Ácido nucleico optimizado por codones que codifica la proteína del factor de coagulación IX, y su uso

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente solicitud está relacionada con los campos de la genética, la terapia génica y la biología molecular. Más específicamente, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado optimizado en codones que codifica la proteína FIX (factor de coagulación IX), un casete de expresión y un vector basado en el mismo, así como un virus recombinante basado en el AAV5 (virus adeno asociado de serotipo 5) para aumentar la expresión del gen FIX en las células diana, y su uso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La terapia génica es uno de los campos más prometedores de la medicina moderna. Se orienta principalmente al desarrollo de soluciones eficaces para el tratamiento de enfermedades hereditarias, ya que sólo los métodos de terapia génica permiten influir especialmente en la causa de estas enfermedades. Entre el gran número de enfermedades hereditarias, el grupo de patologías asociadas a los trastornos de la hemostasia es el más frecuente.

La hemofilia es una enfermedad ligada al cromosoma X asociada a la ausencia o a la deficiencia pronunciada de los factores de coagulación del plasma; se caracteriza por trastornos de la coagulación que se manifiestan clínicamente en forma de hemorragias espontáneas o causadas, frecuentemente incontroladas, en las articulaciones, los músculos y los órganos internos, etc.

La hemofilia B está causada por la ausencia o deficiencia del factor de coagulación IX del plasma. En la mayoría de los casos, la enfermedad tiene antecedentes familiares, pero en algunos casos se identifican mutaciones esporádicas. La gran mayoría de los pacientes con hemofilia son varones, hay casos identificados de hemofilia en mujeres, pero son extremadamente raros. El factor de coagulación IX (FIX, factor Christmas) es una proenzima serina proteasa que, en presencia de Ca2+ y de fosfolípidos de membrana, hidroliza el enlace arginina isoleucina de una molécula de factor X para formar el factor X activado (FXa). La eficacia catalítica del factor IXa aumenta al unirse el cofactor, es decir, el factor VIII de coagulación activado (FVIIIa).

El Factor IX se produce en el hígado como una proteína precursora inactiva que se procesa en el retículo endoplásmico y en el Golgi, donde sufre múltiples modificaciones postraduccionales de diversos tipos y se secreta en el torrente sanguíneo tras el corte proteolítico del propéptido. El factor IX, en la cascada de coagulación sanguínea, se activa tras la escisión proteolítica del factor XI activado (vía intrínseca) o del factor VII activado (vía extrínseca), con la formación de dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace disulfuro. El factor IX activado se desactiva

lentamente, por lo general mediante la unión lenta a la antitrombina III, la nexina-2, el inhibidor de la proteína Z-dependiente y los receptores endocíticos de los hepatocitos, además de ser degradado por la elastasa de los neutrófilos.

Actualmente se utiliza la terapia de sustitución. Tras el desarrollo de la técnica de crioprecipitación en 1966, se registró el primer producto de factor de coagulación derivado del plasma sanguíneo de los donantes. En los años ochenta se descubrió que los productos de factor de coagulación derivados del plasma podían estar infectados por virus (VIH, hepatitis C), lo que provocó la infección de unos 20.000 pacientes. Este hecho impulsó el desarrollo de métodos de eliminación e inactivación de virus en la producción de productos plasmáticos, así como la creación de nuevos productos no plasmáticos. En el proceso de producción de productos derivados del plasma (derivados del plasma - pdFIX), se incluyó una etapa de tratamiento térmico que permitió eliminar la infección del producto. Simultáneamente a la mejora del proceso de producción de productos derivados del plasma, se realizaron estudios sobre el desarrollo de factores de coagulación mediante la tecnología del ADN recombinante. Sobre la base de esta tecnología, se produjeron y registraron en 1997 productos de factor de coagulación IX recombinante (rFIX). La tecnología del ADN recombinante para la producción de productos terapéuticos permite reducir considerablemente el riesgo de contaminación viral de los productos. En la actualidad, los productos terapéuticos de terapia de sustitución para la hemofilia son productos derivados del plasma y recombinantes; sin embargo, presentan una serie de desventajas.

El principal problema en la producción de productos derivados del plasma es la necesidad de grandes volúmenes de plasma. Además, a pesar de que desde finales de los años ochenta no se han producido casos de infección de pacientes al utilizar pdFIX, los fabricantes de estos productos terapéuticos no pueden excluir, en teoría, la posibilidad de que estén infectados por el virus.

Las principales desventajas de los productos terapéuticos FIX utilizados actualmente para el tratamiento de la hemofilia son las siguientes

- posibilidad teórica de que los pacientes se infecten con el virus a través de productos derivados del plasma;
- alta inmunogenicidad de los productos derivados del plasma y recombinantes;
- menor eficacia (en comparación con los productos derivados del plasma) de los productos recombinantes;
- corto período de circulación sanguínea de los factores de coagulación;
- necesidad de infusiones intravenosas frecuentes (2-3 veces por semana);
- ausencia de disponibilidad generalizada de la terapia de sustitución de por vida.

El uso de productos terapéuticos de terapia génica para la transducción génica del factor IX es un enfoque fundamentalmente nuevo y prometedor en comparación con las opciones

terapéuticas existentes: el producto terapéutico de terapia génica administrado por infusión intravenosa restablece la producción del factor de coagulación en el organismo del paciente.

La entrega del gen diana en las células del organismo mediante vectores virales, como el vector basado en AAV, es uno de los principales métodos de terapia génica.

El virus adenoasociado (AAV) es un virus pequeño (25 nm), de replicación independiente y sin envoltura. Se han descrito muchos serotipos diferentes de AAV en humanos y primates. El genoma del virus adenoasociado está compuesto por ADN monocatenario (ssADN) de unos 4.700 nucleótidos. En los extremos de una molécula de ADN genómico se alojan las repeticiones terminales invertidas (ITR). El genoma comprende dos marcos de lectura abiertos (ORF), Rep y Cap, que comprenden varios marcos de lectura alternativos que codifican diversos productos proteicos. Los productos Rep son esenciales para la replicación del AAV, mientras que tres proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3), junto con otros productos alternativos, son codificados por el gen Cap. VP1, VP2 y VP3 están presentes en una proporción de 1:1:10 para formar una cápside icosaédrica (Xie Q. et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:10405-10410). Durante la producción del vector AAV recombinante (rAAV), un casete de expresión flanqueado por ITR se empaqueta en una cápside de AAV. Los genes necesarios para la replicación del AAV no están incluidos en el casete. El AAV recombinante se considera uno de los vectores virales más seguros y más utilizados para la transferencia de genes *in vivo*. Los vectores pueden infectar células de múltiples tipos de tejidos para proporcionar una expresión transgénica fuerte y sostenida. Además, no son patógenos y tienen un perfil de baja inmunogenicidad (High KA et al., "rAAV human trial experience" Methods Mol Biol. 2011; 807:429-57).

Uno de los propósitos urgentes de la investigación en el ámbito del desarrollo de una terapia génica eficaz es la optimización de los codones de los genes de interés en los vectores para lograr el máximo nivel de expresión de los genes de interés, lo que, a su vez, permitirá utilizar dosis más bajas del vector para lograr un efecto significativo.

Una de las propiedades del código genético es la degeneración, es decir, la capacidad de diferentes codones (trinucleótidos) para codificar el mismo aminoácido. Estos codones que se traducen al mismo aminoácido se denominan codones sinónimos. En las secuencias naturales, uno de los codones sinónimos se selecciona al azar en el curso de la evolución, pero las frecuencias de uso de los codones sinónimos son diferentes: cada aminoácido tiene más y menos preferidos. La optimización de codones es una técnica muy utilizada para ampliar la producción de moléculas de proteínas, que proporciona una asignación racional de uno de los codones sinónimos adecuados a cada aminoácido de una secuencia de proteínas. Uno de los principios comunes de la optimización de codones implica el uso de los codones más frecuentes, mientras que otros enfoques se

introdujeron posteriormente, como la armonización (reproducción de la distribución de las frecuencias de uso de los codones), pero no siempre aumentan la productividad. Además de las frecuencias de codones, el contenido de GC de la secuencia (proporción de guanina y citosina con respecto a la longitud total de la secuencia) puede afectar a la eficiencia de la producción, en particular, se demostró que un alto contenido de GC se asocia con un aumento de los niveles de ARNm en las células de mamíferos (Grzegorz Kudla ET AL., High Guanine and Cytosine Content Increases mRNA Levels in Mammalian Cells, June 2006, Volume 4, Issue 6, e180, pp. 933-942). Además, cabe señalar que los elementos de estructura secundaria estables del ARNm, es decir, los que tienen una baja energía libre de plegado, pueden reducir la eficacia.

Las diferentes variantes de optimización de codones de la secuencia de un gen de interés pueden dar lugar a lo siguiente (en comparación con un gen de tipo salvaje):

a) los niveles de expresión de los genes de interés aumentarán ligeramente;

b) los niveles de expresión de los genes de interés aumentarán significativamente;

c) los niveles de expresión de los genes de interés se mantendrán aproximadamente en el mismo nivel;

d) los niveles de expresión de los genes de interés se reducirán.

Por lo tanto, existe la necesidad de producir una secuencia optimizada de codones del gen FIX para aumentar la expresión del gen FIX en las células objetivo y crear un producto terapéutico de terapia génica basado en él.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores del presente grupo de invenciones descubrieron que el ácido nucleico optimizado por codones según la invención, que codifica la proteína FIX (factor de coagulación IX), que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 (hFIXco-v1) o SEQ ID NO: 4 (hFIXco-v2), sorprendentemente mostró un mayor nivel de expresión del gen FIX y un mayor nivel de producción de la proteína del factor de coagulación IX varias veces en comparación con el gen de tipo salvaje que codifica el factor de coagulación IX (hFIX-wt). Estas variantes del ácido nucleico optimizado por codón según la invención que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 (hFIXco-v1) y SEQ ID NO: 4 (hFIXco-v2) se incluyen en un casete de expresión y un vector basado en el mismo, así como en un virus recombinante basado en AAV5 (virus adenoasociado serotipo 5).

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado optimizado por codones que codifica la proteína FIX (factor de coagulación IX) que tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:1, y que incluye una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que comprende: SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un casete de expresión que incluye el ácido nucleico optimizado por codones anterior.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

Promotor de la TTR (promotor de la transtiretina);

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado para el codón anterior;

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende: SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que incluye el ácido nucleico optimizado por codones anterior o cualquiera de los casetes de expresión anteriores.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un virus recombinante aislado basado en el AAV5 (virus adenoasociado de serotipo 5) para aumentar la expresión del gen FIX en las células diana, que comprende el ácido nucleico optimizado en codones anterior o cualquiera de los casetes de expresión anteriores.

En algunas realizaciones, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1.

En algunas realizaciones, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En algunas realizaciones, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales.

