

TERAPIA GÉNICA CON FRATAXINA

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó de forma electrónica en formato XML y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia XML, creada el 9 de septiembre de 2022, lleva el nombre 51037-060WO4_Sequence_Listing_9_8_22_ST26.XML y tiene un tamaño de 23,124 bytes.

Campo de la invención

La invención se relaciona con el campo de la biotecnología de ácidos nucleicos y proporciona, por ejemplo, composiciones y métodos para la producción de ácidos nucleicos con codones optimizados para mejorar la expresión génica en una célula o tejido diana.

Antecedentes de la invención

La ataxia de Friedreich es el trastorno del movimiento hereditario autosómico recesivo más común, con 6.000 estadounidenses diagnosticados con esta enfermedad y una prevalencia de aproximadamente 15.000 a 20.000 pacientes diagnosticados en todo el mundo. Las manifestaciones clínicas de la ataxia de Friedreich son el resultado de la deficiencia de la proteína frataxina, y el 95 % de los casos resultan de mutaciones que causan una expansión repetida de GAA. La frataxina es una proteína mitocondrial fijadora de hierro que se expresa de forma ubicua y es fundamental para el funcionamiento del corazón, el cerebelo y la médula espinal, incluidas las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal. El fenotipo de la ataxia de Friedreich incluye degeneración y desmielinización de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal espinocerebelosa, lo que lleva a debilidad progresiva, espasticidad y pérdida sensorial; y la mayoría de los pacientes de Friedreich están en silla de ruedas a la edad de 20 años (Dun y Brice, *Curr Opin Neurol* (2000) 13:407-413). Además, la mayoría de los pacientes con ataxia de Friedreich desarrollan anomalías cardíacas (p. ej., hipertrofia ventricular izquierda), lo que provoca la muerte por insuficiencia cardíaca alrededor de los 30 a 40 años en el 60 % de los pacientes. El desarrollo de terapias génicas para el tratamiento de la ataxia de Friedreich se ha visto obstaculizado por la dificultad asociada con lograr la expresión de cantidades terapéuticamente efectivas de frataxina en los tejidos afectados, y actualmente no existen tratamientos modificadores de la enfermedad aprobados. Sigue existiendo la necesidad de un conjunto de composiciones y métodos que aborden estos obstáculos.

Compendio de la invención

La presente divulgación proporciona composiciones y métodos que pueden usarse para tratar la ataxia de Friederich. Usando las composiciones y métodos de la divulgación, a un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero, tal como un paciente humano) que tiene ataxia de Friederich se le puede administrar un plásmido (por ejemplo, un vector viral) que contiene un gen de frataxina humana (hFXN) o un equivalente de ARN del mismo.

En un aspecto, la divulgación proporciona un polinucleótido de ADN que codifica hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, en donde el polinucleótido tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 95 % (p. ej., 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %) idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector que incluye la composición del aspecto anterior, en donde el vector es un plásmido, un vector de ADN, un vector de ARN, un virión o un vector viral. Por ejemplo, en algunas modalidades, el vector es un vector viral. En algunas modalidades, el vector viral es

un virus adenoasociado (AAV).

En algunas modalidades del aspecto anterior, el polinucleótido está unido operativamente a un promotor específico de músculo, opcionalmente en donde el promotor está posicionado en 5' con respecto al polinucleótido.

- 5 En algunas modalidades, el vector incluye además un sitio de poliadenilación (pA), opcionalmente en donde el pA está posicionado en 3' con respecto al polinucleótido.

En algunas modalidades, el vector incluye además un intrón, opcionalmente en donde el intrón está colocado en 3' con respecto al promotor y en 5' con respecto al polinucleótido.

- 10 En algunas modalidades, el AAV comprende además dos repeticiones terminales invertidas (ITR), en donde las dos ITR comprenden una primera ITR (ITR1) y una segunda ITR (ITR2), en donde ITR1 está posicionada en 5' con respecto al polinucleótido e ITR2 está posicionada 3' con respecto al polinucleótido para formar un casete que comprende la estructura ITR1-hFXN-ITR2.

- 15 En algunas modalidades, la longitud del ácido nucleico entre ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb (por ejemplo, de aproximadamente 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb o de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb). Por ejemplo, en algunas modalidades, la longitud del ácido nucleico entre ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb. En algunas modalidades, la longitud del ácido nucleico entre ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb. En algunas modalidades, la longitud del ácido nucleico entre ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,0 Kb.

