ITR, Rep o VP, pueden usarse en lugar de AAV ITR de tipo silvestre, Rep o secuencias VP.
- [00172]** En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápsida de AAV se une operativamente a secuencias de control de expresión para la expresión en un tipo de célula específico, como células Sf9 o HEK. Pueden usarse técnicas conocidas por un experto en la técnica para expresar genes extraños en células hospederas de insectos o células hospederas de mamíferos para practicar la modalidad. La metodología para la ingeniería molecular y la expresión de polipéptidos en células de insectos se describe, por ejemplo, en Summers and Smith (1986) A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex.; Luckow (1991) In Prokop et al., Cloning and Expression of Heterologous Genes in Insect Cells with Baculovirus Vectors' Recombinant DNA Technology and Applications, 97-152; King, L. A. and R. D. Possee (1992) The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom; O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow (1992) Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York; W.H. Freeman and Richardson, C. D. (1995) Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, volume

39; Pat. U.S. No. 4,745,051; US2003148506; y WO 03/074714, todos los cuales se incorporan como referencia en su totalidad. Un promotor particularmente adecuado para la transcripción de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápsida de AAV es por ejemplo, el promotor poliedro. Sin embargo, se conocen en la técnica otros promotores que son activos en células de insectos, por ejemplo, los promotores p10, p35 o IE-1 y otros promotores descritos en las referencias anteriores también se contemplan.

[00173] El uso de células de insectos para la expresión de proteínas heterólogas está bien documentado, al igual que los métodos para introducir ácidos nucleicos, tales como vectores, por ejemplo, vectores compatibles con células de insectos, en dichas células y los métodos para mantener dichas células en cultivo. (Véase, por ejemplo, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, ed. Richard, Humana Press, N J (1995); O'Reilly et al., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS, A LABORATORY MANUAL, Oxford Univ. Press (1994); Samulski et al., *J. Vir.* (1989) vol. 63, pp.3822-3828; Kajigaya et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* (1991) vol. 88, pp. 4646-4650; Ruffing et al., *J. Vir.* (1992) vol. 66, pp. 6922-6930; Kirnbauer et al., *Vir.* (1996) vol. 219, pp. 37-44; Zhao et al., *Vir.* (2000) vol. 272, pp. 382-393; y Pat. U.S. No. 6,204,059). En algunas modalidades, el constructo de ácido nucleico que codifica el VAA en células de insecto es un vector compatible con células de insecto. Un "vector compatible con células de insectos" o "vector" como se usa aquí se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de la transformación o transfección productiva de una célula de insecto o insecto. Los ejemplos de vectores biológicos incluyen plásmidos, moléculas de ácido nucleico lineales y virus recombinantes. Puede emplearse cualquier vector siempre que sea compatible con células de insecto. El vector puede integrarse en el genoma de las células de insecto, pero la presencia del vector en la célula de insecto no necesita ser permanente y también se incluyen vectores episomales transitorios. Los vectores pueden introducirse por cualquier medio conocido, por ejemplo mediante tratamiento químico de las células, electroporación o infección. En algunas modalidades, el vector es un baculovirus, un vector viral o un plásmido. En una modalidad, el vector es un baculovirus, es decir, el constructo es un vector baculoviral. Los vectores baculovirales y los métodos para su uso se describen en las referencias citadas anteriormente sobre ingeniería molecular de células de insectos.

MÉTODOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS AAV RECOMBINANTES

[00174] La presente descripción proporciona materiales y métodos para producir partículas de AAV recombinantes en células de insectos o mamíferos que comprenden cualquiera de los constructos de vector descritas aquí. En algunas modalidades, el constructo del vector comprende además un promotor y un sitio de restricción cadena abajo del promotor para permitir la inserción de un polinucleótido que codifica una o más proteínas de interés, en donde el promotor y el sitio de restricción están ubicados cadena abajo del 5' AAV ITR y corriente arriba del 3' AAV ITR. En algunas modalidades, el constructo de vector comprende además un elemento regulador postranscripcional corriente abajo del sitio de restricción y corriente arriba del 3' AAV ITR. En algunas modalidades, el constructo de vector comprende además un polinucleótido insertado en el sitio de restricción y enlazado operativamente con el promotor, donde el polinucleótido comprende la región codificante de una proteína de interés. Como apreciará un experto en la técnica, cualquiera de los constructos de vector de AAV descritas en la presente solicitud puede usarse en métodos para producir la partícula de AAV recombinante.

[00175] En algunas modalidades, las funciones auxiliares las proporcionan uno o más plásmidos auxiliares o virus auxiliares que comprenden genes auxiliares adenovirales o baculovirales. Los ejemplos no limitantes de genes auxiliares adenovirales o baculovirales incluyen, pero no se limitan a, E1A, E1B, E2A, E4 y VA, que pueden proporcionar funciones auxiliares al empaquetamiento de AAV.

[00176] Los virus auxiliares de AAV son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, virus de la familia Adenoviridae y la familia Herpes viridae. Los ejemplos de virus auxiliares de AAV incluyen, pero no se limitan a, virus auxiliares SAdV-13 y virus auxiliares similares a SAdV-13 descritos en la publicación de E.U.A. No. 20110201088 (cuya descripción se incorpora aquí como referencia), y vectores auxiliares pHELP (Virómica aplicada). Una persona con experiencia en la técnica apreciará que cualquier virus auxiliar o plásmido auxiliar de AAV que pueda proporcionar una función auxiliar adecuada a AAV se puede usar aquí.

[00177] En algunas modalidades, los genes cap de AAV están presentes en un plásmido. El plásmido puede comprender además un gen rep de AAV que puede o no puede corresponder al mismo serotipo que los genes cap. Los genes cap y/o el gen rep de cualquier serotipo de AAV descrito aquí (que incluyen, pero no se limitan a, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 y sus variantes) puede usarse para producir el AAV recombinante. En algunas

modalidades, los genes cap de AAV codifican una cápsida del serotipo 1, serotipo 2, serotipo 4, serotipo 5, serotipo 6, serotipo 7, serotipo 8, serotipo 9, serotipo 10, serotipo 11, serotipo 12, serotipo 13 o una variante del mismo.

[00178] En algunas modalidades, la célula de insecto o mamífero puede transfectarse con el plásmido auxiliar o virus auxiliar, el constructo de vector y el plásmido que codifica los genes cap de AAV; y el virus AAV recombinante se puede recolectar en varios puntos de tiempo después de la cotransfección. Por ejemplo, el virus AAV recombinante se puede recolectar a aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 120 horas, o un tiempo entre cualquiera de estos dos puntos de tiempo después la cotransfección.

[00179] Las partículas de AAV recombinantes también se pueden producir usando cualquier método convencional conocido en la técnica adecuado para producir AAV recombinantes infecciosos. En algunos casos, se puede producir un VAA recombinante usando una célula de insecto o mamífero que exprese de manera estable algunos de los componentes necesarios para la producción de partículas de VAA. Por ejemplo, un plásmido (o plásmidos múltiples) que comprenden genes rep y cap de AAV, y un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a neomicina, pueden integrarse en el genoma de la célula. La célula de insecto o mamífero puede luego coinfectarse con un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o baculovirus que proporcionan las funciones auxiliares) y el constructo de vector viral que comprende 5' y 3' AAV ITR (y la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga, si es deseado). Las ventajas de este método son que las células se pueden seleccionar y son adecuadas para la producción a gran escala de la partícula de AAV recombinante. Como otro ejemplo no limitante, se pueden usar adenovirus o baculovirus en lugar de plásmidos para introducir genes rep y cap en células de empaquetamiento. Como otro ejemplo no limitante, tanto el constructo de vector viral que contiene los 5' y 3' AAV ITR y los genes rep-cap pueden integrarse de manera estable en el ADN de las células productoras, y las funciones auxiliares pueden ser proporcionadas por un adenovirus de tipo silvestre para producir el AAV recombinante.

[00180] En un aspecto, aquí se proporcionan métodos para la producción de una partícula de AAV, útil como vector de suministro de genes, el método que comprende los pasos de:

(a) proporcionar una célula de insecto que comprende uno o más constructos

de ácido nucleico que comprenden:

- (i) una molécula de ácido nucleico proporcionada aquí que está flanqueada por al menos una secuencia de nucleótidos repetida terminal invertida de AAV;
 - (ii) un primer casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas Rep de AAV que está operativamente enlazada a un promotor que es capaz de dirigir la expresión de la(s) proteína(s) Rep en la célula de insecto;
 - (iii) un segundo casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas de la cápsida de AAV que está operativamente enlazada a un promotor que es capaz de dirigir la expresión de la(s) proteína(s) de la cápsida en la célula de insecto;
 - (iv) y opcionalmente AAP y MAAP contenidos en el ARNm de VP2/3
- (b) cultivar la célula de insecto definida en (a) en condiciones que conduzcan a la expresión de la Rep y las proteínas de la cápsida; y, opcionalmente,
- (c) recuperar el vector de suministro del gen AAV.