En algunas realizaciones, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, y el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

Promotor de la TTR (promotor de la transtiretina);

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado para el codón anterior;

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

En algunas realizaciones, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, y el casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, que es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para administrar el gen FIX a las células diana, que incluye cualquiera de los virus recombinantes basados en AAV5 mencionados anteriormente en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los anteriores virus recombinantes basados en AAV5 o la anterior composición para entregar el gen FIX a las células diana.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los anteriores virus recombinantes basados en AAV5 o la anterior composición para proporcionar la proteína FIX a un sujeto que tiene hemofilia B y/o que no tiene copias totalmente funcionales del gen FIX.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los anteriores virus recombinantes basados en AAV5 o la anterior composición para tratar la hemofilia B en un sujeto que tiene hemofilia B.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para proporcionar la proteína FIX a un sujeto que tiene hemofilia B, dicho método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los virus recombinantes basados en AAV5 mencionados anteriormente o la composición mencionada en las células del sujeto que lo necesita.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para administrar el gen FIX a las células diana de un sujeto que tiene hemofilia B, dicho método comprende la administración de cualquiera de los virus recombinantes basados en AAV5 mencionados anteriormente o la composición mencionada en las células del sujeto.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar la hemofilia B en un sujeto, dicho método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los virus recombinantes basados en AAV5 mencionados anteriormente o la composición mencionada en un sujeto que tiene hemofilia B.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema de los plásmidos pAAV-hFIXco-v1 y pAAV-hFIXco-v2 que están destinados a producir vectores AAV con un casete de expresión que comprende secuencias optimizadas de codones del gen del factor IX de coagulación humano (FIX) hFIXco-v1 y hFIXco-v2, respectivamente, donde

hFIXco-v1 es una secuencia optimizada de codones del gen del factor IX de coagulación humano (variante Nro. 1);

hFIXco-v2 es una secuencia optimizada de codones del gen del factor IX de coagulación humano (variante Nro. 2);

AmpR es un gen de la betalactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina;

El origen pUC es un origen de replicación pUC en bacterias;

ITR son repeticiones terminales invertidas;

El promotor TTR es un promotor del gen de la transtiretina (promotor de la transtiretina);

Poli-A es una secuencia de señal de poliadenilación, para aumentar la estabilidad del ARNm;

Intrón HBG es el intrón de la beta globina humana.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el nivel de expresión del gen FIX en las células Huh7 7 días después de la transducción de las células con el producto viral AAV5-FIX que lleva el gen FIX de tipo salvaje (AAV5-hFIX-wt), con el producto AAV5-FIX que lleva el gen optimizado para el codón hFIXco-v1 (AAV5-hFIXco-v1), y con el producto AAV5-FIX que lleva el gen optimizado para el codón hFIXco-v2 (AAV5-hFIXco-v2)(*todas las variantes de los genes FIX en los productos AAV-FIX contienen la mutación natural Padua, R338L*). * - Valor $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con la prueba de Dunnett.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la concentración de la proteína FIX en el líquido de cultivo 7 días después de la transducción de células Huh7 con el producto viral AAV5-FIX que lleva el gen FIX de tipo salvaje (AAV5-hFIX-wt), con el producto AAV5-FIX que lleva el gen optimizado para el codón hFIXco-v1 (AAV5-hFIXco-v1), y con el producto AAV5-FIX que lleva el gen optimizado para el codón hFIXco-v2 (AAV5-hFIXco-v2)(*todas las variantes de los genes FIX en los productos AAV-FIX contienen la mutación natural Padua, R338L*). Como control se utilizaron células Huh7 no transducidas. *** - Valor $p < 0,001$. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con la prueba de Dunnett.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la actividad de la proteína FIX en el líquido de cultivo 7 días después de la transducción de células Huh7 con el producto viral AAV5-FIX que lleva el gen FIX de tipo salvaje (AAV5-hFIX-wt), con el producto AAV5-FIX que lleva el gen optimizado para el codón hFIXco-v1 (AAV5-hFIXco-v1), y con el producto AAV5-FIX que lleva el gen optimizado para el codón hFIXco-v2 (AAV5-hFIXco-v2)(*todas las variantes de los genes FIX en los productos AAV-FIX contienen la mutación natural Padua, R338L*). Como control se utilizaron células Huh7 no transducidas. *** - Valor p < 0,001. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con la prueba de Dunnett.

La figura 5 es un gráfico que muestra el contenido de la proteína del factor de coagulación IX en el plasma sanguíneo de animales de experimentación tras la administración intravenosa del producto AAV5-FIX que lleva el gen FIX de tipo salvaje (AAV5-hFIX-wt) y el producto AAV5-FIX que lleva el gen hFIXco-v1 optimizado para el codón (AAV5-hFIXco-v1) (*todas las versiones de los genes FIX en los productos AAV-FIX contienen la mutación natural Padua, R338L*). Valores medios ± desviación estándar (n = 10). *** - valor p < 0,001; ** - valor p < 0,01; * - valor p < 0,05. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de Dunnett.

La figura 6 es un gráfico que muestra el contenido de la proteína del factor de coagulación IX en el plasma sanguíneo de animales de experimentación tras la administración intravenosa del producto AAV5-FIX que lleva el gen FIX de tipo salvaje (AAV5-hFIX-wt) y el producto AAV5-FIX que lleva el gen hFIXco-v2 optimizado para el codón (AAV5-hFIXco-v2) *(todas las versiones de los genes FIX en los productos AAV-FIX contienen la mutación natural Padua, R338L*). Valores medios ± desviación estándar (n = 10). *** - valor p < 0,001; ** - valor p < 0,01; * - valor p < 0,05. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de Dunnett.

Definiciones y métodos generales

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que suelen entender los expertos en la técnica.

Además, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los términos en plural, y los términos en plural incluirán los términos en singular. Normalmente, la presente clasificación y los métodos de cultivo celular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química de síntesis orgánica, química médica y farmacéutica, así como la hibridación y la química de las proteínas y los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son bien conocidos por los expertos y ampliamente utilizados en la técnica. Las reacciones enzimáticas y los métodos de purificación se llevan a cabo según las

directrices del fabricante, como es habitual en la técnica, o como se describe en el presente documento.

"Aislado" significa alterado o alejado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o totalmente de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o una proteína aislados pueden existir sustancialmente en forma purificada, o pueden existir en un entorno no nativo como, por ejemplo, una célula modificada genéticamente.

Los términos "natural", "nativo" o "salvaje" se utilizan para describir un objeto que puede encontrarse en la naturaleza, a diferencia de los producidos artificialmente. Por ejemplo, una proteína o secuencia de nucleótidos presente en un organismo (incluido un virus), que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionadamente por una persona en el laboratorio, es de origen natural.

El término "genoma" se refiere al material genético completo de un organismo.

Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto dicte lo contrario, las palabras "incluir" y "comprender" o sus variaciones, como "incluye", o "comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Proteína (péptido)

En la presente descripción, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente, y se refieren a un compuesto formado por residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o un péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se establece ninguna limitación en cuanto al número máximo de aminoácidos que pueden componer la secuencia de una proteína o un péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en la presente descripción, el término se refiere tanto a las cadenas cortas, que también se denominan comúnmente en la técnica, por ejemplo, como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, como a las cadenas más largas, que generalmente se denominan en la técnica como proteínas, de las que hay muchos tipos. "Los polipéptidos" incluyen, entre otros, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de ellos.

Moléculas de ácido nucleico

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos" utilizados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que determina un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es un ADN o ARN de doble cadena, un ADN o ARN de cadena simple, o productos de transcripción de dichos ADN.

Tal como se utiliza en la presente descripción, los polinucleótidos incluyen, como ejemplos no limitantes, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, como ejemplos no limitantes, los medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando la tecnología de clonación ordinaria y la PCR y similares, y por medios sintéticos.

También debe incluirse aquí que la presente invención no se refiere a las secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en estado natural. Las secuencias de la presente invención han sido aisladas y/o purificadas, es decir, han sido muestreadas directa o indirectamente, por ejemplo, mediante copia, habiendo sido modificado su entorno al menos parcialmente. Así pues, también cabe mencionar aquí los ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, mediante, por ejemplo, células huésped, u obtenidos por síntesis química.

A menos que se indique lo contrario, el término secuencia de nucleótidos abarca su complemento. Por lo tanto, un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria del mismo con la secuencia complementaria del mismo.

Virus adenoasociado (AAV)

Los virus de la familia Parvoviridae son pequeños virus animales que contienen ADN. La familia Parvoviridae puede dividirse en dos subfamilias: los Parvovirinae, cuyos miembros infectan a los vertebrados, y los Densovirinae, cuyos miembros infectan a los insectos. Hasta 2006, se han descrito 11 serotipos de virus adenoasociados (Mori, S. ET AL., 2004, "Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein", Virology, T. 330 (2): 375-83). Todos los serotipos conocidos pueden infectar células de múltiples tipos de tejidos. La especificidad tisular viene determinada por el serotipo de la proteína de la cápside; por tanto, los vectores basados en el virus adenoasociado se construyen asignando el serotipo deseado. En la bibliografía se describe más información sobre los parvovirus y otros

miembros de los Parvoviridae (Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication", capítulo 69 en Fields Virology (3d Ed. 1996)).

La organización genómica de todos los serotipos AAV conocidos es muy similar. El genoma AAV es una molécula de ADN lineal de una sola hebra que tiene una longitud inferior a unos 5000 nucleótidos (nt). Las repeticiones terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias de nucleótidos codificantes únicas de la replicación de las proteínas no estructurales (Rep) y de las proteínas estructurales (Cap). El gen Cap codifica las proteínas VP (VP1, VP2 y VP3) que forman la cápside. Los 145 nucleótidos terminales son autocomplementarios y están organizados de tal manera que se puede formar un dúplex intramolecular energéticamente estable que forma un bucle en horquilla. Estas estructuras en forma de horquilla funcionan como un origen para la replicación del ADN del virus, sirviendo como cebadores para el complejo de la ADN polimerasa celular. Tras la infección del AAV de tipo salvaje (wtAAV) en células de mamíferos, los genes Rep (por ejemplo, Rep78 y Rep52) se expresan utilizando el promotor P5 y el promotor P19, respectivamente, y las dos proteínas Rep tienen una función determinada en la replicación del genoma viral. Un evento de empalme en el marco de lectura abierto de Rep (Rep ORF) da lugar a la expresión de realmente cuatro proteínas Rep (por ejemplo, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40). Sin embargo, se ha demostrado que el ARNm no empalmado que codifica las proteínas Rep78 y Rep52 es suficiente para la producción de vectores AAV en células de mamíferos.

Vector

El término "vector", tal y como se utiliza aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Además, el término "vector" se refiere aquí a una partícula viral capaz de transportar un ácido nucleico.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término "expresión" se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos concreta impulsada por su promotor.

Uso

La "terapia génica" es la inserción de genes en las células y/o tejidos del sujeto para tratar una enfermedad, normalmente hereditaria, en la que se sustituye un alelo mutante defectuoso por otro funcional.

"Tratar", "trata" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o abrogar un trastorno biológico y/o al menos uno de sus síntomas asociados. Tal y como se utiliza aquí, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o la frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección. Además, las referencias al "tratamiento" incluyen referencias al tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

En un aspecto, el sujeto de tratamiento, o paciente, es un mamífero, preferentemente un sujeto humano. Dicho sujeto puede ser hombre o mujer, de cualquier edad.