- 20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un plásmido que codifica el vector viral del aspecto anterior. En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que incluye: una ITR1; un hFXN o un equivalente de ARN del mismo; y una ITR2; en donde los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección 5' a 3' como: ITR1-hFXN-ITR2; y en donde la longitud del ácido nucleico entre ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb (por ejemplo, aproximadamente 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb o aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb). Por ejemplo, en algunas modalidades, la longitud del ácido nucleico entre ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb. En algunas modalidades, la longitud del ácido nucleico entre ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb. En algunas modalidades, la longitud del ácido nucleico entre ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,0 Kb.

- 30 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,7 Kb (por ejemplo, aproximadamente 4,0 Kb a aproximadamente 4,6 Kb, aproximadamente 4,1 Kb a aproximadamente 4,5 Kb, aproximadamente 4,2 Kb a aproximadamente 4,4 Kb, o aproximadamente 4,3 Kb). Por ejemplo, en algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre ITR1 e ITR2 inclusive es de aproximadamente 4,0 Kb a aproximadamente 4,6 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,1 Kb a aproximadamente 4,5 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,2 Kb a aproximadamente 4,4 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,3 Kb.

- 40 En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico incluye, además: un promotor eucariótico (P_{Euk}), en donde los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección 5' a 3' como: ITR1-P_{Euk}-

hFXN-ITR2.

En algunas modalidades, el P_{Euk} es un promotor específico de músculo.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el promotor específico de músculo es un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK), un promotor de desmina, un promotor de creatina quinasa muscular, un promotor de cadena ligera de miosina, un promotor de cadena pesada de miosina, un promotor de troponina C cardíaca, un promotor de troponina I, un promotor de la familia de genes *myoD*, un promotor de actina alfa, un promotor de actina beta, un promotor de actina gamma o un promotor dentro del intrón 1 del homeodominio 3 similar al par ocular, un promotor de citomegalovirus o un promotor de β -actina de pollo. Por ejemplo, en algunas modalidades, el promotor específico de músculo es un promotor PGK.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 85 % (p. ej., 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica al ácido nucleico de secuencia de SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, en algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 90 % idéntica al ácido nucleico de secuencia de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2, opcionalmente en donde el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene un ácido nucleico de SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico incluye, además: un pA, en donde los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección 5' a 3' como: ITR1- P_{Euk} -*hFXN*-pA-ITR2.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el sitio pA incluye el sitio de poliadenilación tardía del virus simio 40 (SV40), el sitio de poliadenilación temprana de SV40, el sitio de poliadenilación de β -globina humana o el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

Por ejemplo, en algunas modalidades, el sitio pA incluye el sitio de poliadenilación tardía de SV40.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico incluye, además: un intrón, en donde los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección 5' a 3' como: ITR1- P_{Euk} -intrón-*hFXN*-pA-ITR2.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el intrón es un intrón SV40.

En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 85 % (por ejemplo, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, en algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, opcionalmente en donde el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 85 % (p. ej., 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de ácidos

nucleicos de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 86 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 87 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 88 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 89 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 92 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 93 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 94 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 97 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 98 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 99 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector que incluye la composición o la molécula de ácido nucleico de cualquiera de los aspectos anteriores, en donde el vector es un plásmido, un vector de ADN, un vector de ARN, un virión o un vector viral. Por ejemplo, en algunas modalidades, el vector es un vector viral.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un AAV, un adenovirus, un lentivirus, un retrovirus, un poxvirus, un baculovirus, un virus del herpes simple, un virus vaccinia y un virus sintético. Por ejemplo, en algunas modalidades, el vector viral es un AAV. En algunas modalidades, el AAV es un serotipo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10 o AAVrh74. En algunas modalidades, el vector viral es un AAV pseudotipado. En algunas modalidades, el AAV pseudotipado es AAV2/8 o AAV2/9, opcionalmente en donde el AAV pseudotipado es AAV2/8.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, ITR1 y/o ITR2 es una ITR parvoviral.

Por ejemplo, en algunas modalidades, la ITR parvoviral es una ITR de AAV. En algunas modalidades, la ITR de AAV es una ITR de AAV de serotipo 2.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el AAV incluye una proteína de la cápside recombinante.

- 5 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el vector tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 85 % (p. ej., 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. Por ejemplo, en algunas modalidades, el vector tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el vector tiene
- 10 una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4 opcionalmente en donde el vector tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el vector tiene un ácido nucleico de SEQ ID NO: 4.

- 15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un plásmido que codifica el vector viral de cualquiera de los aspectos anteriores.