[00181] Entonces, típicamente, un método proporcionado aquí para producir un vector de administración de genes de AAV comprende: proporcionar a una célula permisiva para la replicación de AAV (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un molde para producir un genoma de vector, p. construcción de vector de la presente descripción (como se describe en detalle aquí); (b) secuencias de nucleótidos suficientes para la replicación del molde para producir un genoma de vector (el primer casete de expresión definido anteriormente); (c) secuencias de nucleótidos suficientes para empaquetar el genoma del vector en una cápsida de AAV (el segundo casete de expresión definido anteriormente), en condiciones suficientes para la replicación y empaquetamiento del genoma del vector en la cápsida de AAV, por lo que las partículas de AAV que comprenden el genoma del vector encapsulado dentro de la cápsida de AAV se produce en la célula.

[00182] Transfección transitoria de células HEK293 adherentes (Chahal et al., J. Virol. Meth. 196: 163-73 (2014)) y transfección de células Sf9, usando el sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS) (Mietzsch et al., Hum. Gene Ther. 25: 212-22 (2014)), son dos de los métodos más utilizados para producir vectores AAV.

[00183] Un método proporcionado aquí puede comprender el paso de purificación por afinidad del (viriones que comprenden el) vector parvovírico recombinante (rAAV)

usando un anticuerpo anti-AAV, en una modalidad un anticuerpo inmovilizado. En otra modalidad, el anticuerpo anti-AAV es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo para su uso aquí es un anticuerpo de camélido de cadena sencilla o un fragmento del mismo como por ejemplo obtenible de camellos o llamas (véase, por ejemplo, Muyldermans, 2001, *Biotechnol.* 74: 277-302). El anticuerpo para la purificación por afinidad de rAAV es un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en una proteína de la cápsida de AAV, por lo que en una modalidad el epítipo es un epítipo que está presente en la proteína de la cápsida de más de un serotipo de AAV. Por ejemplo, el anticuerpo se puede generar o seleccionar sobre la base de la unión específica a la cápsida de AAV5 pero al mismo tiempo también puede unirse específicamente a las cápsidas de AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8 o AAV9.

[00184] Los métodos proporcionados aquí para producir partículas de rAAV producen una población de partículas de rAAV. En algunas modalidades, la población se enriquece con partículas que comprenden genomas de vector de longitud completa o casi completa mediante etapas que reducen el número de cápsides vacías.

[00185] La población de partículas de rAAV producidas por los métodos proporcionados aquí se usa, por ejemplo, para la administración en cualquiera de los métodos de tratamiento descritos aquí.

TIPOS DE CÉLULAS UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS AAV

[00186] Las partículas virales que comprenden los constructos de vector descritos aquí se pueden producir usando cualquier tipo de célula de invertebrado que permita la producción de AAV o productos biológicos y que se pueda mantener en cultivo. Por ejemplo, la línea celular de insecto usada puede ser de *Spodoptera frugiperda*, tal como SF9, SF21, SF900+, líneas celulares de *Drosophila*, líneas celulares de mosquitos, por ejemplo, líneas celulares derivadas de *Aedes albopictus*, líneas celulares de gusanos de seda domésticos, por ejemplo, líneas celulares *Bombyx mori*, líneas celulares *Trichoplusia ni* tales como células High Five o líneas celulares *Lepidoptera* tales como líneas celulares *Ascalapha odorata*. En una modalidad, las células de insecto son células de las especies de insectos que son susceptibles a la infección por baculovirus, incluyendo High Five, Sf9, Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, BM-N, Ha2302, Hz2E5 y Ao38.

[00187] Los baculovirus son virus de ADN envueltos de artrópodos, dos miembros de los cuales son vectores de expresión bien conocidos para producir proteínas

recombinantes en cultivos celulares. Los baculovirus tienen genomas circulares de doble cadena (80-200 kbp) que pueden modificarse para permitir el suministro de un gran contenido genómico a células específicas. Los virus utilizados como vector son generalmente nucleopoliedrovirus multicapsid de *Autographa californica* (AcMNPV) o nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori* (BmNPV) (Kato et al., (2010), *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, número 3, pp. 459-470).

[00188] Los baculovirus se usan comúnmente para la infección de células de insectos para la expresión de proteínas recombinantes. En particular, la expresión de genes heterólogos en insectos se puede lograr como se describe, por ejemplo, en la patente de E.U.A. No. 4,745,051; EP 127.839; EP 155.476; Vlak et al., (1988), *Journal of General Virology*, vol. 68, pp 765-776; Miller et al., (1988), *Annual Review of Microbiology*, vol. 42, pp 177-179; Carbonell et al., (1998), *Gene*, vol. 73, Issue 2, pp 409-418; Maeda et al., (1985), *Nature*, vol. 315, pp 592-594; Lebacqz-Veheyden et al., (1988), *Molecular and Cellular Biology*, vol. 8, no. 8, pp 3129-3135; Smith et al., (1985), *PNAS*, vol. 82, pp 8404-8408; and Miyajima et al., (1987), *Gene*, vol. 58, pp 273-281. Numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospederas de insectos permisivas que pueden usarse para la producción de proteínas se describen en Luckow et al., (1988), *Nature Biotechnology*, vol. 6, pp. 47-55; Maeda et al., (1985), *Nature*, vol. 315, pp. 592-594; y McKenna et al., (1998), *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 71, número 1, pp. 82-90.

[00189] En otra modalidad, los métodos proporcionados aquí se llevan a cabo con cualquier tipo de célula de mamífero que permita la replicación de AAV o la producción de productos biológicos, y que se pueda mantener en cultivo. En una modalidad, las células de mamífero utilizadas pueden ser células HEK293, HeLa, CHO, NSO, SP2/0, PER.C6, Vero, RD, BHK, HT 1080, A549, Cos-7, ARPE-19 y MRC-5.

Organismo hospedero y/o células

[00190] En una modalidad adicional, se proporciona una célula hospedera que comprende el vector descrito anteriormente. En una modalidad, el constructo de vector es capaz de expresar la molécula de ácido nucleico proporcionada aquí en la célula hospedera. En algunas modalidades, se proporcionan aquí agentes terapéuticos de HAE que son células hospederas que comprenden un constructo de vector que comprende un ácido nucleico que codifica hC1EI, para su uso en terapia de células HAE.

[00191] Como se usa aquí, el término "hospedero" se refiere a organismos y/o

células que albergan una molécula de ácido nucleico o un constructo de vector de la presente descripción, así como organismos y/o células que son adecuadas para su uso en la expresión de un gen o proteína recombinante. No se pretende que la presente descripción se limite a ningún tipo particular de célula u organismo. De hecho, se contempla que cualquier organismo y/o célula adecuados encontrará uso aquí como hospedero. Una célula hospedera puede estar en forma de una sola célula, una población de células similares o diferentes, por ejemplo en forma de un cultivo (como un cultivo líquido o un cultivo sobre un sustrato sólido), un organismo o parte del mismo. En una modalidad, una célula hospedera puede permitir la expresión de una molécula de ácido nucleico proporcionada aquí. Por tanto, la célula hospedera puede ser, por ejemplo, una célula bacteriana, una levadura, un insecto o una célula de mamífero, o una célula humana.

[00192] En otra modalidad, se proporciona un medio para suministrar un ácido nucleico proporcionado aquí en una amplia gama de células, que incluyen las células en división y las que no se dividen. La presente descripción se puede emplear para administrar un ácido nucleico proporcionado aquí a una célula *in vitro*, por ejemplo, para producir un polipéptido codificado por dicha molécula de ácido nucleico *in vitro* o para terapia génica *ex vivo*.

[00193] La molécula de ácido nucleico, el constructo del vector, las células y los métodos/uso de la presente descripción son además útiles en un método para administrar un ácido nucleico proporcionado aquí en un hospedero, típicamente un hospedero que padece HAE.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

[00194] En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico o un vector proporcionado aquí y un diluyente, excipiente, portador y/u otro agente medicinal, agente farmacéutico o adyuvante farmacéuticamente aceptable, etc.