El término "trastorno" significa cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el compuesto de la presente invención.

"Enfermedad" es un estado de salud de un sujeto en el que éste no puede mantener la homeostasis y en el que, si no se mejora la enfermedad, la salud del sujeto sigue deteriorándose.

Los términos "sujeto", "paciente", "individuo" y similares se utilizan indistintamente en la presente descripción, y se refieren a cualquier animal susceptible de ser sometido a los métodos descritos en la presente descripción. En ciertas realizaciones no limitantes, el sujeto, paciente o individuo es un humano. Dicho sujeto puede ser hombre o mujer, de cualquier edad.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad del agente terapéutico que se administra y que aliviará en cierta medida uno o varios de los síntomas de la enfermedad que se está tratando.

Descripción detallada de la invención

Ácido nucleico

En un aspecto la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado y optimizado por codones que codifica la proteína FIX (factor de coagulación IX) y que tiene una secuencia de aminoácidos
MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGN
LERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYEC
WCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVP
FPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP
GQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQK
RNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSG
WGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGG
PHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLT (SEQ ID NO:1), y que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende:
ATGCAGCGGGTCAACATGATCATGGCGGAGTCGCCGGGCCTGATCACGATCTGCCT
CCTCGGGTACCTGCTCTCCGCCGAGTGCACCGTGTTCCTGGACCACGAGAACGCCAA
CAAGATCCTCAACCGGCCCAAGCGCTACAACTCCGGCAAGCTGGAGGAGTTCGTGC
AGGGGAACCTCGAGCGCGAGTGCATGGAGGAGAAGTGCTCGTTCGAGGAGGCGCG
GGAGGTGTTCGAGAACACCGAGCGCACCACGGAGTTCTGGAAGCAGTACGTGGACG
GGGACCAGTGCGAGTCGAACCCGTGCCTCAACGGGGGGTCGTGCAAGGACGACATC
AACTCGTACGAGTGCTGGTGCCCCTTCGGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGCTGGA

CGTGACCTGCAACATCAAGAACGGGCGCTGCGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCG
ACAACAAGGTGGTCTGCTCCTGCACCGAGGGGTACCGCCTCGCGGAGAACCAGAAG
TCCTGCGAGCCGGCCGTGCCCTTCCCCTGCGGCCGCGTGTCCGTCAGCCAGACGTCG
AAGCTGACGCGCGCCGAGACCGTCTTCCCGGACGTGGACTACGTGAACTCGACGGA
GGCCGAGACCATCCTGGACAACATCACCCAGAGCACCCAGTCCTTCAACGACTTCA
CGCGGGTGGTCGGCGGCGAGGACGCCAAGCCCGGGCAGTTCCCGTGGCAGGTCGTC
CTCAACGGGAAGGTCGACGCGTTCTGCGGCGGGAGCATCGTGAACGAGAAGTGGAT
CGTGACCGCCGCGCACTGCGTCGAGACGGGCGTGAAGATCACCGTGGTGGCCGGGG
AGCACAACATCGAGGAGACGGAGCACACCGAGCAGAAGCGGAACGTGATCCGCAT
CATCCCGCACCACAACTACAACGCCGCCATCAACAAGTACAACCACGACATCGCGC
TCCTCGAGCTGGACGAGCCGCTGGTCCTCAACTCCTACGTCACGCCGATCTGCATCG
CCGACAAGGAGTACACGAACATCTTCCTGAAGTTCGGGAGCGGCTACGTCTCGGGC
TGGGGCCGCGTGTTCCACAAGGGGCGCAGCGCGCTCGTGCTCCAGTACCTGCGGGT
CCCCCTGGTCGACCGCGCGACCTGCCTCCTCTCCACGAAGTTCACGATCTACAACAA
CATGTTCTGCGCGGGGTTCCACGAGGGCGGCCGGGACAGCTGCCAGGGCGACAGCG
GGGGCCCGCACGTGACGGAGGTGGAGGGCACGAGCTTCCTGACCGGGATCATCTCG
TGGGGCGAGGAGTGCGCGATGAAGGGGAAGTACGGCATCTACACCAAGGTCAGCC
GGTACGTGAACTGGATCAAGGAGAAGACGAAGCTGACG (SEQ ID NO: 2)
o
ATGCAGCGGGTGAACATGATCATGGCCGAGTCCCCAGGCCTGATTACCATCTGTCTG
CTGGGCTACCTGCTGAGCGCCGAATGCACCGTGTTTCTGGACCACGAGAACGCCAA
CAAGATCCTGAACCGCCCTAAGCGGTACAACTCCGGCAAGCTGGAGGAGTTTGTGC
AGGGCAATCTGGAGCGGGAGTGTATGGAGGAGAAGTGCAGCTTCGAGGAGGCCAG
GGAGGTGTTCGAGAACACCGAGAGGACCACCGAGTTCTGGAAGCAGTATGTGGACG
GCGACCAGTGCGAGTCTAATCCTTGTCTGAATGGCGGGAGCTGCAAGGACGACATC
AACAGCTACGAGTGCTGGTGCCCTTTCGGCTTCGAGGGCAAGAATTGCGAGCTGGA
CGTGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGGTGTGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCG
ACAACAAGGTGGTGTGCTCCTGCACCGAGGGATACAGGCTGGCCGAGAATCAGAAG
AGCTGTGAGCCCGCCGTGCCATTCCCCTGTGGCAGAGTGTCTGTGAGCCAGACCAGC
AAGCTGACCAGAGCCGAGACCGTGTTTCCAGACGTGGACTACGTGAACAGCACCGA
GGCCGAGACCATCCTGGATAATATCACCCAGTCCACCCAGAGCTTCAACGACTTCAC
CAGAGTGGTGGGAGGCGAGGATGCCAAGCCAGGACAGTTTCCCTGGCAGGTGGTGC
TGAATGGCAAGGTGGACGCCTTCTGCGGAGGCAGCATCGTGAACGAGAAGTGGATT
GTGACCGCAGCCCACTGCGTGGAGACTGGCGTGAAGATTACCGTGGTCGCCGGCGA
GCACAATATCGAAGAGACCGAGCACACCGAGCAGAAGCGCAACGTGATCCGGATC

ATCCCTCACCACAACTACAACGCAGCCATCAACAAGTACAACCACGACATCGCCCT
GCTGGAGCTGGACGAGCCACTGGTGCTGAACTCTTACGTGACCCCTATCTGCATCGC
CGACAAGGAGTACACCAACATCTTCCTGAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGAGCGGAT
GGGGCAGAGTGTTTCACAAGGGCAGGAGCGCCCTGGTGCTGCAGTATCTGAGAGTG
CCACTGGTGGACAGAGCTACCTGCCTGCTGAGCACCAAGTTCACCATCTACAACAAC
ATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGGGGAAGAGACTCTTGCCAGGGCGATTCCGG
CGGACCACACGTGACCGAAGTGGAGGGCACCAGCTTCCTGACCGGCATCATCTCCT
GGGGCGAGGAATGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGCATCTACACCAAGGTGAGCAG
GTACGTGAACTGGATCAAGGAGAAGACCAAGCTGACC (SEQ ID NO: 4).

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella que se identifica y se separa de al menos una molécula-impureza de ácido nucleico, a la que la primera suele estar unida en la fuente natural de ácido nucleico de la nucleasa. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o conjunto en que se encuentra en condiciones naturales. Así, una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de una molécula de ácido nucleico que existe en las células en condiciones naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico localizada en células en las que la nucleasa se expresa normalmente, por ejemplo, si la molécula de ácido nucleico tiene una localización cromosómica que es diferente de su localización en las células en condiciones naturales.

El ácido nucleico optimizado por codón anterior se obtuvo mediante la optimización por codón de un ácido nucleico de tipo salvaje que tiene la secuencia de nucleótidos ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATCACCATCTGCCTT
TTAGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAAC
AAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCA
AGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGA
GAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGG
AGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTA
ATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATG
TAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGAT
AACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTC
CTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAAACTTCTAA
GCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCT
GAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGG
GTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAAT
GGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAACT
GCTGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAAT

ATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCA
CCACAACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACT
GGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGA
ATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGT
CTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGA
CCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCT
GGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGT
TACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGT
GTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGG
ATTAAGGAAAAAACAAAGCTCACT (SEQ ID NO: 17)

Como resultado de la optimización de codones del ácido nucleico de tipo salvaje que codifica la proteína FIX y que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17, se obtuvieron varios ácidos nucleicos optimizados por codones, que se sometieron a pruebas adicionales para determinar el nivel de producción de proteínas en comparación con el control (ácido nucleico de tipo salvaje con SEQ ID NO:17).

Todos los ácidos nucleicos optimizados por codón mostraron un mayor nivel de producción de proteína FIX en comparación con el tipo salvaje; además, el ácido nucleico optimizado por codón de la invención que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 (hFIXco-v1) y el ácido nucleico optimizado por codón de la invención que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4 (hFIXco-v2) mostraron sorprendentemente los mejores resultados, en particular, un mayor nivel de expresión del gen FIX, un nivel varias veces mayor de producción de proteína FIX en comparación con los del tipo salvaje (véanse los ejemplos 2, 3 y 4).

Casete de expresión. Vector de expresión

En un aspecto, la presente invención se refiere a un casete de expresión que incluye el ácido nucleico optimizado por codones anterior que codifica la proteína FIX (factor de coagulación IX).

El término "casete que expresa" o "casete de expresión", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere en particular a un fragmento de ADN que es capaz, en una configuración adecuada, de desencadenar la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés que está incluido en dicho casete de expresión. Cuando se introduce en una célula huésped, el casete de expresión es capaz, entre otras cosas, de activar los mecanismos celulares para transcribir el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés en ARN que, a continuación, suele ser procesado y finalmente traducido en el polipéptido de interés. El casete de expresión puede estar contenido en un vector de expresión.

El casete de expresión de la presente invención comprende un promotor como elemento. El término "promotor", tal y como se utiliza aquí, se refiere en particular a un elemento de ADN que promueve la transcripción de un polinucleótido al que el promotor está vinculado de forma operativa. El promotor puede además formar parte de un elemento promotor/potenciador. Aunque los límites físicos entre los elementos "promotores" y "potenciadores" no siempre están claros, el término "promotor" suele referirse a un lugar de la molécula de ácido nucleico al que se une una ARN polimerasa y/o cualquier factor asociado y en el que se inicia la transcripción. Los reforzadores potencian la actividad del promotor tanto temporal como espacialmente. Muchos promotores son conocidos en la técnica por ser transcripcionalmente activos en una amplia gama de tipos de células. Los promotores pueden dividirse en dos clases, los que funcionan de forma constitutiva y los que están regulados por inducción o desrepresión. Ambas clases son adecuadas para la expresión de proteínas. Los promotores que se utilizan para la producción de alto nivel de polipéptidos en células eucariotas y, en particular, en células de mamíferos, deben ser fuertes y preferiblemente activos en una amplia gama de tipos de células. Los promotores constitutivos fuertes que son capaces de impulsar la expresión en muchos tipos de células son bien conocidos en la técnica y, por lo tanto, no es necesario describirlos aquí en detalle. De acuerdo con la idea de la presente invención, es preferible utilizar el promotor TTR. El promotor TTR o el promotor/potenciador TTR es particularmente adecuado como promotor en el casete de expresión de la presente invención. Según una realización de la invención, el promotor TTR se utiliza en el casete de expresión de la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

Promotor de la TTR (promotor de la transtiretina);

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado por codones antes mencionado que codifica la proteína FIX (factor de coagulación IX);

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

En algunas realizaciones de la invención, el ITR izquierdo (primero) tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

Cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcgagcgag cgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcct (SEQ ID NO: 6).