- En algunas modalidades del aspecto anterior, el plásmido incluye además uno o más espaciadores (SS), en donde uno o más SS están colocados en 5' con respecto a ITR1 y/o 3' con respecto a ITR2. Por ejemplo, en algunas modalidades, el plásmido incluye dos SS, en donde los dos SS incluyen un primer espaciador (SS1) y un segundo espaciador (SS2), en donde SS1 está ubicado en 5' con respecto a ITR1 y el SS2 está
- 20 ubicado en 3' con respecto a ITR2.

En algunas modalidades, uno o más SS no incluyen un marco de lectura abierto que tenga más de 100 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, uno o más SS no incluyen sitios de unión de factores de transcripción procariotas.

- 25 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, SS1 tiene una longitud de aproximadamente 1,0 Kb a aproximadamente 5,0 Kb (por ejemplo, de 1,5 Kb a aproximadamente 4,5 Kb, de aproximadamente 2,0 Kb a aproximadamente 4,0 Kb o aproximadamente 3,0 Kb). Por ejemplo, en algunas modalidades, SS1 tiene una longitud de aproximadamente 2,0 Kb a aproximadamente 5,0 Kb.

- En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, SS2 tiene una longitud de aproximadamente 1,0 Kb a aproximadamente 5,0 Kb (p. ej., 1,5 Kb a aproximadamente 4,5 Kb, aproximadamente 2,0 Kb a aproximadamente 4,0 Kb, o aproximadamente 3,0 Kb). Por ejemplo, en
- 30 algunas modalidades, SS2 tiene una longitud de aproximadamente 2,0 Kb a aproximadamente 5,0 Kb.

- En algunas modalidades, el plásmido incluye además un promotor procariota unido operativamente a un gen marcador seleccionable colocado en 5' con respecto a uno o más SS colocados en 5' con respecto a ITR1 o colocados en 3' con respecto a uno o más SS colocados en 3' con respecto a ITR2. Por ejemplo,
- 35 en algunas modalidades, el gen marcador seleccionable es un gen de resistencia a antibióticos.

En algunas modalidades, el plásmido incluye además un origen de replicación procariota colocado en 5' con respecto a uno o más SS colocados en 5' con respecto a ITR1 y/o colocado en 3' con respecto a uno o más SS colocados en 3' con respecto a ITR2.

- 40 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que incluye la composición, la molécula de ácido nucleico, el vector o el plásmido de cualquiera de los aspectos anteriores y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar la Ataxia de Friedreich en un paciente humano que lo necesita, donde el método incluye administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, la molécula de ácido nucleico, el vector, el plásmido o la composición farmacéutica de cualquiera de los aspectos anteriores.

- 5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para aumentar la expresión de frataxina en un paciente humano al que se le diagnostica ataxia de Friedreich, donde el método incluye administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición, la molécula de ácido nucleico, el vector, el plásmido o la composición farmacéutica de cualquiera de los aspectos anteriores.

En algunas modalidades, el paciente tiene entre 3 y 17 años (p. ej., entre 4 y 16 años, entre 5 y 15 años, entre 6 y 14 años, entre 7 y 13 años, entre 8 y 12 años, entre 9 y 11 años, o 10 años) de edad.

En algunas modalidades, al administrar la composición, la molécula de ácido nucleico, el vector, el plásmido o la composición farmacéutica de cualquiera de los aspectos anteriores al paciente, el paciente muestra un cambio en los niveles de frataxina en sangre total, opcionalmente en donde el paciente muestra el cambio en los niveles de frataxina en sangre total aproximadamente 12 semanas después de la administración.

En algunas modalidades, al administrar la composición, la molécula de ácido nucleico, el vector, el plásmido o la composición farmacéutica de cualquiera de los aspectos anteriores al paciente, el paciente muestra una reducción en la puntuación total de la escala de calificación de ataxia de Friedreich (FARS), opcionalmente en donde el paciente muestra la reducción en la puntuación total FARS aproximadamente 12 semanas después de la administración.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit que incluye la composición, la molécula de ácido nucleico, el vector, el plásmido o la composición farmacéutica de cualquiera de los aspectos anteriores; y un prospecto, en donde el prospecto indica a un usuario del kit que administre la composición o el vector a un paciente humano diagnosticado con Ataxia de Friedreich.