[00195] Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto sin causar ningún efecto biológico indeseable. Por tanto, dicha composición farmacéutica se puede utilizar, por ejemplo, en la transfección de una célula *ex vivo* o en la administración de una partícula o célula vírica directamente a un sujeto.

[00196] Un portador puede ser adecuado para la administración parenteral, que incluye la administración intravenosa, intraperitoneal o intramuscular.

Alternativamente, el portador puede ser adecuado para administración sublingual u oral. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí.

[00197] En otras modalidades, aquí se proporcionan composiciones farmacéuticas (es decir, formulaciones) de partículas de AAV útiles para la administración a sujetos que padecen un trastorno genético para administrar un gen que codifica una proteína de interés. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas aquí son formulaciones líquidas que comprenden partículas de AAV recombinantes que comprenden cualquiera de los constructos de vector descritas aquí. La concentración de viriones AAV recombinantes en la formulación puede variar. En ciertas modalidades, la concentración de partículas de AAV recombinantes en la formulación puede variar de $1E12$ vg/ml a $5E14$ vg/ml. En una modalidad, la concentración de partículas de AAV recombinantes en la formulación es de aproximadamente $6E13$ vg/ml.

[00198] En otras modalidades, la formulación farmacéutica de partículas de AAV proporcionada aquí comprende uno o más excipientes estériles farmacéuticamente aceptables para proporcionar a la formulación propiedades ventajosas para el almacenamiento y/o administración a sujetos para el tratamiento del trastorno genético. En ciertas modalidades, las formulaciones farmacéuticas proporcionadas aquí pueden almacenarse a -65°C durante un período de al menos 2 semanas, en una modalidad al menos 4 semanas, en otra modalidad al menos 6 semanas y aún en otra modalidad al menos aproximadamente 8 semanas, sin cambios detectables en la estabilidad. A este respecto, el término "estable" significa que la partícula de AAV recombinante presente en la formulación retiene esencialmente su estabilidad física, estabilidad química y/o actividad biológica durante el almacenamiento. En ciertas modalidades, la partícula de AAV recombinante presente en la formulación farmacéutica retiene al menos aproximadamente el 80% de su actividad biológica en un paciente humano durante el almacenamiento durante un período de tiempo determinado a -65°C , en otras modalidades al menos aproximadamente el 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de su actividad biológica en un sujeto humano. En una modalidad, los sujetos son sujetos humanos jóvenes.

[00199] En ciertos aspectos, la formulación que comprende una partícula de AAV recombinante comprende además uno o más agentes reguladores de pH. Por ejemplo, en varias modalidades, la formulación proporcionada aquí comprende fosfato de sodio dibásico a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, o aproximadamente 1,4 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml. En una modalidad, la formulación de partículas de AAV proporcionada aquí comprende aproximadamente 1,42 mg/ml de fosfato de sodio, dibásico (seco). Otro agente regulador de pH que puede encontrar uso en las formulaciones de partículas de AAV recombinantes proporcionadas aquí es fosfato de sodio, monohidrato monobásico que, en algunas modalidades, encuentra uso a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml, o aproximadamente 1,3 mg/ml a aproximadamente 1,5 mg/ml. En una modalidad, la formulación de partículas de AAV de la presente modalidad comprende aproximadamente 1,38 mg/ml de fosfato de sodio monobásico monohidratado. En otra modalidad, la formulación de partículas de AAV recombinante proporcionada aquí comprende aproximadamente 1,42 mg/ml de fosfato de sodio, dibásico y aproximadamente 1,38 mg/ml de fosfato de sodio, monobásico monohidratado.

[00200] En otra modalidad, la formulación de partículas de AAV recombinantes proporcionada aquí puede comprender uno o más agentes de isotonicidad, tal como cloruro de sodio, en una modalidad a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, o aproximadamente 8 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. En otra modalidad, la formulación de partículas de AAV recombinante proporcionada aquí comprende aproximadamente 8,18 mg/ml de cloruro de sodio. Otros agentes reguladores de pH y agentes de isotonicidad conocidos en la técnica son adecuados y pueden emplearse de forma rutinaria para su uso en las formulaciones proporcionadas aquí.

[00201] En otra modalidad, las formulaciones de partículas de AAV recombinantes proporcionadas aquí pueden comprender uno o más agentes de carga. Los agentes de carga ejemplares incluyen, sin limitación, manitol, sacarosa, dextrano, lactosa, trehalosa y povidona (PVP K24). En ciertas modalidades, las formulaciones proporcionadas aquí comprenden manitol, que puede estar presente en una cantidad

de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml, o de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, o de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml. En otra modalidad, el manitol está presente en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml.

[00202] En otra modalidad más, las formulaciones de partículas de AAV recombinantes proporcionadas aquí pueden comprender uno o más agentes tensoactivos, que pueden ser agentes tensoactivos no iónicos. Los agentes tensoactivos ejemplares incluyen agentes tensoactivos iónicos, agentes tensoactivos no iónicos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el agente tensoactivo puede ser, sin limitación, TWEEN 80 (también conocido como polisorbato 80, o su nombre químico monooleato de polioxietilensorbitano), dodecilsulfato de sodio, estearato de sodio, lauril sulfato de amonio, TRITON AG 98 (Rhone-Poulenc), poloxámero 407, poloxámero 188 y similares, y combinaciones de los mismos. En una modalidad, la formulación de la presente modalidad comprende poloxámero 188, que puede estar presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, de aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 2,5 mg/ml, o de aproximadamente 1,8 mg/ml a aproximadamente 2,2 mg/ml. En otra modalidad, el poloxámero 188 está presente a una concentración de aproximadamente 2,0 mg/ml.

[00203] Las formulaciones de partículas de AAV recombinantes proporcionadas aquí son estables y pueden almacenarse durante periodos de tiempo prolongados sin un cambio inaceptable en la calidad, potencia o pureza. En un aspecto, la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 5°C (por ejemplo, 2°C a 8°C) durante al menos 1 mes, por ejemplo, al menos 1 mes, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses o más. En otra modalidad, la formulación es estable a una temperatura menor o igual a aproximadamente -20°C durante al menos 6 meses, por ejemplo, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses o más. En otra modalidad, la formulación es estable a una temperatura menor o igual a aproximadamente -40°C durante al menos 6 meses, por ejemplo, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses o más. En otra modalidad, la formulación es estable a una temperatura menor o igual a aproximadamente -60°C durante al menos 6 meses, por ejemplo, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos por lo menos

36 meses o más.

[00204] Las composiciones farmacéuticas son típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para adaptarse a una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de agentes tensoactivos. En algunas modalidades, se incluyen en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. En ciertas modalidades, un constructo de vector o ácido nucleico proporcionado aquí puede administrarse en una formulación de liberación controlada o de tiempo, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta u otros portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, que incluyen sistemas de suministro micronencapsulado e implantes. Pueden usarse, por ejemplo, polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos poliglicólicos (PLG).

[00205] En ciertas modalidades, la composición farmacéutica que comprende el constructo de vector o partícula de AAV proporcionada aquí puede ser útil para transferir material genético a una célula. Tal transferencia puede tener lugar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por consiguiente, una modalidad proporciona un método para suministrar una secuencia de nucleótidos a una célula, cuyo método que comprende poner en contacto un ácido nucleico, un constructo de vector o una composición farmacéutica como se describe aquí en condiciones tales como el ácido nucleico o vector proporcionado aquí que entra en la célula. La célula puede ser una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

[00206] En ciertas modalidades, aquí se proporcionan métodos para tratar a un

sujeto que padece un trastorno genético que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico que codifica C1EI, un constructo de vector, una partícula de AAV o una célula hospedera que expresa un C1EI, o una composición farmacéutica que lo comprenda. En este caso, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad que después de la administración da como resultado la expresión de la proteína terapéutica en un nivel suficiente para mejorar al menos parcial y preferiblemente totalmente los síntomas del trastorno genético.