En algunas realizaciones de la invención, el promotor TTR tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

tcgagcttgggctgcaggtcgagggcactgggaggatgttgagtaagatggaaaactactgatgacccttgcagagacagagtattagga
catgtttgaacaggggccggcgatcagcaggtagctctagaggatccccgtctgtctgcacatttcgtagagcgagtgttccgatactctaat
ctccctaggcaaggttcatatttgtgtaggttacttattctccttttgttgactaagtcaataatcagaatcagcaggtttggagtcagcttggcag
ggatcagcagcctgggttggaaggagggggtataaaagccccttcaccaggagaagccgtcacacagatccacaagctcctgacagga
agct (SEQ ID NO: 7).

En algunas realizaciones de la invención, el intrón del gen hBG1 tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

cgaatcccggccgggaacggtgcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagtaccgcctatagagtctataggcccacaa
aaaatgctttcttcttttaatatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaatctctttctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgcctcttt
gcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaatatttctgcatataaattgtaactgatgtaa
gaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagtccaagctagg
ccctttgctaatcatgttcatacctcttatcttcctcccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgtgctggcccatcactttggcaaagaatt
gggat (SEQ ID NO: 8).

En algunas realizaciones de la invención, la señal de poliadenilación de hGH1 tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

acgggtggcatccctgtgacccctccccagtgccCctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgtcctaataaaatta
agttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggagggggggtggtatggagcaaggggcaagttgggaagacaacc
tgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctgggttcaagcgat
tctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaatttttgtttttttggtagagacggggtttcaccat
attggccaggctggtctccaactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctcccaaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctcc
cttccctgtcctt (SEQ ID NO: 9).

En algunas realizaciones de la invención, el ITR de la derecha (segundo) tiene la siguiente secuencia de ácido nucleico:

aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccg
ggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 10).

En algunas realizaciones de la invención, el casete de expresión incluye una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que comprende:

cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcctgcggccgcacgcgtgccgccaccATGGtcgagcttgg
gctgcaggtcgagggcactgggaggatgttgagtaagatggaaaactactgatgacccttgcagagacagagtattaggacatgtttgaac
aggggccggcgatcagcaggtagctctagaggatccccgtctgtctgcacatttcgtagagcgagtgttccgatactctaatctccctaggc
aaggttcatatttgtgtaggttacttattctccttttgttgactaagtcaataatcagaatcagcaggtttggagtcagcttggcagggatcagcag
cctgggttggaaggagggggtataaaagccccttcaccaggagaagccgtcacacagatccacaagctcctgacaggaagctctaggtg

actctcttaaggtagcctccgcggattcgaatcccggccgggaacggtgcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagtac
cgcctatagagtctataggcccacaaaaaatgctttcttcttttaatatactttttttgtttatcttatttctaatactttccctaatctctttctttcagggc
aataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaata
tttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataag
gctggattattctgagtccaagctaggccctttttgctaatcatgttcatacctcttatcttcctcccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgt
gctggcccatcactttggcaaagaattgggattcgaacatCGATATGCAGCGGGTCAACATGATCATGGCGG
AGTCGCCGGGCCTGATCACGATCTGCCTCCTCGGGTACCTGCTCTCCGCCGAGTGCA
CCGTGTTCCTGGACCACGAGAACGCCAACAAGATCCTCAACCGGCCCAAGCGCTAC
AACTCCGGCAAGCTGGAGGAGTTCGTGCAGGGGAACCTCGAGCGCGAGTGCATGGA
GGAGAAGTGCTCGTTCGAGGAGGCGCGGGAGGTGTTCGAGAACACCGAGCGCACCA
CGGAGTTCTGGAAGCAGTACGTGGACGGGGACCAGTGCGAGTCGAACCCGTGCCTC
AACGGGGGGTCGTGCAAGGACGACATCAACTCGTACGAGTGCTGGTGCCCCTTCGG
CTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGCTGGACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGGCGCT
GCGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAAGGTGGTCTGCTCCTGCACCGAG
GGGTACCGCCTCGCGGAGAACCAGAAGTCCTGCGAGCCGGCCGTGCCCTTCCCCTG
CGGCCGCGTGTCCGTCAGCCAGACGTCGAAGCTGACGCGCGCCGAGACCGTCTTCC
CGGACGTGGACTACGTGAACTCGACGGAGGCCGAGACCATCCTGGACAACATCACC
CAGAGCACCCAGTCCTTCAACGACTTCACGCGGGTGGTCGGCGGCGAGGACGCCAA
GCCCGGGCAGTTCCCGTGGCAGGTCGTCCTCAACGGGAAGGTCGACGCGTTCTGCG
GCGGGAGCATCGTGAACGAGAAGTGGATCGTGACCGCCGCGCACTGCGTCGAGACG
GGCGTGAAGATCACCGTGGTGGCCGGGGAGCACAACATCGAGGAGACGGAGCACA
CCGAGCAGAAGCGGAACGTGATCCGCATCATCCCGCACCACAACTACAACGCCGCC
ATCAACAAGTACAACCACGACATCGCGCTCCTCGAGCTGGACGAGCCGCTGGTCCT
CAACTCCTACGTCACGCCGATCTGCATCGCCGACAAGGAGTACACGAACATCTTCCT
GAAGTTCGGGAGCGGCTACGTCTCGGGCTGGGGCCGCGTGTTCCACAAGGGGCGCA
GCGCGCTCGTGCTCCAGTACCTGCGGGTCCCCCTGGTCGACCGCGCGACCTGCCTCC
TCTCCACGAAGTTCACGATCTACAACAACATGTTCTGCGCGGGGTTCCACGAGGGCG
GCCGGGACAGCTGCCAGGGCGACAGCGGGGGCCCGCACGTGACGGAGGTGGAGGG
CACGAGCTTCCTGACCGGGATCATCTCGTGGGGCGAGGAGTGCGCGATGAAGGGGA
AGTACGGCATCTACACCAAGGTCAGCCGGTACGTGAACTGGATCAAGGAGAAGACG
AAGCTGACGTGATGAAgatctacgggtggcatccctgtgacccctccccagtgccCctcctggccctggaagttgccactc
cagtgcccaccagccttgtcctaataaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggagggggggtggtat
ggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctc
actgcaatctccgcctcctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaat
ttttgtttttttggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctcccaaatt

gctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttccctgtccttctgattttgtaggtaaccacgtgcggaccgagcggccgcaggaacccct
agtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccg
ggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 3)

o

cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagcg
agcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttcctgcggccgcacgcgtgccgccaccATGGtcgagcttgg
gctgcaggtcgagggcactgggaggatgttgagtaagatggaaaactactgatgacccttgcagagacagagtattaggacatgtttgaac
aggggccggcgatcagcaggtagctctagaggatccccgtctgtctgcacatttcgtagagcgagtgttccgatactctaatctccctaggc
aaggttcatatttgtgtaggttacttattctccttttgttgactaagtcaataatcagaatcagcaggtttggagtcagcttggcagggatcagcag
cctgggttggaaggagggggtataaaagccccttcaccaggagaagccgtcacacagatccacaagctcctgacaggaagctctaggtg
actctcttaaggtagcctccgcggattcgaatcccggccgggaacggtgcattggaacgcggattccccgtgccaagagtgacgtaagtac
cgcctatagagtctataggcccacaaaaaatgctttcttcttttaatatactttttgtttatcttatttctaatactttccctaatctctttctttcagggc
aataatgatacaatgtatcatgcctctttgcaccattctaaagaataacagtgataatttctgggttaaggcaatagcaatatttctgcatataaata
tttctgcatataaattgtaactgatgtaagaggtttcatattgctaatagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataag
gctggattattctgagtccaagctaggccctttgctaatcatgttcatacctcttatcttcctcccacagctcctgggcaacgtgctggtctgtgt
gctggcccatcactttggcaaagaattgggattcgaacatcgatataaATGCAGCGGGTGAACATGATCATGGCC
GAGTCCCCAGGCCTGATTACCATCTGTCTGCTGGGCTACCTGCTGAGCGCCGAATGC
ACCGTGTTTCTGGACCACGAGAACGCCAACAAGATCCTGAACCGCCCTAAGCGGTA
CAACTCCGGCAAGCTGGAGGAGTTTGTGCAGGGCAATCTGGAGCGGGAGTGTATGG
AGGAGAAGTGCAGCTTCGAGGAGGCCAGGGAGGTGTTCGAGAACACCGAGAGGAC
CACCGAGTTCTGGAAGCAGTATGTGGACGGCGACCAGTGCGAGTCTAATCCTTGTCT
GAATGGCGGGAGCTGCAAGGACGACATCAACAGCTACGAGTGCTGGTGCCCTTTCG
GCTTCGAGGGCAAGAATTGCGAGCTGGACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGG
TGTGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAAGGTGGTGTGCTCCTGCACCGA
GGGATACAGGCTGGCCGAGAATCAGAAGAGCTGTGAGCCCGCCGTGCCATTCCCCT
GTGGCAGAGTGTCTGTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCAGAGCCGAGACCGTGTTT
CCAGACGTGGACTACGTGAACAGCACCGAGGCCGAGACCATCCTGGATAATATCAC
CCAGTCCACCCAGAGCTTCAACGACTTCACCAGAGTGGTGGGAGGCGAGGATGCCA
AGCCAGGACAGTTTCCCTGGCAGGTGGTGCTGAATGGCAAGGTGGACGCCTTCTGC
GGAGGCAGCATCGTGAACGAGAAGTGGATTGTGACCGCAGCCCACTGCGTGGAGAC
TGGCGTGAAGATTACCGTGGTCGCCGGCGAGCACAATATCGAAGAGACCGAGCACA
CCGAGCAGAAGCGCAACGTGATCCGGATCATCCCTCACCACAACTACAACGCAGCC
ATCAACAAGTACAACCACGACATCGCCCTGCTGGAGCTGGACGAGCCACTGGTGCT
GAACTCTTACGTGACCCCTATCTGCATCGCCGACAAGGAGTACACCAACATCTTCCT
GAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGAGCGGATGGGGCAGAGTGTTTCACAAGGGCAGGA

GCGCCCTGGTGCTGCAGTATCTGAGAGTGCCACTGGTGGACAGAGCTACCTGCCTGC
TGAGCACCAAGTTCACCATCTACAACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGGG
GAAGAGACTCTTGCCAGGGCGATTCCGGCGGACCACACGTGACCGAAGTGGAGGGC
ACCAGCTTCCTGACCGGCATCATCTCCTGGGGCGAGGAATGCGCCATGAAGGGCAA
GTACGGCATCTACACCAAGGTGAGCAGGTACGTGAACTGGATCAAGGAGAAGACCA
AGCTGACCtgaagatctacgggtggcatccctgtgacccctccccagtgccCctcctggccctggaagttgccactccagtgccca
ccagccttgtcctaataaaattaagttgcatcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggagggggggtggtatggagcaag
gggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatct
ccgcctcctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgaccaggctcagctaatttttgtttttt
ggtagagacggggtttcaccatattggccaggctggtctccaactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctcccaaattgctgggatt
acaggcgtgaaccactgctcccttccctgtccttctgattttgtaggtaaccacgtgcggaccgagcggccgcaggaacccctagtgatgga
gttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcct
cagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg (SEQ ID NO: 5).