25 Breve descripción de los dibujos

La **FIGURA 1** es un esquema que representa la probabilidad de variaciones de ácido nucleico en las posiciones de los residuos 1-270, respectivamente, del gen que codifica la variante 1 de la frataxina humana (*FXN*) (*H.FXN.WT*). Utilizando las herramientas de optimización de codones Integrated DNA Technologies (IDT) y GENEWIZ (GeneWiz), se compararon las optimizaciones de residuos entre bases de datos y posiciones de residuos. Si bien los residuos 1-270 se representan en este documento, la optimización por codones se realizó en todos los residuos del gen de la variante 1 de *FXN* humano, incluidos los residuos 1-633. La secuencia en la parte superior indica el ácido nucleico más frecuente en la posición del residuo respectivo en todos los conjuntos de datos. Las flechas indican un residuo elegido para la modificación en una construcción de la variante 1 de *FXN* humano optimizado por codones (abreviada indistintamente como *H.FXN.ATX.Co* o *hFXNco*). Por ejemplo, el residuo 12 indica que la citosina en estado natural (C) se cambió a guanina (G).

La **FIGURA 2** es un mapa de un vector viral pseudotipado de virus adenoasociado (AAV) 2/8 (AAV2/8) ilustrativo para la expresión de un gen de la variante 1 de *FXN* humano optimizado por codones (*hFXNco*). De izquierda a derecha, las flechas sombreadas representan un plásmido que contiene una molécula de ácido nucleico que incluye de 5' a 3' un primer espaciador, una primera repetición terminal invertida (ITR1), un promotor de fosfoglicerato quinasa humana (hPGK), un *hFXNco*, un sitio de poliadenilación

tardía del virus del simio 40 (SV40) (SV4 LpA), una segunda ITR (ITR2), un origen de replicación procariota (ori) y un gen de selección de kanamicina (kan), en donde la longitud entre ITR1 y ITR2, incluida la carga útil (por ejemplo, hPGK y hFXNco), tiene aproximadamente 4,3 Kb de longitud.

Las **FIGURAS 3A y 3B** son fotografías y un gráfico, respectivamente, que muestran un ensayo de potencia basado en expresión de inmunofluorescencia antifraxina. La **FIGURA 3A** es un conjunto de fotografías de células derivadas de músculo esquelético murino (C2C12) teñidas para fraxina después de su transducción con 1×10^7 (1e7) de genoma viral (vg)/célula de un vector viral AAV2/8 para la expresión de hFXNco. La **FIGURA 3B** es un gráfico que representa la inmunofluorescencia de fraxina descrita en la FIGURA 3A en función de la multiplicidad de infección (MOI), normalizada con respecto a la intensidad de una contratinción de Hoechst.

La **FIGURA 4** es una inmunotransferencia que muestra la expresión de isoformas intermedias y maduras de fraxina en células C2C12 transducidas con un vector viral AAV2/8 ilustrativo para la expresión de hFXNco, como se describe en las FIGURAS 1 y 2, en una cantidad de 1×10^6 (1e6) vg/célula o 1×10^7 (1e7) vg/célula, respectivamente.

La **FIGURA 5** es un gráfico que representa la probabilidad de supervivencia de ratones knockout (KO) para FXN a lo largo del tiempo después de la administración intravenosa (i.v.) de un vector viral AAV2/8 ilustrativo para la expresión de un hFXNco impulsado por el promotor hPGK o variante 1 de FXN murino (mFXN) en una cantidad de 3×10^{13} (3e13) vg/kg o 1×10^{14} (1e14) vg/kg, en comparación con los controles no transducidos (vehículo en estado natural (WT) y Vehículo KO).

Las **FIGURAS 6A-E** muestran la supervivencia, el peso corporal y los parámetros cardíacos de ratones FXN KO después de la administración i.v. de un vector viral AAV2/8 ilustrativo para la expresión de un hFXNco (hFXN) o mFXN impulsado por el promotor hPGK en una cantidad de 3×10^{13} vg/kg o 1×10^{14} vg/kg, en comparación con los controles no transducidos (vehículo WT y vehículo FRDA). La **FIGURA 6A** es un gráfico que representa la probabilidad de supervivencia de ratones FXN KO a lo largo del tiempo.