[00207] En una modalidad, se proporciona aquí un método para tratar la deficiencia de C1EI que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico, un constructo de vector, una partícula de AAV, una célula hospedera o una composición farmacéutica proporcionada aquí a un paciente que padece una deficiencia de C1EI, por ejemplo HAE. En una modalidad, el paciente es un ser humano. En una modalidad, la población de pacientes en cuestión son pacientes con deficiencia de C1EI de moderada a grave, que incluyen aquellos con HAE o formas variantes de HAE. En una modalidad, el objetivo del tratamiento es la conversión de pacientes con HAE grave a HAE moderado o leve, disminuyendo así la carga asociada con ataques de HAE agudos recurrentes. En una modalidad, el tratamiento aumenta los niveles funcionales de C1EI en sangre a un rango normal o hasta al menos un 40% del intervalo normal de aproximadamente 16 mg/dL (o 1 UI/ml) a aproximadamente 32 mg/dL. En modalidades relacionadas, el tratamiento mejora los síntomas de HAE o reduce la frecuencia, duración o gravedad de los ataques agudos de HAE. En algunas modalidades, el tratamiento reduce la cantidad de terapia a demanda (por ejemplo, proteína C1EI humana, inhibidor de calicreína, antagonista de bradicinina, etc.) requerida para tratar ataques agudos de HAE, o reduce la frecuencia con la que se administra la terapia a demanda para tratar ataques agudos de HAE. En algunas realizaciones, los sujetos que recibieron el tratamiento experimentan al menos una reducción del 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en la frecuencia de los ataques en comparación con los sujetos que no recibieron el tratamiento.

[00208] En una modalidad, aquí se proporcionan métodos para aumentar los niveles de proteína C1EI circulantes en la sangre de un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto cualquiera de los ácidos nucleicos, constructos de vectores, partículas de AAV, células hospederas o composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí, que expresan la proteína C1EI.

[00209] En otra modalidad, aquí se proporciona el uso de una cantidad efectiva de partícula de AAV recombinante descrita aquí para la preparación de un medicamento

para el tratamiento de un sujeto que padece deficiencia de C1EI o HAE funcional. En una modalidad, el sujeto que padece HAE es un ser humano. En una modalidad, el medicamento se administra mediante administración intravenosa (IV). En otra modalidad, la administración del medicamento da como resultado la expresión de la proteína C1EI en el torrente sanguíneo del sujeto suficiente para aumentar los niveles funcionales de C1EI en la sangre del sujeto hasta al menos el rango normal o al menos el 40% del rango normal de aproximadamente 16 mg/dL (o 1 UI/ml) a aproximadamente 32 mg/dL.

[00210] En una o más modalidades, los métodos de tratamiento proporcionados aquí también comprenden la administración de un corticosteroide profiláctico y/o terapéutico para la prevención y/o el tratamiento de cualquier hepatotoxicidad asociada con la administración del virus AAV C1EI. El tratamiento profiláctico o terapéutico con corticosteroides puede comprender al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más mg/día del corticosteroide. En ciertas modalidades, el corticosteroide profiláctico o terapéutico se puede administrar durante un período continuo de al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas o más.

[00211] En o más modalidades, los métodos de tratamiento proporcionados aquí incluyen opcionalmente la administración, por ejemplo, administración concurrente, de otras terapias que se utilizan para tratar HAE, por ejemplo, un andrógeno atenuado tal como danazol, estanozolol, oxandrolona, metiltestosterona, tibolona, oximetolona. En algunas modalidades, los métodos de tratamiento proporcionados aquí comprenden la administración adjunta de uno o más de los siguientes: una proteína C1EI, opcionalmente recombinante o derivada de plasma, un inhibidor de calicreína, un antagonista de bradicinina y/o un andrógeno atenuado, para ataques agudos de HAE.

[00212] Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un ácido nucleico, un constructo de vector, una partícula de AAV, una célula hospedera o una composición farmacéutica que lo comprenda para fines de tratamiento como se describe aquí puede determinarse empíricamente y de manera rutinaria. En ciertas modalidades, sin embargo, una "cantidad terapéuticamente efectiva" de partícula de AAV recombinante varía de aproximadamente 1×10^{12} a aproximadamente 1×10^{14} o 1×10^{15} vg/kg. En otra modalidad, la partícula de rAAV se suministra a aproximadamente 2×10^{12} a aproximadamente 2×10^{14} vg/kg. En otra modalidad más, la partícula de rAAV se administra a aproximadamente 2×10^{12} a aproximadamente 6×10^{13} vg/kg. En otra realización más, la partícula de rAAV se administra a aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 1×10^{15} vg/kg.

[00213] En una modalidad, los constructos de vector recombinante o partículas de AAV proporcionadas aquí pueden administrarse a un sujeto, en una modalidad a un sujeto mamífero o un sujeto humano, a través de una variedad de técnicas de administración conocidas. En algunas modalidades, el constructo del vector o la partícula de AAV recombinante se administra mediante inyección intravenosa como un solo bolo o durante un período de tiempo prolongado, que puede ser al menos aproximadamente 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210 o 240 minutos, o más.

[00214] En cualquiera de los métodos de tratamiento descritos aquí, la eficacia del tratamiento se puede controlar midiendo los niveles de los niveles de C1EI funcionales expresados en la sangre del sujeto tratado. Los ensayos de cuantificación precisos para cuantificar los niveles circulantes de C1EI son bien conocidos en la técnica e incluyen ELISA, ensayos de transferencia Western, ensayos fluorométricos (véase, McCaman, MW y Robins, E., (1962) *J. Lab. Clin. Med.*, Vol. 59, pp. 885-890); espectroscopía de masas, ensayos basados en cromatografía de capa fina (véase, Tsukerman, G. L. (1985) *Laboratornoe delo*, vol. 6, pp. 326-327); ensayos enzimáticos (véase, La Du, BN, et al. (1963) *Pediatrics*, vol. 31, pp. 39-46; y Peterson, K., et al. (1988) *Biochem. Med. Metab. Biol.*, vol. 39, pp. 98-104); métodos que emplean cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (véase, Rudy, J. L. et al., (1987) *Clin. Chem.*, vol. 33, pp. 1152-1154); y automatización de alto rendimiento (véase, Hill, J. B. et al., (1985) *Clin. Chem.*, vol. 5, pp. 541-546). Los ensayos funcionales para confirmar la actividad C1EI están disponibles comercialmente, por ejemplo, el kit cromogénico TECHNOCHROM® en el que C1-inh se valora frente a un exceso de C1-esterasa para formar un complejo inhibidor, y la actividad residual de C1-esterasa se mide utilizando un sustrato cromogénico. Además, la eficacia del tratamiento se puede monitorear con respecto a la reducción de la frecuencia (número) de ataques agudos de HAE y/o la gravedad de los ataques de HAE, y la reducción del uso de la terapia a demanda para tratar los ataques agudos de HAE.

[00215] La administración de una partícula de AAV de la presente descripción puede, en algunos casos, dar como resultado un grado observable de hepatotoxicidad. La hepatotoxicidad se puede medir mediante una variedad de técnicas conocidas y de uso rutinario, por ejemplo, midiendo las concentraciones de ciertas enzimas asociadas al hígado (por ejemplo, alanina transaminasa, ALT) en el torrente sanguíneo de un sujeto antes de la administración de AAV (es decir, línea de base) y después de la administración de AAV. Un aumento observable en la concentración de ALT después

de la administración de AAV (en comparación con antes de la administración) es indicativo de hepatotoxicidad inducida por fármacos. En ciertas modalidades, además de la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de virus AAV, el sujeto puede tratarse profilácticamente, terapéuticamente o ambos con un corticosteroide para prevenir y/o tratar cualquier hepatotoxicidad asociada con la administración del virus AAV.

[00216] El tratamiento con corticosteroides "profiláctico" se refiere a la administración de un corticosteroide para prevenir la hepatotoxicidad y/o prevenir un aumento en los niveles de ALT medidos en el sujeto. El tratamiento con corticosteroides "terapéutico" se refiere a la administración de un corticosteroide para reducir la hepatotoxicidad provocada por la administración de un virus AAV y/o para reducir una concentración elevada de ALT en el torrente sanguíneo del sujeto provocada por la administración de un virus AAV. En ciertas modalidades, el tratamiento profiláctico o terapéutico con corticosteroides puede comprender la administración de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más mg/día del corticosteroide al sujeto. En ciertas modalidades, el tratamiento profiláctico o terapéutico con corticosteroides de un sujeto puede ocurrir durante un período continuo de al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas o más. Los corticosteroides que encuentran uso en los métodos descritos aquí incluyen cualquier corticosteroide conocido o empleado habitualmente, incluyendo, por ejemplo, dexametasona, prednisona, fludrocortisona, hidrocortisona y similares.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-AAV

[00217] Para maximizar la probabilidad de una transducción hepática satisfactoria con la transferencia génica terapéutica mediada por AAV sistémica, antes de la administración de una partícula de AAV en un régimen terapéutico a un paciente humano como se describe anteriormente, el posible paciente puede ser evaluado por la presencia de anticuerpos de cápsida anti-AAV o anticuerpos neutralizantes anti-AAV que son capaces de bloquear la transducción celular o reducir de otro modo la eficacia global del régimen terapéutico. Dichos anticuerpos pueden estar presentes en el suero del posible paciente y pueden dirigirse contra una cápsida de AAV de cualquier serotipo. En una modalidad, el serotipo contra el que se dirigen los anticuerpos preexistentes es AAV5.