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que incluye el ácido nucleico optimizado por codones anterior o cualquiera de los casetes de expresión anteriores.

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un plásmido, es decir, un pedazo circular de doble cadena de ADN en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN.

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral.

En algunas realizaciones de la invención, los vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un sitio de origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). En otras realizaciones de la invención, los vectores (por ejemplo, los vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en una célula huésped, y por tanto se replican junto con el gen huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan aquí "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas, como el virus del mosaico de la coliflor, el virus del mosaico del tabaco, cósmidos, cromosoma artificial de levadura, episomas derivados del VEB, y similares. Las moléculas de ADN pueden ligarse a un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traslacional dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y la traducción del ADN. Pueden elegirse un vector de expresión y secuencias de control de expresión que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. Las moléculas de ADN pueden introducirse en el vector de expresión por métodos estándar (por

ejemplo, ligando sitios de restricción complementarios, o ligando el extremo romo si no hay sitios de restricción).

El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido líder (o un péptido señal) que facilita la secreción de la proteína de interés a partir de una célula huésped. El gen de la proteína de interés puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal esté unido en el marco al extremo amínico de la proteína de interés. El péptido líder (o péptido señal) puede ser un péptido líder de inmunoglobulina u otro péptido líder (es decir, un péptido líder de proteína no inmunoglobulina).

Además del gen FIX de la presente invención, la expresión recombinante de los vectores de la presente invención puede llevar secuencias reguladoras que controlan la expresión del gen FIX en una célula huésped. Los expertos en la técnica entenderán que el diseño de un vector de expresión, incluida la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de una célula huésped a ser transformada, el nivel de expresión de una proteína deseada, etc. Las secuencias de control preferidas para una célula huésped de expresión en mamíferos incluyen elementos virales que aseguran altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, como promotores y/o potenciadores derivados de un LTR retroviral, citomegalovirus (CMV) (como un promotor/potenciador de CMV), virus simiano 40 (SV40) (como un promotor/ potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor principal tardío del adenovirus (AdMLP)), poliomavirus y promotores fuertes de mamíferos como el promotor TTR, el promotor nativo de inmunoglobulina o el promotor de actina.

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

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término "promotor" o "secuencia reguladora de la transcripción" o "secuencia reguladora" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que controla la transcripción de una o más secuencias codificantes, y que está situado secuencia arriba con respecto a la dirección de lectura relativa a la dirección de la transcripción desde el sitio de inicio de la transcripción de la secuencia codificante, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa dependiente del ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, entre otros, sitios de unión de factores de transcripción, sitios de unión de proteínas represoras y activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por un experto en la técnica que regule directa o indirectamente el nivel de transcripción con dicho promotor. Un promotor

"constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas y de desarrollo típicas. Un promotor "inducible" es un promotor regulado fisiológicamente o por el desarrollo, por ejemplo, bajo la influencia de un inductor químico. Un promotor "específico de tejido" sólo es activo en determinados tipos de tejidos o células.

Los términos "reforzadores" o "potenciadores", tal y como se utilizan aquí, pueden referirse a una secuencia de ADN que se encuentra adyacente a la secuencia de ADN que codifica un producto recombinante. Los elementos potenciadores suelen estar situados en dirección 5' desde un elemento promotor o pueden estar situados secuencia abajo o dentro de una secuencia de ADN codificante (por ejemplo, una secuencia de ADN transcrita o traducida en un producto o productos recombinantes). Por lo tanto, un elemento potenciador podría estar situado 100 pares de bases, 200 pares de bases o 300 o más pares de bases secuencia arriba de una secuencia de ADN que codifica un producto recombinante, o secuencia abajo de dicha secuencia. Los elementos potenciadores pueden aumentar la cantidad de un producto recombinante que se expresa a partir de una secuencia de ADN por encima del nivel de expresión asociado a un único elemento promotor. Los elementos potenciadores múltiples están fácilmente disponibles para aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica.

Además de los genes y las secuencias reguladoras mencionadas, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación de un vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido un vector (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nro. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, normalmente el gen marcador de selección confiere resistencia a agentes medicinales, como G418, ampicilina, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Por ejemplo, los genes marcadores de selección incluyen un gen del dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células anfitrionas de dhfr durante la selección/amplificación de metotrexato), un gen neo (para la selección de G418) y un gen de la glutamato sintetasa.

El término "secuencia de control de expresión", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para llevar a cabo la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se ligan. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales eficientes de procesamiento del ARN, como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y, cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción de

la proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere según el organismo anfitrión; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen el promotor del sitio de unión al ribosoma, y secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotas, típicamente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" incluye al menos todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias compañeras de fusión.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "operablemente enlazado" se refiere a una unión de elementos polinucleotídicos (o polipeptídicos) en una relación funcional. Un ácido nucleico está "operativamente enlazado" cuando está presente en condiciones de relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia reguladora de la transcripción está vinculada operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de dicha secuencia codificante. El término "operativamente enlazado" significa que las secuencias de ADN que se enlazan son típicamente contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, también son contiguas y están presentes en el marco de lectura.

En una realización de la presente invención, el "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende una o más secuencias polinucleotídicas de interés, genes de interés o "transgenes" que están flanqueados por secuencias parvovirales o secuencias de repetición terminal invertida (ITR).

Ni el casete ni el vector de la invención comprenden secuencias de nucleótidos de genes que codifican proteínas no estructurales (Rep) y proteínas estructurales (Cap) del virus adenoasociado.

Virus recombinante basado en el AAV5 (virus adenoasociado de serotipo 5)

En un aspecto, la presente invención se refiere a un virus recombinante aislado basado en el AAV5 (virus adenoasociado de serotipo 5) para aumentar la expresión del gen FIX en las células diana, que comprende el ácido nucleico optimizado en codones anterior o cualquiera de los casetes de expresión anteriores.

El término "virus recombinante basado en AAV" (o "partícula similar al virus basado en AAV", o "cepa de virus recombinante AAV", o "vector recombinante AAV", o "vector rAAV"), tal como se utiliza en esta descripción, se refiere al casete de expresión anterior (o al vector de expresión anterior), que está encerrado dentro de la cápside de AAV.

El gen Cap, entre otros productos alternativos, codifica 3 proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3). VP1, VP2 y VP3 están presentes en una proporción de 1:1:10 para formar una cápside icosaédrica (Xie Q. et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for

human gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:10405-10410). La transcripción de estos genes parte de un único promotor, el p40. Los pesos moleculares de las proteínas correspondientes (VP1, VP2 и VP3) son de 87, 72 y 62 kDa, respectivamente. Las tres proteínas se traducen a partir de un único ARNm. Tras la transcripción, el pre-ARNm puede empalmarse de dos maneras diferentes, en las que se extirpa un intrón más largo o más corto para formar ARNm de varias longitudes de nucleótidos.

Durante la producción del virus recombinante basado en AAV (rAAV), un casete de expresión flanqueado por ITR se empaqueta en una cápside de AAV. Los genes necesarios para la replicación del AAV, como se ha mencionado anteriormente, no están incluidos en el casete.

El ADN del casete de expresión está empaquetado en una cápside viral en forma de molécula de ADN monocatenario (ssADN) de aproximadamente 3000 nucleótidos. Una vez que una célula se infecta con el virus, el ADN monocatenario se convierte en la forma de ADN de doble cadena (dsADN). El dsADN sólo puede ser utilizado por las proteínas de la célula, que transcriben el gen o los genes presentes en el ARN.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1.

En algunas realizaciones de la invención el virus recombinante basado en AAV5-tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos MSFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPGNGL DRGEPVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEFQEKLADDTSFGGNLGK AVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG SQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVV TKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDW QRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVG NGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY NFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLI KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ FVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 11).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP2.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP2 que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMSAG
GGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKS
GSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQ
VKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYA
TLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPL
VDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGVNRASV
SAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLE
GNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVY
LQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYS
TGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLT
RPL (SEQ ID NO: 12).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP3.

En algunas realizaciones de la invención el virus recombinante basado en AAV5-tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP3 con la siguiente secuencia de aminoácidos MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQY
REIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVK
IFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQ
YGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFK
LANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGV
NRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTT
ATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWM
ERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSS
FITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIG
TRYLTRPL (SEQ ID NO: 13).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye las proteínas AAV5 VP1, VP2 y VP3.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye las proteínas VP1 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, VP2 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y VP3 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye una proteína AAV5 VP1 que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye sustituciones de aminoácidos en las posiciones S2A y T711S de la AAV5 VP1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 11), y que tiene la secuencia de aminoácidos MAFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPGNG LDRGEPVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEFQEKLADDTSFGGNLGK AVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSG SQQLQIPAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVV TKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDW QRLINNYWGFRPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVG NGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTY NFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNW FPGPMGRTQGWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAP ATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLI KNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ FVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 14).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 con una o más mutaciones puntuales.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye una proteína AAV5 VP2 con una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución de aminoácidos en la posición T575S de la AAV5 VP2 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 12), y tiene la secuencia de aminoácidos TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQIPAQPASSLGADTMS AGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQY REIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLR VKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQV FTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFA PSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQ GWNLGSGVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMI FNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGT YNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKN TPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQ FVDFAPDSTGEYRSTRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO: 15).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 con una o más mutaciones puntuales.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye una proteína AAV5 VP3 con una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución de aminoácidos en la posición T519S de la AAV5 VP3 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 13), y tiene la secuencia de aminoácidos MSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQY REIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRPRSLRVK IFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQ YGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFK LANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTQGWNLGSGV NRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTT ATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIVPGSVWM ERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSS FITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRSTRPIG TRYLTRPL (SEQ ID NO: 16).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye las proteínas VP1 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, VP2 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 con una o más mutaciones puntuales, y VP3 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más mutaciones puntuales.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye las proteínas VP1 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, VP2 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 y VP3 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

La frase "más mutaciones de puntos" se refiere a sustituciones de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez puntos.

Las realizaciones particularmente preferidas incluyen sustituciones (mutaciones) que son de naturaleza conservadora, es decir, sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están unidos en sus cadenas laterales. En concreto, los aminoácidos suelen dividirse en cuatro familias: (1) los aminoácidos ácidos son el aspartato y el glutamato; (2) los aminoácidos básicos son la lisina, la arginina y la histidina; (3) los aminoácidos no polares son la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina y el triptófano, y (4) los aminoácidos polares no cargados son la glicina, la asparagina, la glutamina, la cisteína,

la serina, la treonina y la tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución conservadora similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante en la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta unas 5-10 sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, siempre que la función deseada de la molécula permanezca intacta.