Los datos de supervivencia se representan como la edad a la que se practicó la eutanasia a los ratones si los ratones mostraban una disminución de peso corporal superior al 20 %, signos de dificultad respiratoria, falta de respuesta a estímulos significativos y/o mala condición corporal general antes de la necropsia programada. La **FIGURA 6B** es un gráfico que representa el peso corporal de ratones FXN KO macho y hembra a lo largo del tiempo. La **FIGURA 6C** es un gráfico que muestra el peso del corazón de ratones FXN KO por masa ventricular izquierda normalizada con respecto al peso corporal en el momento del pretratamiento (seis semanas de edad), después del tratamiento (9-10 semanas de edad) y a lo largo de la vida (18-19 semanas de edad). La **FIGURA 6D** es un gráfico que muestra la fracción de eyección de ratones FXN KO en el momento del pretratamiento (seis semanas de edad), después del tratamiento (9-10 semanas de edad) y a lo largo de la vida (18-19 semanas de edad). La **FIGURA 6E** es un gráfico que muestra la cadena ligera 3 de miosina, un marcador de daño miocárdico, de ratones FXN KO en el momento del pretratamiento (seis semanas de edad), después del tratamiento (9-10 semanas de edad), y a lo largo de la vida (18-19 semanas de edad).

Las **FIGURAS 7A y 7B** son un conjunto de gráficos que muestran la expresión de fraxina en el corazón en ratones FXN KO después de la administración i.v. de un vector viral AAV2/8 ilustrativo para la expresión de hFXNco o mFXN en una cantidad de 3×10^{13} vg/kg o 1×10^{14} vg/kg, en comparación con los controles no transducidos (Vehículo WT y Vehículo KO). La **FIGURA 7A** es un gráfico que

representa la expresión de frataxina dependiente de la dosis en el corazón como una función del número de copias del vector (VCN) por decigramo (DG), mientras que la **FIGURA 7B** representa la expresión de frataxina como nanogramos (ng) de proteína por mg de tejido cardíaco biopsiado de la muestra.

La **FIGURA 8** es un gráfico que muestra el nivel de proteína frataxina en tejido cardíaco, medido mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), a las 4 semanas (**FIGURA 8A**) y 12 semanas (**FIGURA 8B**) después de la administración de un vector viral AAV2/8 ilustrativo para la expresión de *hFXNco* o *mFXN* en una cantidad de 3×10^{13} vg/kg o 1×10^{14} vg/kg, en comparación con controles no transducidos (vehículo WT y vehículo FRDA).

Las **FIGURAS 9A y 9B** son gráficos que muestran el número de copias de vector por genoma diploide detectado en el tejido cardíaco, medido por qPCR, a las 4 y 12 semanas después de la administración de un vector viral AAV2/8 ilustrativo para la expresión de *hFXNco* o *mFXN* en una cantidad de 3×10^{13} vg/kg o 1×10^{14} vg/kg, en comparación con los controles no transducidos (vehículo WT y vehículo FRDA).

La **FIGURA 10A** es inmunohistoquímica de la expresión de frataxina en tejido cardíaco. La **FIGURA 10B** es un gráfico que muestra el porcentaje de células que exhiben expresión de frataxina débil, moderada o fuerte cuatro semanas después de la administración de un vector viral AAV2/8 ilustrativo para la expresión de *hFXNco* o *mFXN* en una cantidad de 3×10^{13} vg/kg o 1×10^{14} vg/kg.

Las **FIGURAS 11A y 11B** son fotografías de células teñidas para frataxina después de su transducción con 1×10^7 (1e7) de genoma viral (vg)/célula de la Versión 2 de un vector viral AAV2/8 para la expresión de *hFXNco* (AAV2/8-PGK-*FXN* V2) en comparación con controles no transducidos (control de vehículo) y gráficos que representan la inmunofluorescencia de frataxina descrita como una función de la multiplicidad de infección (MOI), normalizada con respecto a la intensidad de una contratinción de Hoechst, para músculo esquelético de ratón (**FIGURA 11A**) y músculo esquelético humano (**FIGURA 11B**).

La **FIGURA 12** es una comparación de AAV2/8-PGK-*FXN* Versión 1 (V1) y Versión 2 (V2). La **FIGURA 12A** es una colección de fotografías de células de músculo esquelético de ratón (C2C12) teñidas para frataxina después de su transducción con 1×10^7 (1e7) de genoma viral (vg)/célula de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en comparación con controles no transducidos (control de vehículo). La **FIGURA 12B** es un gráfico que representa la inmunofluorescencia de frataxina descrita como una función de la multiplicidad de infección (MOI), normalizada con respecto a la intensidad de una contratinción de Hoechst, para AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2. La **FIGURA 12C** es una inmunotransferencia que muestra la expresión de isoformas maduras de frataxina en células C2C12 transducidas con AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en una cantidad de 1×10^6 (1e6) vg/célula o 1×10^7 (1e7) vg/célula.