[00218] Los métodos para detectar la inmunidad de AAV preexistente son bien conocidos y se emplean de forma rutinaria en la técnica e incluyen ensayos de

inhibición de la transducción (TI) *in vitro* basados en células, ensayos de TI *in vivo* (por ejemplo, en ratones) y detección basada en ELISA de anticuerpos anti-cápsida totales (TAb) (véase, por ejemplo, Masat *et al.*, *Discov. Med.*, vol. 15, pp. 379-389 and Boutin *et al.*, (2010) *Hum. Gene Ther.*, vol. 21, pp. 704-712). Los ensayos de TI pueden emplear células hospederas en las que se haya introducido previamente un vector indicador inducible por AAV. El vector indicador puede comprender un gen indicador inducible tal como GFP, etc., cuya expresión se induce tras la transducción de la célula hospedera por un virus AAV. Los anticuerpos de la cápsida anti-AAV presentes en el suero humano que son capaces de prevenir/reducir la transducción de la célula hospedera reducirían así la expresión global del gen indicador en el sistema. Por tanto, tales ensayos pueden emplearse para detectar la presencia de anticuerpos de la cápsida anti-AAV en suero humano que son capaces de prevenir/reducir la transducción celular por el virus AAV-C1El terapéutico.

[00219] Los ensayos para detectar anticuerpos de la cápsida anti-AAV pueden emplear la cápsida de AAV unida en fase sólida como un "agente de captura" sobre el que se pasa el suero humano, permitiendo así que los anticuerpos anti-cápsida presentes en el suero se unan "agente de captura" de la cápsida unida a la fase sólida. Una vez lavada para eliminar la unión no específica, se puede emplear un "agente de detección" para detectar la presencia de anticuerpos anti-cápsida unidos al agente de captura. El agente de detección puede ser un anticuerpo, una cápsida de AAV, o similar, y puede marcarse de forma detectable para ayudar en la detección y cuantificación del anticuerpo anti-cápsida unido. En una modalidad, el agente de detección se marca con rutenio o un complejo de rutenio que puede detectarse usando técnicas y equipos de electroquimioluminiscencia.

[00220] Puede emplearse la misma metodología descrita anteriormente para evaluar y detectar la generación de una respuesta inmune de la cápsida anti-AAV en un paciente tratado previamente con un virus AAV terapéutico de interés. Como tal, estas técnicas no solo pueden emplearse para evaluar la presencia de anticuerpos de la cápsida anti-AAV antes del tratamiento con un virus AAV terapéutico, sino que también pueden emplearse para evaluar y medir la inducción de una respuesta inmune contra el virus AAV terapéutico administrado después de la administración. Como tal, aquí se contemplan métodos que combinan técnicas para detectar anticuerpos de la cápsida anti-AAV en suero humano y la administración de un virus de AAV terapéutico para el tratamiento de HAE, en donde las técnicas para detectar anticuerpos de la cápsida anti-AAV en suero humano se pueden realizar bien antes o después de la

administración del virus AAV terapéutico.

[00221] Otros aspectos y ventajas de la presente descripción se entenderán considerando los siguientes ejemplos ilustrativos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: EVALUACIÓN DE UN CASSETTE DE EXPRESIÓN C1EI IMPULSADO POR UN PROMOTOR ESPECÍFICO DE HÍGADO.

Generación de vectores que expresan C1EI humano de tipo silvestre enlazado operativamente a un promotor específico del hígado

[00222] Se diseñó una variedad de vectores de terapia génica de AAV recombinantes que comprenden un ADNc de SERPINAG1 de tipo silvestre o de codón optimizado enlazado operativamente a un promotor híbrido de apolipoproteína E humana (ApoE)/HCR/promotor alfa anti-tripsina (AAT) humano (Cuadro 1). En la Figura 1 se proporcionan además descripciones representativas de las configuraciones del vector. Las configuraciones del genoma del vector incluían opcionalmente una secuencia del intrón de hAAT/hemoglobina (hhl), así como una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humana o bovina (bGHpA o hGHpA, respectivamente). Los genomas del vector están flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR) derivadas de AAV serotipo 2 (AAV2) y tienen un tamaño de 3087 pb a 4779 pb de longitud. Los vectores se prepararon usando técnicas de clonación convencionales como se describe, por ejemplo, por Gibson et al. (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases". Nature Methods. 6 (5): 343–345, y Gibson DG. (2011). "Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments". Methods in Enzymology. 498: 349–361, que se incorporan aquí como referencia.

CUADRO 1
Constructos vectoriales AAV-C1EI

Código	Constructo	SEQ ID NO:
HAE1	pFB-ApoE-hAAT-LGI-50-SERPINA G1	20
HAE2	pFB-ApoE-hAAT-LGI-225-SERPINA G1	21
HAE3	pFB-ApoE-hAAT-LGI-450-SERPINA G1	22
HAE4	pFB-ApoE-hAAT-LGI-900- SERPINA G1	23
HAE5	pFB-ApoE-hAAT-LGI-900-SEPRIN G1-JCAT	24
HAE6	pFB-ApoE-hAAT-LGI-900-SERPINA G1-JCAT-HCG	25
HAE7	pFB-ApoE-hAAT-LGI-900-SERPINA G1-opt	26
HAE8	pFB-ApoE-hAAT-LGI-SERPINA G1-JCAT-HCG	27
HAE9	pFB-ApoE-hAAT-LGI-SERPINA G1-Cop-GS-RCG	28
HAE10	pFB-ApoE-hAAT-LGI-SERPINA G1-IDT	29
HAE11	pFB-ApoE-hAAT-LGI-SERPINA G1-JCAT	30
HAE12	pFB-ApoE-hAAT-SERPINA G1-Cop-GS-RCG-hGHpA-4300	31
HAE13	pFB-ApoE-hAAT-SERPINA G1-IDT-hGHpA-4300	32
HAE14	pFB-ApoE-hAAT-SERPINA G1-JCAT-hGHpA-4300	33
HAE15	pFB-ApoE-hAAT-SERPINA G1-P1-hGHpA-4300	9
HAE16	pFB-ApoE-hAAT-LGI-SERPINA G1-WT	34
HAE17	pFB-ApoE-hAAT-LGI-SERPINA G1-WT delección marcada para 4399	35
HAE23	pFB-ApoE-hAAT-HB intrón-SERPINA G1-WT-bGHpA	57
HAE24	pFB-ApoE-hAAT-HB intrón-SERPINA G1-WT-hGHpA	58

Ensayos para probar la expresión y actividad de los vectores AAV-C1EI

[00223] Los ensayos para probar los vectores AAV-C1EI recombinantes proporcionados aquí incluyen, por ejemplo, (1) transfección transitoria de plásmidos de ADN de cadena doble que comprenden los ácidos nucleicos del vector de AAV en células HepG2, una línea celular derivada de hígado humano, para comprobar producción y secreción de proteína C1EI específica del hígado *in vitro*; (2) producción de viriones AAV que comprenden los vectores AAV-C1EI en células 293 y células de insectos infectadas con baculovirus, seguida de la confirmación del vector AAV-C1EI en células 293 y células de insectos infectadas con baculovirus, seguida de la confirmación de la integridad de la proteína de la cápsida y los ácidos nucleicos del vector AAV; y (3) evaluación de la expresión de C1EI y la actividad de C1EI en ratones Rag2 -/-.

Ensayos de transfección transitoria

[00224] Se realizó un ensayo *in vitro* preliminar para comparar la expresión y actividad de C1EI de los vectores de terapia génica de AAV recombinantes descritos anteriormente (véase también la Figura 1). En una modalidad, los plásmidos de los constructos de vector se transfectan transitoriamente en la línea de células hepáticas humanas, HepG2. Después de la transfección, por ejemplo, 24 o 48 o 72 horas después, se mide la expresión de C1EI. Usando este ensayo, se demostró que los vectores de terapia génica de AAV recombinantes eran capaces de expresar la proteína C1EI en células HepG2 transfectadas transitoriamente a niveles de aproximadamente 20220 a 721 ng/ml como se muestra en la Figura 2.