Una variante de las mutaciones puntuales en las secuencias de las proteínas AAV5 VP1, VP2 o VP3 mediante sustituciones de aminoácidos es la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la proteína AAV5 VP1, VP2 o VP3 por otro residuo de aminoácido.

Las sustituciones conservadoras figuran en el cuadro A en el apartado "sustituciones preferidas".

Tabla A		
Residuo inicial	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
Su (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(s)	Thr	Thr

Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, y el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

Promotor de la TTR (promotor de la transtiretina);

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado para el codón anterior;

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, la proteína AAV5 VP2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y la proteína AAV5 VP3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

Promotor de la TTR (promotor de la transtiretina);

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado para el codón anterior;

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, la proteína AAV5 VP2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 con una o más mutaciones puntuales, y la proteína AAV5 VP3 con la secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 con una o más mutaciones puntuales, y el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

Promotor de la TTR (promotor de la transtiretina);

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado para el codón anterior;

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, la proteína AAV5 VP2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y la proteína AAV5 VP3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

Promotor de la TTR (promotor de la transtiretina);

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado para el codón anterior;

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, y el casete de expresión incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende: SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye las proteínas VP1 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, VP2 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y VP3 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y el casete de expresión incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye las proteínas VP1 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, VP2 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 con una o más mutaciones puntuales, y VP3 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13

con una o más mutaciones puntuales, y el casete de expresión incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende: SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones de la invención, el virus recombinante basado en AAV5 tiene una cápside que incluye las proteínas VP1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, VP2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y VP3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y el casete de expresión incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

Composición farmacéutica

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para administrar el gen FIX a las células diana, que incluye cualquiera de los virus recombinantes basados en AAV5 mencionados anteriormente en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

El principio activo de la composición anterior está presente en una cantidad efectiva, por ejemplo, en una cantidad biológicamente efectiva.

En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el virus recombinante basado en AAV5 de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable o en otros agentes farmacéuticos, adyuvantes, diluyentes, etc. Para la inyección, el portador será típicamente un portador líquido. Para otros métodos de administración, el portador puede ser sólido o líquido, como agua estéril libre de pirógenos o solución salina estéril tamponada con fosfato. Para la administración por inhalación, el portador es respirable, y preferentemente se encuentra en forma de partículas sólidas o líquidas. Como medio de inyección, se prefiere utilizar agua que contenga los aditivos habituales en las soluciones de inyección, como agentes estabilizadores, sales o salinas, y/o tampones.

"Composición farmacéutica" significa una composición que comprende el anterior virus recombinante basado en el AAV5 de la invención y al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que consiste en excipientes farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente compatibles, como cargas, disolventes, diluyentes, portadores, auxiliares, agentes de distribución, agentes de entrega, conservantes, estabilizadores, emulsionantes, agentes de suspensión, espesantes, controladores de entrega prolongada, cuya elección y proporciones dependen del tipo y la vía de administración y la dosis. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y los métodos de preparación de las mismas serán sin duda evidentes para los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas deben fabricarse preferentemente de acuerdo con los requisitos de las PCF (prácticas correctas de fabricación). La composición puede comprender una composición tampón, agentes de tonicidad, estabilizadores y solubilizadores.

"Farmacéuticamente aceptable" significa un material que no tiene efectos biológicos u otros efectos secundarios negativos, por ejemplo, el material puede ser administrado a un sujeto sin causar ningún efecto biológico indeseable. Así, dichas composiciones farmacéuticas pueden utilizarse, por ejemplo, en la transfección de una célula ex vivo o en la administración in vivo del virus recombinante basado en AAV5 de la invención directamente a un sujeto.

El término "excipiente" se utiliza aquí para describir cualquier ingrediente distinto de los anteriores de la invención. Son sustancias de naturaleza inorgánica u orgánica que se utilizan en la producción/fabricación farmacéutica para dar a los medicamentos las propiedades fisicoquímicas necesarias.

"Estabilizador" se refiere a un excipiente o una mezcla de dos o más excipientes que proporcionan la estabilidad física y/o química del agente activo.

El término "tampón", "composición tampón", "agente tampón" se refiere a una solución que es capaz de resistir los cambios de pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base, lo que permite que el producto vectorial rAAV5 resista los cambios de pH. Generalmente, la composición farmacéutica tiene preferentemente un pH en el rango de 4,0 a 8,0. Los ejemplos de tampones utilizados incluyen, entre otros, soluciones tampón de acetato, fosfato, citrato, histidina, succinato, etc.

La composición farmacéutica es "estable" si el agente activo conserva la estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica del mismo durante el tiempo de conservación especificado a una temperatura de almacenamiento, por ejemplo, de 2-8 °C. Preferiblemente, el agente activo conserva tanto la estabilidad física como la química, así como la actividad biológica. El periodo de almacenamiento se ajusta en función de los resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de envejecimiento acelerado o natural.

Una composición farmacéutica según la invención puede fabricarse, envasarse o venderse ampliamente en forma de una dosis unitaria o de una multitud de dosis unitarias en forma de formulación lista. El término "dosis unitaria", tal como se utiliza aquí, se refiere a una cantidad discreta de una composición farmacéutica que contiene una cantidad predeterminada de un ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo suele ser igual a la dosis del ingrediente activo que se va a administrar en un sujeto, o una porción conveniente de dicha dosis, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

Uso

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los anteriores virus recombinantes basados en AAV5 o la anterior composición para entregar el gen FIX a las células diana.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los anteriores virus recombinantes basados en AAV5 o la anterior composición para proporcionar la proteína FIX a un sujeto que tiene hemofilia B y/o que no tiene copias totalmente funcionales del gen FIX.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de cualquiera de los anteriores virus recombinantes basados en AAV5 o la anterior composición para tratar la hemofilia B en un sujeto que tiene hemofilia B.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para proporcionar la proteína FIX a un sujeto que tiene hemofilia B, dicho método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los virus recombinantes basados en AAV5 mencionados anteriormente o la composición mencionada en las células del sujeto que lo necesita.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para administrar el gen FIX a las células diana de un sujeto que tiene hemofilia B, dicho método comprende la administración de cualquiera de los virus recombinantes basados en AAV5 mencionados anteriormente o la composición mencionada en las células del sujeto.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar la hemofilia B en un sujeto, dicho método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los virus recombinantes basados en AAV5 mencionados anteriormente o la composición mencionada en un sujeto que tiene hemofilia B.

La hemofilia B es un trastorno hereditario de la coagulación causado por la deficiencia o la ausencia total del factor de coagulación IX (FIX). La prevalencia de la hemofilia B es de aproximadamente 1 de cada 40.000 niños recién nacidos. La deficiencia del factor de coagulación se acompaña de hemorragias espontáneas o inducidas en articulaciones, músculos y órganos internos.

La falta de copias totalmente funcionales del gen FIX se refiere a mutaciones inactivadoras o deleciones en todas las copias del gen FIX en el genoma, que resultan en la pérdida o defecto de la función del gen FIX.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal que se pueda someter a las técnicas previstas en la presente descripción. En ciertas realizaciones no limitantes, el sujeto es un humano. Dicho sujeto puede ser hombre o mujer, de cualquier edad.

Un sujeto que necesita suministrar el gen FIX a las células diana, o un sujeto que necesita que se le proporcione la proteína FIX se refiere a un sujeto que tiene hemofilia B, o a un sujeto que tiene la deficiencia del factor de coagulación IX, o a un sujeto que tiene mutaciones o deleciones inactivadoras en el gen FIX que conducen a la pérdida o al defecto de la función del gen FIX.

Los modos de administración ejemplares incluyen la aplicación tópica, la intranasal, la inhalación, la transmucosa, la transdérmica, la enteral (por ejemplo, la oral, la rectal), la parenteral (por ejemplo, la intravenosa, la subcutánea, la intradérmica, la intramuscular), así como las inyecciones directas en tejidos u órganos.

Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la preparación de soluciones o suspensiones en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Alternativamente, se puede administrar el anterior virus recombinante basado en AAV5 de la presente invención de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación sostenida.

El virus recombinante basado en AAV5 se introduce en un organismo en una cantidad efectiva. El virus recombinante basado en AAV5 se introduce preferentemente en un organismo en una cantidad biológicamente eficaz. Una cantidad "biológicamente efectiva" del virus recombinante es una cantidad suficiente para causar la transducción y expresión de la secuencia de ácido nucleico en la célula. Si el virus se administra a una célula in vivo (por ejemplo, el virus se administra a un sujeto, como se describe más adelante), una cantidad "biológicamente efectiva" del vector viral es una cantidad que es suficiente para causar la transducción y la expresión de la secuencia de ácido nucleico en la célula diana.

Las dosis de los anteriores virus recombinantes basados en el AAV5 de la invención dependerán del modo de administración y del vector viral concreto, y pueden determinarse de forma rutinaria. Las dosis ejemplares para lograr efectos terapéuticos son títulos virales de al menos unas 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15}, 10^{16} unidades transductoras o más, preferiblemente entre 10^9 y 10^{15} unidades transductoras, pero más preferiblemente 10^{14} unidades transductoras por kilogramo.

La célula para administrar el anterior virus recombinante basado en AAV5 de la invención puede ser una célula de cualquier tipo, incluyendo, pero no limitándose a células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales de la piel, respiratorias e intestinales), células hepáticas, células musculares, células pancreáticas (incluyendo células de los islotes), células hepáticas, células del bazo, fibroblastos, células endoteliales y similares.

El anterior virus recombinante basado en el AAV5 de la invención no se utiliza para modificar la integridad genética de las células de la línea germinal humana.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención. Estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como una restricción del alcance de la invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en esta especificación se incorporan aquí por referencia. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de la comprensión, será fácilmente aparente para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que pueden hacerse a la misma ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o el alcance de las realizaciones anexas.

Materiales y métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos de biología molecular se utilizaron según los protocolos del fabricante. En resumen, se produjo ADN plasmídico para su posterior manipulación en células de E. coli cultivadas bajo presión selectiva de antibióticos para que los plásmidos no se perdieran en la población celular. Aislamos el ADN plasmídico de las células utilizando kits comerciales, medimos la concentración y lo utilizamos para la clonación mediante el tratamiento con endonucleasas de restricción o la amplificación por PCR. Los fragmentos de ADN se ligaron entre sí utilizando ligasas y se transformaron en células bacterianas para la selección de clones y la producción posterior. Todas las construcciones genéticas resultantes se confirmaron mediante patrones de restricción y secuenciación de Sanger completa.