La **FIGURA 13** es una colección de gráficos que representan la inmunofluorescencia de frataxina descrita como una función de la multiplicidad de infección (MOI), normalizada con respecto a la intensidad de una contratinción de Hoechst, para la versión 2 de un vector viral AAV2/8 para la expresión de *FXN* (AAV2/8-PGK-*FXN* V2), que expresa *FXN* en estado natural (WT) o *FXN* con codones optimizados (CO).

La **FIGURA 13A** corresponde a células de músculo esquelético de ratón (C2C12) transducidas y la **FIGURA 13B** corresponde a células humanas transducidas.

La **FIGURA 14** es un gráfico que representa la supervivencia de ratones *FXN* KO a lo largo del tiempo después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* versión 1 (V1) o versión 2 (V2) en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (Vehículo

WT y Vehículo mutante). Los datos de supervivencia se representan como la edad a la que se practicó la eutanasia a los ratones si los ratones mostraban cualquiera de las siguientes condiciones: una disminución de peso corporal >20 %, signos de dificultad respiratoria, falta de respuesta a estímulos significativos y/o mala condición corporal general antes de la necropsia programada.

5 La **FIGURA 15** es una colección de gráficos que muestran la fracción de eyección del corazón para ratones *FXN* KO después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (Vehículo WT y Vehículo mutante), a las 5 semanas de edad (WOA), 9-10 WOA y 18-19 WOA.

10 La **FIGURA 16** es una colección de gráficos que muestran el porcentaje del acortamiento fraccional del corazón para ratones *FXN* KO después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (Vehículo WT y Vehículo mutante), a las 5 semanas de edad (WOA), 9-10 WOA y 18-19 WOA.

15 La **FIGURA 17** es una colección de gráficos que muestran la masa ventricular izquierda del corazón para ratones *FXN* KO después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (Vehículo WT y Vehículo mutante), a las 5 semanas de edad (WOA), 9-10 WOA y 18-19 WOA.

20 La **FIGURA 18** es una colección de gráficos que muestran la troponina cardíaca sérica para ratones *FXN* KO después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (Vehículo WT y Vehículo mutante), a las 9-10 semanas de edad (WOA) y 18-19 WOA.

La **FIGURA 19** es una colección de gráficos que muestran la cadena ligera de miosina sérica para ratones *FXN* KO después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (Vehículo WT y Vehículo mutante), a las 9-10 semanas de edad (WOA) y 18-19 WOA.

25 La **FIGURA 20** es una colección de gráficos que muestran la aspartato aminotransferasa sérica (AST) para ratones *FXN* KO después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (Vehículo WT y Vehículo mutante), a las 9-10 semanas de edad (WOA) y 18-19 WOA.

30 La **FIGURA 21** es una colección de gráficos que muestran la alanina aminotransferasa sérica (ALT) para ratones *FXN* KO después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (Vehículo WT y Vehículo mutante), a las 9-10 semanas de edad (WOA) y 18-19 WOA.

35 La **FIGURA 22** es una colección de gráficos que muestran el número de copias del vector (VCN) por decigramo (DG) de AAV2/8-PGK-*FXN* en el corazón y cuádriceps de ratones *FXN* KO a las 4 semanas y 12 semanas después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg).

40 La **FIGURA 23** es una colección de gráficos que comparan el número de copias del vector (VCN) por decigramo (DG) de AAV2/8-PGK-*FXN* en el corazón y cuádriceps de ratones *FXN* KO a las 4 semanas y 12 semanas después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg).

La **FIGURA 24** es una colección de gráficos que muestran el número de copias del vector (VCN) por

decigramo (DG) de AAV2/8-PGK-*FXN* en el hígado de ratones *FXN* KO a las 4 semanas y 12 semanas después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg).

La **FIGURA 25** es un gráfico que muestra el transcrito de ARNm de *FXN* como cuantificación relativa (RQ) de ARN en el corazón y cuádriceps (Quad) de ratones *FXN* KO después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg).

La **FIGURA 26** es un gráfico que muestra la expresión de la proteína *FXN* en el corazón de ratones *FXN* KO a las 4 semanas y 12 semanas después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 a dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con los controles no transducidos (vehículo WT y vehículo KO).

La **FIGURA 27** es un gráfico que muestra la expresión de proteína *FXN* en el hígado de ratones *FXN* KO a las 4 semanas y 12 semanas después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (vehículo WT y vehículo KO).

La **FIGURA 28** es un gráfico que muestra la expresión de proteína *FXN* en el cuádriceps de ratones *FXN* KO a las 4 semanas y 12 semanas después de la administración intravenosa de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/kilogramo (kg), en comparación con controles no transducidos (vehículo WT y Vehículo KO).