Producción de viriones AAV-C1EI en células 293 y células de insectos infectadas con baculovirus

[00225] Para demostrar que los vectores recombinantes de la presente modalidad de hecho empaquetan los ácidos nucleicos que codifican C1EI, las formas de cadena doble de los vectores AAV-C1EI generados como se describió anteriormente se introdujeron en células capaces de producir viriones AAV. Se generaron constructos de baculovirus que expresan los ácidos nucleicos del vector AAV-C1EI y las proteínas Cap y Rep de AAV, y luego se coinfectaron en células de insectos, preferiblemente libres de rabdovirus, derivadas de células Sf9. Los viriones de AAV resultantes se purificaron y analizaron mediante métodos estándar conocidos en la técnica. En un sistema de producción de virus AAV alternativo, los plásmidos que comprenden los ácidos nucleicos del vector AAV-C1EI en forma de cadena doble se cotransfectaron en células 293 junto con un plásmido que expresa las proteínas Cap y Rep de AAV y un plásmido que expresa las funciones auxiliares de adenovirus necesarias para la producción de viriones AAV.

[00226] Se realizó un ensayo de electroforesis en gel alcalino para determinar el tamaño del ácido nucleico empaquetado. Los resultados mostraron que los ácidos nucleicos tenían la longitud esperada. Los ensayos alternativos incluyen un ensayo de centro de replicación para determinar qué vectores AAV-C1EI están empaquetados en forma intacta. Se utiliza un ensayo de extensión de iniciadores para cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos del vector AAV-C1EI que tienen extremos completos, es decir, terminan en el extremo 5' del bucle de horquilla en el AAV2 5' ITR (cadena sentido) o 3' ITR (cadena anti-sentido). Alternativamente, se utiliza un ensayo de PCR para determinar si los ácidos nucleicos de los vectores AAV-C1EI tienen extremos

completos, es decir, terminan en el extremo 5' del bucle de horquilla en el AAV2 5' ITR (cadena sentido) o 3' ITR (cadena anti-sentido).

[00227] Los ensayos de transfección transitoria mostraron que el vector era capaz de expresar altos niveles de C1EI exógeno en células hepáticas. Los viriones de AAV se produjeron generalmente como se describe aquí usando dos tipos diferentes de cápsidas, cápsida de tipo AAV5 y una cápsida derivada de AAV de babuino. La evaluación de los ácidos nucleicos así producidos mostró que tenían la longitud esperada.

Evaluación de la transducibilidad en células HepG2

[00228] Los viriones de AAV producidos anteriormente usando dos tipos diferentes de cápsidas, el tipo AAV5 y una cápsida derivada de AAV de babuino (Bba49), se evaluaron adicionalmente mediante la transducción *in vitro* de células HepG2. Las células HepG2 se transdujeron a 3 MOI diferentes 20,000; 100,000; y 500,000 con varias preparaciones de partículas de AAV con cápsidas de tipo AAV5 o AAVBba49. 96 horas después de la transducción, se recogió el medio y se midió la proteína bCG mediante espectro de masas. mostrando una buena transducibilidad y resultados de transducción similares en todas las preparaciones.

EJEMPLO 2: Efecto de HAE15 en ratones Rag2 -/-

[00229] Se produjo AAV5 HAE15 (o AAV5-ApoE/HCR-hAAT.hhl.SERPINA G1.hGH) usando un sistema de vector de expresión de baculovirus (BEV) y otra cápsida de AAV derivada de babuino con tropismo hepático AAVBba49 HAE15 (o AAVBba-ApoE/HCR-hAAT.hhl.SERPINA G1.hGH) se produjo mediante la triple transfección de células 293. Los vectores purificados se cuantificaron mediante qPCR y se dosificaron a 2e14vg/kg en ratones (knockout) Rag2 -/- de 8 semanas de edad junto con un grupo de control de vehículo. Después de la dosificación, se recogió suero y plasma en las semanas 2, 4, 6, 8, 10, 12. Los niveles C1EI humanos se midieron los niveles del inhibidor de la esterasa C1 humana mediante un kit ELISA emparejado de Sino Biological Inc (#Cat SEK10995) y se midieron los niveles C1EI funcional usando el kit Technochrom C1-inh de DiaPharma (Cat # 5345003).

[00230] En ambos grupos dosificados con las dos partículas diferentes de rAAV hubo niveles suprafisiológicos de expresión de C1EI humana (Figura 3A y B), así como concentración de proteína funcional en el suero (Figura 4A y B) muy por encima del fondo del vehículo. El grupo dosificado con AAVBba49-HAE15 tuvo la expresión de

proteína más alta con niveles >50 veces superiores a los normales de proteína C1EI humana funcional secretada. En los grupos tratados con AAV5 y AAVBba49, se observó una expresión sostenida durante el estudio de 12 semanas. La expresión de los niveles del C1EI humana en el grupo AAVBba49 HAE15 disminuyó de 2 a 6 semanas y se estabilizó durante 6 semanas a niveles más altos (40-70 UI/ml) de expresión de la proteína C1EI humana en comparación con el grupo tratado con AAV5 HAE15 (25-48 UI/mL). La expresión de la proteína C1EI detectada en el plasma en el Grupo B: 2e14vg/kg AAV5 HAE15 se mantuvo estable desde la semana 4 a la semana 12 (tanto la cuantificación de proteínas como los niveles funcionales de C1EI). Grupo C: Los niveles plasmáticos de C1EI 2e14vg/kg AAVBba49 HAE15 se mantuvieron estables desde la semana 6 hasta la semana 12 (tanto la cuantificación de proteínas como los niveles funcionales de C1EI). Todos permanecieron altos entre 25 y 50 veces lo normal.

Tasa de crecimiento

[00231] También se midieron las velocidades de crecimiento en ratones Rag2 -/- tratados con vehículo como controles y se compararon con los ratones Enu2 tratados con AAV-C1EI basados en las mediciones del peso corporal antes de la recuperación de la muestra de plasma (Figura 5). Los gráficos de peso de todos los grupos durante 10 semanas no demuestran ningún cambio significativo en la tasa de aumento de peso corporal.

Medición de indicadores de toxicidad

[00232] La actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) en plasma puede usarse como un indicador de la salud de los hepatocitos, y niveles más altos de ALT son indicativos de toxicidad por hepatocitos. Se tomaron muestras de plasma de estos ratones antes de la administración del tratamiento con AAV5 o AAVBba49 y cada 2 semanas después de la administración (Figura 6). La ALT plasmática se midió usando un kit comercial (Sigma). Los gráficos indican que la administración de AAV5 o AAVBba49 con el genoma del vector HAE15 C1EI no condujo a un cambio apreciable en los niveles de ALT. Las líneas discontinuas representan el rango normal histórico en ratones C57-BL6 WT (7-23 UI/L).

Histología de ratones Rag2 tratados con AAV5-HAE15 o Bba49-HAE15

[00233] Se evaluaron los hígados de estos ratones tratados 12 semanas después de la dosis para determinar la histología y la expresión de C1EI. Como se muestra en la Figura 7A, la dosificación de ratones Rag2 $-/-$ de 8 semanas de edad con 2×10^{14} vg/kg de AAV5-HAE15 o Bba49-HAE15 da como resultado un aumento de la expresión hepática de C1EI humana. Más específicamente, se detectó una señal peri-central en AAV5-HAE, mientras que se observó una señal pan-hepática para Bba49-HAE15. Usando un ensayo de inmunohistoquímica C1EI (IHC), se observaron diferencias significativas entre cada construcción y se comparó con el vehículo (Figura 7B). Se cuantificaron los% de hepatocitos C1EI (+) basándose en un umbral establecido. Se contaron de dos a tres regiones de interés (2-3 ROI) que constaban de $\sim 4600 \pm 770$ hepatocitos por animal. Para los ratones a los que se les administró la dosis de 2×10^{14} vg/kg de AAV5-HAE15, aproximadamente el 30% de los hepatocitos fueron positivos para C1EI, lo que indica que estaban produciendo C1EI humano derivado de vector 12 semanas después de la dosis.

[00234] La dosificación con AAV5 HAE15 o Bba49 HAE15 no afectó a la histoarquitectura hepática, basado en la evaluación cualitativa de factores tales como el agrandamiento de los núcleos hepáticos; colapso de los sinusoides hepáticos; y la presencia de lesiones hepáticas. Se utilizaron tejidos de H&E que presentaban patología arquitectónica para el análisis comparativo.