Síntesis genética

Los segmentos genéticos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos fabricados por síntesis química. Los segmentos genéticos de 300 a 1000 pb de longitud, que estaban flanqueados por sitios de restricción únicos, se recogieron mediante la renaturalización de oligonucleótidos uno encima de otro, seguida de la amplificación por PCR a partir de los cebadores de borde. Como resultado, se produjo una mezcla de fragmentos, incluido el deseado. Los fragmentos se clonaron en sitios de restricción en vectores intermedios, tras lo cual las secuencias de ADN de los fragmentos subclonados se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

Determinación de la secuencia de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación Sanger. Se analizaron las secuencias de ADN y proteínas y los datos de las secuencias se procesaron en SnapGene Viewer 4.2 o superior para la creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

Cultivo de células

En los experimentos se utilizaron las líneas celulares HEK293 (clon de riñón embrionario humano 293) y HUH7 (carcinoma hepatocelular humano). Las células HEK293 en suspensión utilizadas para producir el AAV se cultivaron en condiciones estándar a 37^0 C y 5% de CO_2 en un medio de cultivo completo sin FBS y sin antibiótico. Las células HUH7 adherentes utilizadas para probar la eficacia de los productos AAV se cultivaron en condiciones estándar a37^0C y 5% deCO_2, en un medio DMEM completo suplementado con 10% de FBS, antibiótico/antimicótico. Las células HUH7 se subcultivaron al alcanzar el 80-90% de confluencia. Se utilizó la enzima TrypLE Select (10x) para disociar la monocapa celular. La viabilidad de las células se evaluó mediante la tinción con azul tripán y cámaras de recuento de células desechables utilizando un contador automático Countess II.

Ensamblaje y purificación de partículas virales de vectores recombinantes AAV

Las partículas de virus AAV que comprenden las variantes optimizadas de codones del gen FIX (hFIXco-v1 y hFIXco-v2) se ensamblaron utilizando células productoras HEK293 que fueron transfectadas con 3 plásmidos como sigue:

Los plásmidos pAAV-hFIXco-v1 y pAAV-hFIXco-v2 comprenden un casete de expresión AAV para la expresión de los transgenes hFIXco-v1 y hFIXco-v2, respectivamente (Fig. 1.);

Un plásmido para la expresión del gen Cap del serotipo AAV5 y del gen Rep del serotipo AAV2. Cada gen, utilizando marcos de lectura alternativos, codifica varios productos proteicos;

Un plásmido para la expresión de los genes Ad5 (adenovirus de serotipo 5) necesarios para el ensamblaje y el empaquetamiento de las cápsides AAV.

Después de 72 horas, las células se lisaron y las partículas virales se purificaron y concentraron mediante métodos de filtración, cromatografía y ultracentrifugación. El título de las partículas virales se determinó mediante PCR cuantitativa con cebadores y una muestra específica para la región del genoma viral recombinante y se expresó como el número de copias de genomas virales por 1 ml.

Transducción de cultivos celulares

La línea celular HUH7 se sembró previamente en los pocillos de placas de 12 pocillos a una densidad de 10.000 células/cm^2. Después de fijar las células al sustrato adhesivo, se

introdujeron preparaciones de AAV a una MOI de 500.000 vg/célula. El día 7 después de la transducción, se determinó el contenido y la actividad de la proteína FIX en el líquido de cultivo mediante ELISA, y el nivel de expresión del gen del factor de coagulación IX en las células se determinó mediante PCR cuantitativa de transcripción inversa, como se ha descrito anteriormente. Los estudios que implican la evaluación del nivel de la proteína FIX en el líquido de cultivo se realizaron en 6 experimentos independientes. Los estudios que implican la evaluación de la actividad de la proteína FIX que se secreta y el nivel de expresión del gen del factor de coagulación IX en las células se realizó en 3 experimentos independientes. Se utilizaron células intactas como control negativo.

Determinación del nivel de expresión del gen del factor de coagulación IX

El nivel de expresión del gen *FIX* en los cultivos celulares tras la transducción (o transfección) se determinó mediante la PCR cuantitativa de transcripción inversa. Brevemente, se aisló el ARN de los sedimentos celulares utilizando el kit RNeasy Plus mini (Qiagen) según el protocolo del fabricante. La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el kit de reactivos GoScript (Promega) según el protocolo del fabricante; en concreto, se tomaron inicialmente 500 ng de ARN para la reacción de transcripción inversa, se produjo ADNc utilizando cebadores aleatorios y oligo dT; tras la transcripción inversa, el volumen de ADNc se ajustó a 50 µl con agua estéril. La PCR cuantitativa se realizó mediante la tecnología TaqMan utilizando una mezcla de reacción qPCRmix-HS HighROX (Eurogene), según el protocolo del fabricante, en un instrumento StepOne (Applied Biosystems). Seleccionamos cebadores y sondas específicas para el gen objetivo (*FIX*) y para el gen de mantenimiento (*GAPDH*). Las curvas estándar se trazaron utilizando muestras de ADNs de plásmidos (plADNs) con el gen correspondiente. Para trazar cada curva estándar, se prepararon 7 muestras estándar. Una serie de diluciones: de 20 millones a 200 copias de plADN por reacción (el factor de dilución fue 1:10). Para cada muestra de prueba, el análisis se realizó en tres repeticiones técnicas e incluyó la realización de un control RT menos (para comprobar que no había contaminación de ADN en la muestra de ARN en estudio) y un control negativo. Los resultados de la determinación del nivel de expresión del ARNm se presentaron de la siguiente forma: el número de copias del ARNm del gen diana en la muestra normalizado al número de copias del ARNm del gen *GAPDH*.

Determinación del nivel de la proteína del factor de coagulación IX mediante ELISA

El contenido de la proteína del factor de coagulación IX de la sangre en el líquido de cultivo tras la transducción del HUH7 por los candidatos AAV5-FIX objetivo, así como el del plasma sanguíneo de los animales tras la introducción de los productos virales objetivo, se evaluó mediante

el método de sándwich de inmunoensayo enzimático en fase sólida (ELISA) no competitivo utilizando un kit comercial. Brevemente, las muestras de líquido de cultivo y plasma sanguíneo diluidas en un tampón de dilución se introdujeron en pocillos de placas de 96 pocillos sensibilizados con anticuerpos primarios específicos para el factor de coagulación IX. La misma placa se cargó con estándares para trazar una curva de calibración, controles positivos y negativos. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Los pocillos de la placa se lavaron con tampón de lavado antes de introducir los anticuerpos biotinilados, la solución de conjugado de estreptavidina peroxidasa y el TMB. Se introdujo una solución que contenía anticuerpos de detección biotinilados específicos del factor IX y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió al complejo resultante una solución de conjugado de peroxidasa de estreptavidina y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se introdujo una solución de TMB para visualizar la reacción enzimática. Una vez alcanzado el grado de intensidad de tinción requerido, se añadió una solución stop a todos los pocillos para detener la reacción. A continuación, se midió la densidad óptica de las soluciones en los pocillos de la placa. La concentración del factor de coagulación IX en las muestras de ensayo se determinó mediante la curva de calibración teniendo en cuenta la dilución preliminar de las muestras.

Determinación de la actividad de la proteína del factor de coagulación IX

El factor de coagulación IX es dependiente de la vitamina K, y la síntesis de la forma activa del factor IX por cultivo celular necesita la presencia de vitamina K en el medio de crecimiento. A este respecto, durante la transducción de HUH7, se añadió vitamina K1 a una concentración de 500 ng/ml a la composición del medio de crecimiento completo.

La actividad de la proteína del factor de coagulación IX en el líquido de cultivo tras la transducción de HUH7 con los productos objetivo se evaluó por el método cromogénico utilizando un kit comercial.

Brevemente, las muestras de fluido de cultivo, los estándares y las soluciones de control diluidas en tampón de reacción Tris-BSA se introdujeron en pocillos de placas de 96 pocillos. A continuación, se añadió el reactivo 1 (FX-FVIII). Tras una incubación de 2 minutos a una temperatura de 37 ^{0} C, se introdujo el reactivo 2 (agente activador). La placa se incubó durante 3 minutos a una temperatura de 37 ^{0} C. A continuación, se introdujo el reactivo 3 (sustrato cromogénico) en los pocillos de la placa, y ésta se incubó durante 2 minutos. A continuación, se añadió una solución de ácido acético al 20% para detener la reacción. El FXa resultante hidroliza el sustrato cromogénico, dando lugar a la liberación de paranitroanilina, cuya cantidad (detectada por la densidad óptica) es directamente proporcional a la concentración de factor IX (FIX) en la muestra.

Estudio *in vivo* en animales de laboratorio

Los experimentos se realizaron en ratones C57BL/6 (machos de 6 a 8 semanas de edad). Los productos se administraron a los animales mediante una única inyección intravenosa en la vena de la cola. En el grupo de control negativo se administró una solución tampón sin AAV. Se recogió plasma sanguíneo el día de la inyección antes de la administración de los productos, y luego en los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la administración de los productos.

Ejemplo 1. Modificación de la secuencia del gen FIX mediante un algoritmo de optimización de codones

El producto que hemos desarrollado es una suspensión de cápsides recombinantes modificadas del virus adenoasociado del serotipo 5 (AAV5) que lleva un casete de expresión que codifica el gen del factor IX de coagulación humano (hFIX) bajo el control del promotor de la transtiretina (TTR) específico del tejido hepático.

El ácido nucleico de tipo salvaje empleado fue un ácido nucleico que codifica el factor IX de coagulación humano de tipo salvaje con la mutación R338L de origen natural (conocida como mutación de Padua), e incluye la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17. El ácido nucleico de tipo salvaje dado se utiliza como control.

Además, para aumentar la eficacia de la expresión, se modificó la secuencia natural del gen del factor de coagulación IX mediante un algoritmo de optimización de codones.

La optimización de codones del ácido nucleico de tipo salvaje del factor de coagulación IX que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17 dio como resultado la producción de una serie de ácidos nucleicos optimizados por codones que se sometieron a pruebas adicionales para determinar el nivel de expresión y actividad de la proteína del factor de coagulación IX, en comparación con los del control (ácido nucleico de tipo salvaje que tiene la SEQ ID NO: 17), dentro del producto basado en AAV5.

Todos los ácidos nucleicos optimizados por codón mostraron un mayor nivel de producción de la proteína del factor de coagulación IX en comparación con el tipo salvaje; además, la mayoría de los ácidos nucleicos optimizados por codón mostraron un nivel ligeramente mayor de producción de la proteína del factor de coagulación IX en comparación con el tipo salvaje, y sólo dos variantes optimizadas por codón del ácido nucleico según la invención que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 (hFIXco-v1) y SEQ ID NO: 4 (hFIXco-v2) mostraron sorprendentemente los mejores resultados, en particular, un mayor nivel de expresión del gen del factor de coagulación IX y un nivel de producción de la proteína del factor de coagulación IX varias veces mayor, lo que, a su vez, dio lugar a una mayor actividad del producto basado en AAV5

que comprendía SEQ ID NO: 2 (hFIXco-v1) o SEQ ID NO: 4 (hFIXco-v2) (véanse los Ejemplos 2, 3 y 4).

Los ácidos nucleicos optimizados para el codón que tienen las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 tienen un mayor índice de adaptación al codón (una medida estándar para evaluar una secuencia para las frecuencias de uso del codón) para las células de mamíferos en comparación con la del ácido nucleico de tipo salvaje que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17.