La **FIGURA 29** es un gráfico que representa el tiempo en segundos que tarda en caerse de un rotarod para ratones *FXN* KO después de la administración intracerebroventricular (ICV) de AAV8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/animal en comparación con controles no transducidos (vehículo control y vehículo mutante). Las mediciones se tomaron a las 6-8 semanas de edad (WOA), 11-12 WOA, 13-14 WOA y 16-18 WOA, con administración ICV a las 8 WOA.

La **FIGURA 30** es una colección de gráficos que muestran el número de copias del vector (VCN) por decigramo (DG) de AAV8-PGK-*FXN* en el momento de la necropsia en la médula espinal caudal, cerebelo, corteza, médula espinal rostral, nervio ciático, ganglio de la raíz dorsal caudal (DRG), la mitad del lóbulo hepático izquierdo, la mitad del corazón y el DRG rostral para ratones *FXN* KO después de la administración intracerebroventricular (ICV) de AAV8-PGK-*FXN* V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/animal. La administración ICV se realizó a las 8 semanas de edad.

La **FIGURA 31** es una colección de gráficos que muestran el número de copias del vector (VCN) por decigramo (DG) de AAV8-PGK-*FXN* en el momento de la necropsia en el cerebelo, la corteza, el corazón y el hígado para ratones *FXN* KO después de la inyección intracerebroventricular (ICV) o administración intraparenquimatosa (IPC) de AAV8-PGK-*FXN* V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/animal. Los animales recibieron la dosis a las 8 semanas de edad. Los tejidos de ratones tratados por ICV se analizaron entre 10 y 11 semanas después de la dosis y los tejidos de ratones tratados por IPC se analizaron 5 semanas después de la dosis.

La **FIGURA 32** es una colección de gráficos que muestran la proteína *FXN* en la corteza y el cerebelo en el momento de la necropsia para ratones en estado natural (WT), no transducidos (*FXN*^{PAV/null}) y *FXN* KO transducidos mediante administración intracerebroventricular (ICV) o intraparenquimatosa (IPC) de AAV8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/animal. Los animales recibieron la dosis a las 8 semanas de edad. Los tejidos de ratones tratados por ICV se analizaron a las 10 semanas

después de la dosis y los tejidos de ratones tratados por IPC se analizaron a las 5 semanas después de la dosis.

La **FIGURA 33** es un gráfico que muestra la proteína FXN por número de copias del vector (VCN) en la corteza, el cerebelo, el corazón y el hígado para ratones *FXN* KO después de la administración intracerebroventricular (ICV) o intraparenquimatoso (IPC) de AAV8-PGK-*FXN* V2. Los tejidos se analizaron 5 semanas después de la inyección (wpi). ICV se administró el día 2 posnatal (PND2).

La **FIGURA 34** es un gráfico que muestra la cadena ligera de neurofilamento (NFLC) en picogramos (pg) por mililitro (mL) para ratones *FXN* KO después de la administración de AAV8-PGK-*FXN* V1 o V2 en dosis variables de genoma viral (vg)/animal, como en comparación con los controles no transducidos (vehículo WT y vehículo KO).

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a un valor que está dentro del 10 % por encima o por debajo del valor que se describe.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "virus adenoasociado" (AAV) incluye, entre otros, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV tipo 12, AAV tipo 13, AAV de serpiente, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, AAV de cabra, AAV de camarón y cualquier otro AAV ahora conocido o descubierto posteriormente. Véase, por ejemplo, Fields et ál. *Virology*, 4^a ed. Editores Lippincott-Raven, Filadelfia, 1996. Recientemente se han identificado serotipos y clados de AAV adicionales. (Ver, por ejemplo, Gao et ál. *J. Virol.* 78:6381 (2004); Moris et ál. *Virol.* 33:375 (2004). Las secuencias genómicas de diversos serotipos de AAV, así como las secuencias de las ITR nativas, las proteínas Rep y las subunidades de la cápside se conocen en la técnica. Estas secuencias se pueden encontrar en la literatura o en bases de datos públicas como GenBank. Ver, por ejemplo, números de acceso de GenBank NC_002077, NC_001401, NC_001729, NC_001863, NC_001829, NC_001862, NC_000883, NC_001701, NC_001510, NC_006152, NC_006261, AF063497, U897 90, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, AY631966, AX753250, EU285562, NC_001358, NC_001540, AF513851, AF513852 y AY530579; cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia para enseñar secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de AAV. Véase también, por ejemplo, Bantel-Schaal et ál. *J. Virol.* 73:939 (1999); Chiorini et ál. *J. Virol.* 71:6823 (1997); Chiorini et ál. *J. Virol.* 73:1309 (1999); Gao et ál. *Proc. Nat. Acad. Sci. EUA* 99:11854 (2002); Moris et ál. *Virol.* 33:375 (2004); Muramatsu et ál. *Virol.* 221:208 (1996); Ruffing et ál. *J. Gen. Virol.* 75:3385 (1994); Rutledge et ál. *J. Virol.* 72:309 (1998); Schmidt et ál. *J. Virol.* 82:8911 (2008); Shade et ál. *J. Virol.* 58:921 (1986); Srivastava et ál. *J. Virol.* 45:555 (1983); Xiao et ál. *J. Virol.* 73:3994 (1999); WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y US 6,156,303; cuyas descripciones se incorporan a la presente como referencia para enseñar secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de AAV.