[00235] IBA1 es un marcador de macrófagos residentes e infiltrantes, e incluye estados basales y activados. La dosificación de ratones Rag2 $-/-$ de 8 semanas de edad con 2×10^{14} vg/kg de AAV5-HAE15 o Bba49-HAE15 produce Foci elevados de IBA-1 (+) en los hígados de ratones Rag2. Usando un ensayo IBA1 IHC, se observó un aumento significativo en la señal de IBA1 en los animales que recibieron dosis de AAV5 y Bba49 (aumento de aproximadamente $\sim 10\%$) (ANOVA de una vía; Barra de error = SEM). Se analizó el número de focos IBA-1(+) y se dividió por el área total de la imagen (excluyendo los espacios vacíos) para calcular los focos # IBA-1 por píxel. Los proyectos anteriores de terapia génica han informado hallazgos similares cuando se dosifican a concentraciones de 2×10^{14} vg/kg (y más).

ADN y ARN de hígado qPCR

[00236] A las 12 semanas después del tratamiento, los ratones Rag2 dosificados con 2×10^{14} vg/kg de constructos de vectores AAV5-HAE15 o Bba49-HAE15 se evaluaron adicionalmente para el ADN y ARN de HAE15 en el hígado medido por

qPCR. Doble de diferencia entre el ARN del grupo B y del grupo C: grupo C/grupo B - por copias/ng ARN - 0,69; por $\Delta\Delta\text{ct}$ - 0,62 se representan en la Figura 8. La dosificación de ratones Rag2^{-/-} de 8 semanas de edad con 2e14 vg/kg de AAV5-HAE15 o Bba49-HAE15 da como resultado un aumento de ADN y ARN de HAE15 en el hígado de ambos grupos de tratamiento.

EJEMPLO 3: ESTUDIO DE RANGOS DE DOSIS

[00237] Se realizó un estudio de respuesta a la dosis con AAV5-HAE15 en dos cohortes: la primera cohorte se evaluó durante 12 semanas y la segunda cohorte se evaluó durante 12 meses.

[00238] En la primera cohorte, se trataron ratones Rag2^{-/-} machos de 8 semanas de edad con vehículo, o una dosis de AAV HAE15 de 6e13vg/kg; 2e13vg/kg; 6e12vg/kg; o 2e12vg/kg. El muestreo de sangre y la recolección de plasma se realizaron mediante un corte en la cola antes de la inyección y cada dos semanas después de la inyección hasta 12 semanas. A las 12 semanas, los ratones se evaluaron para determinar las cantidades de ADN y ARN de HAE15 en el hígado, según se midió mediante PCR digital de gotas (ddPCR). Los hígados también se evaluaron para determinar la histología y la expresión de C1EI mediante inmunohistoquímica (IHC). A las 2 semanas, todos los grupos tratados tenían niveles detectables de niveles de C1EI humano, demostrando los 2 grupos más altos niveles suprafisiológicos de expresión de la proteína C1EI humana (Figura 9A y B). Se observa una buena respuesta a la dosis con AAV5-HAE15. A las 2 semanas después de la dosis, el grupo de dosis de 6e13vg/kg tenía niveles promedio de 386 mg/dL y 7,94 UI/ml de C1EI humano; el grupo de dosis de 2e13vg/kg tuvo niveles promedio de 91 mg/dL y 2,06 UI/mL de C1EI humano; el grupo de dosis de 6e12vg/kg tuvo niveles promedio de 13 mg/dL y 0,59 UI/mL de C1EI humano; la dosis de 2e12vg/kg tuvo niveles promedio de 3 mg/dL y 0,23 UI/mL de C1EI humano. Estos niveles suprafisiológicos se mantuvieron en los 6e13vg/kg; Grupos de tratamiento de 2e13vg/kg a las 4 y 6 semanas después del tratamiento. La administración de AAV5-HAE15 también proporcionó un aumento dependiente de la dosis en la cantidad de ADN de HAE15 detectado en el hígado (Figura 12). La evaluación de los hepatocitos C1EI (+) por IHC a las 12 semanas posteriores a la administración mostró una señal peri-central dependiente de la dosis. Para ratones a los que se les administró la dosis de 2e13 vg/kg, aproximadamente el 7% de los hepatocitos fueron C1EI (+) a las 12 semanas, mientras que para los ratones a los que se les administró la dosis de 6e13

vg/kg, aproximadamente el 12% de los hepatocitos eran C1EI (+) a las 12 semanas (Figura 13).

[00239] En la segunda cohorte, se trataron ratones Rag2 ^{-/-} machos de 8 semanas de edad con vehículo, o una dosis de AAV5-HAE15 de 2e14 vg/kg; 6e13vg/kg; 2e13vg/kg; 6e12vg/kg; o 2e12vg/kg. La sangre y el plasma se recolectaron como se describe anteriormente cada dos semanas después de la inyección hasta 12 semanas, luego cada 4 semanas hasta la semana 52. Se evaluó el plasma para mg/mL de proteína C1EI humana total (Figura 10A), UI/mL de proteína C1EI funcional (usando un ensayo que mide la inhibición de la esterasa C1) (Figura 10B) y UI/L ALT, un biomarcador indicativo de toxicidad hepática (Figura 11). La cantidad de proteína C1EI humana en plasma de ratón se midió mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS)/MS utilizando un péptido específico humano TLYSS. La proteína C1EI funcional se midió con un kit disponible comercialmente (Technochrom). A las 52 semanas, los ratones fueron sacrificados. Se evaluaron sus hígados para determinar las cantidades de ADN y ARN de HAE15 (copias de ADN de HAE15 por µg de ADN total) según lo medido por PCR digital con gotas (ddPCR) (Figura 12). También se evaluaron los hígados para determinar la histología y la expresión de C1EI. El porcentaje de hepatocitos C1EI (+) se cuantificó basándose en un umbral establecido; Se utilizaron animales tratados con vehículo para establecer el umbral mínimo y para restar cualquier señal de fondo/autofluorescente. Se contaron de dos a tres ROI que consistían en aproximadamente 5000 +/- 580 hepatocitos por animal.

[00240] La expresión tanto de la proteína C1EI humana total como de la proteína C1EI funcional fue dependiente de la dosis y alcanzó su punto máximo entre 4 y 12 semanas. Las dosis de 2e13 vg/kg y más altas proporcionaron niveles suprafisiológicos de C1EI humana y expresión de C1EI humana funcional durante al menos un año. Los niveles de proteína C1EI humana variaron de aproximadamente 2,5x a 25x de lo normal a las 12 semanas, y cayeron gradualmente a niveles que variaron de aproximadamente 2x a aproximadamente 12x lo normal a las 52 semanas (Figura 10A). Los niveles de C1EI humanos funcionales siguieron un patrón similar, que varió desde aproximadamente 3,5x hasta aproximadamente 35x lo normal a las 12 semanas, y descendiendo a niveles de aproximadamente 2x a aproximadamente 11x a las 52 semanas (Figura 10B). Los niveles de proteína C1EI total y proteína C1EI funcional estaban bien correlacionados.

[00241] Estos datos indican que el vector AAV5-HAE15 indujo niveles

terapéuticos de expresión de C1EI funcional, con buena durabilidad durante el período de evaluación de un año, y se espera que se expresen niveles suficientes más allá del año.

[00242] La administración de AAV5-HAE15 proporcionó un aumento dependiente de la dosis en la cantidad de ADN de HAE15 detectado en el hígado a las 52 semanas (Figura 12). La evaluación de los hepatocitos C1EI (+) por IHC a las 52 semanas después de la administración mostró la señal dependiente de la dosis esperada, a niveles comparables a los del estudio de 12 semanas de la primera cohorte (Figura 13). A las 52 semanas, aproximadamente el 5% de los hepatocitos permanecieron positivos para C1EI con la dosis de 2×10^{13} vg/kg, aproximadamente el 12% de los hepatocitos permanecieron positivos para C1EI con la dosis de 6×10^{13} vg/kg, y aproximadamente el 15% de los hepatocitos permanecieron positivos para C1EI con la dosis Dosis de 2×10^{14} vg/kg. Para las dosis de 2×10^{13} vg/kg y 6×10^{13} vg/kg, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de hepatocitos C1EI (+) a las 12 semanas frente a las 52 semanas.

[00243] Estos datos indican una durabilidad buena y constante de la transducción de hepatocitos durante las 52 semanas de duración del estudio, y se espera que la durabilidad de la expresión continúe más allá del año.

[00244] Los niveles de ALT permanecieron dentro del rango normal para todas las dosis durante las 52 semanas de duración del estudio, lo que indica una función hepática normal. Los ratones tratados no mostraron ningún cambio significativo en la tasa de aumento de peso corporal y ningún hallazgo histológico hepático significativo. Estos datos indican que la administración del vector AAV fue segura y tolerable.