Los ácidos nucleicos optimizados para el codón que tienen las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 se denominan en los ejemplos siguientes hFIXco-v1 y hFIXco-v2, respectivamente.

Ejemplo 2. Ensamblaje de una construcción genética que comprende un casete de expresión AAV que tiene variantes del gen del factor de coagulación IX recombinante optimizado por codones (hFIXco-v1 y hFIXco-v2).

Los plásmidos objetivo pAAV-hFIXco-v1 o pAAV-hFIXco-v2 (Fig. 1) destinados a producir los vectores virales AAV5 con un casete de expresión que comprende una variante optimizada en cuanto al codón del gen del factor de coagulación IX (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4) se produjeron sustituyendo sucesivamente la secuencia de la proteína verde fluorescente modificada y el promotor CMV en la construcción original pAAV-GFP mediante el método de clonación con enzimas de restricción ligasa, por la secuencia optimizada en codones del gen del factor de coagulación IX y el promotor TTR, respectivamente, que se sintetizaron *de novo* a partir de oligonucleótidos generados por síntesis química.

El vector final contiene todos los elementos necesarios para la expresión y el ensamblaje del gen en el genoma recombinante del AAV:

1) Las ITR en los extremos de la secuencia que se encapsula en una cápside viral;

2) elementos para la expresión del gen diana (promotor, potenciador, intrón, secuencia de Kozak, transgén, sitio de poliadenilación);

3) el origen de replicación bacteriano y el gen de resistencia a los antibióticos para producir ADN plasmídico en las células bacterianas.

Ejemplo 3. Creación de productos virales que expresan el factor de coagulación IX

Los plásmidos objetivo pAAV-hFIXco-v1 y pAAV-hFIXco-v2 (Fig. 1), junto con los demás plásmidos necesarios para producir las partículas virales AAV recombinantes (véase más arriba), se utilizaron para producir los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 con las versiones optimizadas en cuanto a codones del gen del factor de coagulación IX *(hFIXco y hFIXco*

v1-v2, respectivamente). El bioprocesamiento dio como resultado partículas virales recombinantes AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 que comprenden casetes de expresión con variantes optimizadas de codones del gen del factor de coagulación IX *(hFIXco-v1 y hFIXco-v2*). Los productos purificados AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 utilizados para los estudios *in vitro* e *in vivo* se prepararon utilizando tampones y excipientes estándar que son seguros y no alteran las propiedades del AAV. El producto AAV5-hFIX-wt que comprende un casete de expresión con el gen natural del factor de coagulación IX (el gen de tipo salvaje que incluye la mutación natural R338L, véase el Ejemplo 1) se produjo además utilizando la tecnología anterior para servir como producto de referencia.

Ejemplo 4. Pruebas de rendimiento *in vitro* de los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2

Antes de los ensayos con animales, los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 purificados se probaron in *vitro.* Los experimentos se realizaron utilizando la línea celular adherente HUH7 (Fig. 2, 3 y 4). Las células de la línea celular se sembraron en los pocillos de placas de 12 pocillos a una densidad de 10.000 células/cm^2. Después de fijar las células al sustrato adhesivo, se introdujeron preparaciones de AAV a una MOI de 500.000 vg/célula. El día 7 después de la transducción, se determinó el contenido y la actividad de la proteína FIX en el líquido de cultivo mediante ELISA, y el nivel de expresión del gen del factor de coagulación IX en las células se determinó mediante PCR cuantitativa de transcripción inversa, como se ha descrito anteriormente. Todas las muestras se realizaron por triplicado. Se utilizaron células intactas como control negativo.

Se ha demostrado que los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 que hemos desarrollado, que llevan versiones optimizadas en cuanto al codón del gen del factor de coagulación IX *(hFIXco-v1 y hFIXco-v2*), permiten una entrega eficiente del transgén del factor de coagulación IX en las células y garantizan la producción de la proteína objetivo, hechos confirmados por los datos de la PCR cuantitativa en tiempo real, el ELISA y el análisis de la actividad de la proteína del factor de coagulación IX de la sangre (Fig. 2, 3 y 4). A este respecto, cuando se utilizan los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 que comprenden una secuencia optimizada de codones del gen del factor de coagulación IX, el nivel de expresión del gen del factor de coagulación IX es 1,8 veces mayor para el producto AAV5-hFIXco-v1 y 2,8 veces mayor para el producto AAV5-hFIXco-v2 en comparación con el uso de un producto que tiene la versión natural del gen del factor de coagulación IX (AAV5-hFIX-wt) (Fig. 2). Además, cuando se utilizan los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 que comprenden una secuencia optimizada de codones del gen del factor de coagulación IX, el nivel de producción de

la proteína del factor de coagulación IX es 1,6 veces mayor para el producto AAV5-hFIXco-v1 y 2,1 veces mayor para el producto AAV5-hFIXco-v2 en comparación con el uso de un producto que tiene la versión natural del gen del factor de coagulación IX (AAV5-hFIX-wt) (Fig. 3). También hay que señalar que, cuando se utilizan los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 que comprenden una secuencia optimizada de codones del gen del factor de coagulación IX, el nivel de actividad de la proteína del factor de coagulación IX es 2,1 veces mayor para el producto AAV5-hFIXco-v1 y 2,9 veces mayor para el producto AAV5-hFIXco-v2 en comparación con el uso de un producto que tiene la versión natural del gen del factor de coagulación IX (AAV5-hFIX-wt) (Fig. 4).

Ejemplo 5. Prueba del rendimiento *in vivo* de los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2

En los estudios *in vivo* de los productos AAV5-hFIXco-v1 y AAV5-hFIXco-v2 se utilizaron ratones de laboratorio de la línea C57BL/6. La dosis del producto AAV utilizada en el estudio fue de $4x10^{11}$ VG/ratón. Se utilizó una solución de control sin AAV como control negativo. Los productos se administraron a los animales mediante una única inyección intravenosa en la vena de la cola. Se recogió plasma sanguíneo el día de la inyección antes de la administración de los productos, y luego en los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 después de la administración de los productos. El nivel de la proteína del factor de coagulación IX en las muestras de plasma sanguíneo se determinó mediante ELISA, como se ha descrito anteriormente.

Los estudios *in vivo* han demostrado que el uso del producto AAV5-hFIXco-v1 que comprende una secuencia optimizada de codones del gen del factor de coagulación IX hFIXco-v1 muestra un nivel significativamente mayor de proteína del factor de coagulación IX en la sangre de los animales (de 2,2 a 2,3 veces mayor) en los días 21 y 28 siguientes a la administración del producto, en comparación con el uso del producto que tiene la versión natural del gen del factor de coagulación IX (AAV5-hFIX-wt) (Fig 4A). Con el uso del producto AAV5-hFIXco-v2 que comprende una secuencia optimizada de codones del gen del factor de coagulación IX hFIXco-v2, se observa un nivel significativamente mayor de la proteína del factor de coagulación IX en la sangre de los animales (de 1,8 a 2,5 veces mayor) en los días 14, 21, 28, 35 y 42 después de la administración del producto, en comparación con el uso del producto que tiene la versión natural del gen del factor de coagulación FIX (AAV5-hFIX-wt) (Fig 5).

Por lo tanto, los virus recombinantes basados en AAV5 que hemos desarrollado, que llevan versiones optimizadas de codones del gen del factor de coagulación IX (AAV5-hFIXco-v1 o AAV5-hFIXco-v2), tienen una ventaja sobre el vector AAV5 que tiene una versión natural del gen del factor de coagulación IX y tienen potencial para la terapia génica de la hemofilia B.

Reivindicaciones

1. Un ácido nucleico aislado optimizado en codones que codifica la proteína FIX (factor de coagulación IX) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, que incluye una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que comprende: SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

2. Un casete de expresión que incluye el ácido nucleico optimizado para el codón según la reivindicación 1.

3. El casete de expresión según la reivindicación 2, que comprende los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

Promotor de la TTR (promotor de la transtiretina);

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado por codones según la reivindicación 1;

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

4. El casete de expresión como se reivindica en la reivindicación 3, que incluye una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que comprende: SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

5. Un vector de expresión que incluye el ácido nucleico optimizado por codones según la reivindicación 1 o el casete de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.

6. Un virus recombinante aislado basado en el AAV5 (virus adenoasociado de serotipo 5) para aumentar la expresión del gen FIX en las células diana, que incluye el ácido nucleico optimizado para el codón según la reivindicación 1 o el casete de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.

7. El virus recombinante basado en AAV5 según la reivindicación 6, en el que la cápside incluye la proteína AAV5 VP1.

8. El virus recombinante basado en AAV5 según la reivindicación 7, en el que la cápside incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

9. El virus recombinante basado en AAV5 según la reivindicación 7, en el que la cápside incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales.

10. El virus recombinante basado en AAV5 según la reivindicación 9, en el que la cápside incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

11. El virus recombinante basado en AAV5 según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la cápside incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, y el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);

un promotor de la TTR;

un intrón del gen hBG1 (un fragmento con intrón del gen de la β-globina humana);

el ácido nucleico optimizado por codones según la reivindicación 1;

una señal de poliadenilación hGH1 (señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana);

una ITR derecha (segunda).

12. El virus recombinante basado en AAV5 según la reivindicación 11, en el que la cápside incluye la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales, y el casete de expresión comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.

13. El virus recombinante basado en AAV5 como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que la proteína AAV5 VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 con una o más mutaciones puntuales es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

14. Una composición farmacéutica para suministrar el gen FIX a las células diana, que comprende el virus recombinante basado en AAV5 como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15. Uso del virus recombinante basado en AAV5 como se reivindica en las reivindicaciones 6 a 13 o de la composición como se reivindica en la reivindicación 14 para suministrar el gen FIX a las células diana.

16. Uso del virus recombinante basado en AAV5 como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 o la composición según la reivindicación 14 para proporcionar la proteína FIX a un sujeto que tiene hemofilia B y/o que no tiene copias totalmente funcionales del gen FIX.

17. Uso del virus recombinante basado en AAV5 como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 o la composición como se reivindica en la reivindicación 14 para tratar la hemofilia B en un sujeto que tiene hemofilia B.

18. Un método para proporcionar la proteína FIX a un sujeto que tiene hemofilia B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del virus recombinante basado en

AAV5 como se reivindica en las reivindicaciones 6 a 13 o la composición como se reivindica en la reivindicación 14 en las células del sujeto que lo necesita.

19. Un método para administrar el gen FIX a las células diana de un sujeto que tiene hemofilia B, que comprende administrar el virus recombinante basado en AAV5 como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 o la composición como se reivindica en la reivindicación 14 en las células del sujeto.

20. Un método para tratar la hemofilia B en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del virus recombinante basado en AAV5 como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 o la composición como se reivindica en la reivindicación 14 en un sujeto que tiene hemofilia B.

Resumen

La presente solicitud está relacionada con los campos de la genética, la terapia génica y la biología molecular. Más específicamente, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado optimizado en codones que codifica la proteína FIX (factor de coagulación IX), un casete de expresión y un vector basado en el mismo, así como un virus recombinante basado en el AAV5 (virus adenoasociado de serotipo 5) para aumentar la expresión del gen FIX en las células diana, y su uso.