[00245]

EJEMPLO 4: EVALUACIÓN DE VECTORES AAV-C1EI EN PRIMATES NO HUMANOS

[00246] Se realizó un estudio de primates no humanos con 16 monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). A los monos se les administró vehículo o (a) una dosis baja del vector AAV5-SERPING1 que codifica C1EI cinomolgo (cC1EI) o C1EI humano (hC1EI) cada uno a aproximadamente 2×10^{14} vg/kg, o (b) o una dosis más alta de AAV5-SERPING1 vector que codifica cC1EI (aproximadamente $6,5 \times 10^{14}$ vg/kg) o hC1EI (aproximadamente 5×10^{14} vg/kg). Se administró AAV5-HAE15 como el vector que codifica C1EI humano. Se recogió plasma semanalmente durante 13 semanas (dosis baja) a 17 semanas (dosis alta) y se evaluó los niveles de proteína hC1EI. Al final del

estudio, se evaluó la cantidad de ADN y ARN de SERPING1 en el hígado (copias de ADN o ARN/μg de ADN o ARN total, respectivamente). Se controlan las lecturas de patología clínica y hematología.

[00247] Tanto la dosis alta como la baja de AAV5-HAE15 produjeron niveles eficaces de proteína humana, aunque niveles más bajos que los observados en ratones. Hubo una tendencia hacia una respuesta dependiente de la dosis, mientras que fluctuaba dentro del rango normal de niveles de C1EI. Las copias de ADN del vector correspondían a los niveles de expresión de proteínas, y las copias de ARN del vector tendían a corresponder a los niveles de expresión de proteínas. Por ejemplo, el tratamiento con 3 veces más partículas de AAV produjo 3 veces más copias de ADN en los hígados.

[00248] Los puntos finales de seguridad incluyen mediciones semanales del peso corporal y físico, así como la monitorización de las respuestas de anticuerpos anti-AAV5 y anticuerpos anti-C1EI. Los primates se controlan para detectar hinchazón y, si se observa, se realizan análisis adicionales. Los criterios de valoración trombóticos incluyen APTT, TP, fibrina soluble, dímero D, complejo trombina-antitrombina, fibrinógeno. En el momento de la terminación del estudio, se realiza una necropsia macroscópica y se evalúa el hígado para detectar C1EI, mientras que todos los órganos principales (incluidas las gónadas) se evalúan para detectar H&E y tinciones de fibrina.

[00249]

CUADRO 2

Recolección de sangre para biomarcadores (línea de base, semanal, finalización del estudio)

✧ Enzimas hepáticas

- aspartato aminotransferasa (AST)
- alanina aminotransferasa (ALT)

✧ Evaluación de trombosis:

- APTT (rendimiento de la coagulación por vía intrínseca)
- PT (rendimiento de la coagulación por vía extrínseca)
- D-Dímero (marcador de presencia de coágulos de fibrina)
- Monómero de fibrina soluble (marcador de coagulación intravascular diseminada)

- Complejo trombina-antitrombina (marcador de estado hipercoagulativo)

[00250] Fibrinógeno (un marcador de inflamación y perturbaciones podría indicar la formación de coágulos de fibrina)

[00251] No se observaron resultados anormales para las enzimas hepáticas, parámetros de coagulación o marcadores de inflamación que muestren que los primates no humanos toleraron altas dosis de vector AAV5 sin efectos adversos.

EJEMPLO 5: EVALUACIÓN DE VECTORES AAV-C1EI EN MODELO RATÓN DE ANGIOEDEMA HEREDITARIO

[00252] La expresión dirigida por AAV-SERPING1 de la proteína hC1EI se evalúa en un modelo de ratón de HAE. Los ratones SERPING1 $-/-$ tienen una permeabilidad vascular notablemente aumentada en comparación con los ratones de tipo salvaje que imitan los síntomas del HAE. Después de la inyección con colorante azul de Evans, los ratones deficientes en C1EI tanto homocigotos como heterocigotos exhiben una mayor permeabilidad vascular en comparación con los compañeros de camada de tipo salvaje. Este aumento de la permeabilidad vascular puede revertirse mediante tratamiento con C1EI intravenoso, con un inhibidor de calicreína o con un antagonista del receptor de bradicinina tipo 2. Han et al, J. Clin. Invertir. 109: 1057–1063 (2002).

[00253] Se evaluó el efecto terapéutico de AAV5-HAE15 en ratones SERPING1 $-/-$ homocigotos, de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones se trataron con vehículo, con un control positivo (4 mg/kg de proteína C1EI humana) o con una dosis de AAV5-HAE15 de 6×10^{13} vg/kg; 2×10^{13} vg/kg; o 6×10^{12} vg/kg. Las inyecciones se realizaron por vía intravenosa a 4 μ l/g de peso corporal. La sangre de la vena de la cola se recogió a intervalos de 2 semanas durante un período de 6 semanas, se procesó para recoger suero y se evaluó los niveles y la actividad de hC1EI. Los ratones tratados con vector se compararon con ratones tratados con vehículo como controles. Los niveles plasmáticos de C1EI humano funcional alcanzaron aproximadamente niveles terapéuticos entre la semana 4 y la semana 6 para los grupos de dosis de 6×10^{13} vg/kg y 2×10^{13} vg/kg (Figura 14). Para el grupo de dosis de 6×10^{13} vg/kg, la expresión de C1EI humana funcional fue sustancialmente más alta de lo normal para todos los ratones del grupo, variando de aproximadamente 4x a aproximadamente 14x de lo normal. La evaluación de los hepatocitos C1EI (+) en el hígado mediante IHC mostró que aproximadamente el 10% de los hepatocitos eran C1EI (+) a las 6 semanas con la

dosis de 6×10^{13} vg/kg.

[00254] A las 2 semanas, 4 semanas o 6 semanas después de la administración de AAV5-HAE15, también se evaluó la permeabilidad vascular en grupos de ratones. Se inyectó a los ratones 30 mg/kg de colorante azul de Evans en solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de dos aplicaciones durante 15 minutos de un irritante (aceite de mostaza al 5%) en la superficie de la oreja derecha. A los 30 minutos de la inyección del tinte, se sacrificó a los ratones. El tinte se extrajo del oído derecho, el intestino delgado y el riñón y se midió espectrofotométricamente a 600 nm.

[00255] Los ratones knockout de SERPING1 de control tratados con vehículo tenían una permeabilidad vascular significativamente aumentada en comparación con los ratones de tipo salvaje. Como se esperaba, el tratamiento de ratones con proteína C1EI derivada de plasma humano normalizó los niveles plasmáticos de C1EI funcional (aproximadamente 1 UI/ml) y redujo significativamente la permeabilidad vascular en el oído, el intestino delgado y el riñón. En el pabellón auricular, los ratones mostraron una respuesta dependiente de la dosis a la administración de AAV5-HAE15. La permeabilidad vascular en el pabellón auricular de los ratones a los que se les administró 2×10^{13} vg/kg se normalizó (no significativamente diferente del tipo salvaje), mientras que los ratones que recibieron 6×10^{13} vg/kg mostraron incluso menos permeabilidad vascular en comparación con los ratones de tipo salvaje. (Figura 15A). En el intestino delgado y el riñón (Figuras 15B y 15C), la permeabilidad vascular de los ratones a los que se les administró una dosis de 2×10^{13} vg/kg o 6×10^{13} vg/kg se normalizó (no significativamente diferente a la del tipo salvaje).

EJEMPLO 6: EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD Y BIODISTRIBUCIÓN DEL HAE15 EN MONOS CYNOMOLGUS

[00256] Se lleva a cabo un estudio de primates no humanos con monos cynomolgus, en HAE15, HAE23 o HAE24. Los criterios de valoración de toxicidad aguda y crónica, farmacodinámica e inmunogenicidad se siguen a lo largo del estudio. A las 8 y 12 semanas después de la inyección se evalúan la durabilidad y los efectos crónicos. Se calcula la biodistribución, se evalúa la histopatología y se evalúan el ADN y el ARN de las gónadas mediante hibridación in situ. Se determina que el vector AAV es seguro y tolerable.

[00257] Se pretende que las modalidades descritas aquí sean meramente ejemplares, y los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando no más que experimentación rutinaria, numerosos equivalentes de

compuestos, materiales y procedimientos específicos. Todos estos equivalentes se consideran dentro del alcance de la descripción.

[00258] Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones a las que se hace referencia aquí se incorporan aquí como referencia en su totalidad. La citación o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no es una admisión de que dicha referencia esté disponible como técnica anterior a esta solicitud. El alcance completo de la descripción se comprende mejor con referencia a las reivindicaciones adjuntas.