Una "proteína de la cápside" como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de las proteínas de la cápside de AAV que son componentes de partículas virales de AAV, incluidos AAV8 y AAV9.

Como se usa en el presente documento, el término "sitio de clonación" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un sitio de restricción para la clonación mediada por endonucleasas de restricción mediante ligación de un ácido nucleico que contiene extremos romos o cohesivos compatibles, sirviendo

una región de ácido nucleico como sitio de cebado para clonación mediada por PCR de ADN insertado mediante homología y "superposición de cosido de PCR" de extensión, o un sitio de recombinación para la inserción mediada por recombinasa de ácidos nucleicos diana mediante una reacción de recombinación-intercambio, o extremos de mosaico para la inserción mediada por transposones de ácidos nucleicos diana, así como otras técnicas comunes en la técnica.

El término "codón", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier grupo de tres bases de nucleótidos consecutivas en una determinada molécula de ARN mensajero, o cadena codificante de ADN, que especifica un aminoácido particular o una señal de inicio o parada para la traducción. El término codón también se refiere a tripletes de bases en una cadena de ADN.

Tal como se utiliza en la presente, la "optimización por codones" se refiere a un proceso de modificación de una secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con el principio de que la frecuencia de aparición de codones sinónimos (por ejemplo, codones que codifican para el mismo aminoácido) en la codificación de ADN está sesgada en diferentes especies. Esta degeneración de codones permite que un polipéptido idéntico sea codificado por una variedad de secuencias de nucleótidos. Las secuencias modificadas de esta manera se denominan en este documento "optimizadas por codones". Este proceso se puede realizar en cualquiera de las secuencias descritas en esta memoria descriptiva para mejorar la expresión o la estabilidad. La optimización por codones se puede realizar de una manera conocida en la técnica, tal como la descrita, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 7,561,972, 7,561,973, y 7,888,112, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Por ejemplo, la secuencia que rodea el sitio de inicio de la traducción se puede convertir en una secuencia Kozak consenso según métodos conocidos. Véase, por ejemplo, Kozak et ál, Nucleic Acids Res.15 (20): 8125-8148, incorporado en la presente como referencia en su totalidad. Se pueden incorporar múltiples codones de parada. Como se usan en el presente documento, los términos "gen de frataxina humana con codones optimizados" y "hFXNco" se refieren a un polinucleótido que presenta al menos un 95 % (p. ej., 95 %, 97 %, 98 % o 99 %) de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el hFXNco es idéntico a SEQ ID NO: 1.

A lo largo de esta memoria descriptiva y reivindicaciones, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero o grupo de enteros establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro entero o grupo de enteros.

Como se usan en el presente documento, los términos "mutación conservadora", "sustitución conservadora" y "sustitución de aminoácidos conservadora" se refieren a una sustitución de uno o más aminoácidos por uno o más aminoácidos diferentes que exhiben propiedades fisicoquímicas similares, como polaridad, carga electrostática y volumen estérico. Estas propiedades se resumen para cada uno de los veinte aminoácidos naturales en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: propiedades fisicoquímicas representativas de los aminoácidos naturales

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Polaridad de la cadena lateral	Carácter electrostático a pH fisiológico (7,4)	Volumen estérico [†]
Alanina	Ala	A	no polar	neutral	pequeño

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Polaridad de la cadena lateral	Carácter electrostático a pH fisiológico (7,4)	Volumen estérico [†]
Arginina	Arg	R	polar	catiónico	grande
Asparagina	Asn	N	polar	neutral	intermedio
Ácido aspártico	Asp	D	polar	aniónico	intermedio
Cisteína	Cis	C	no polar	neutral	intermedio
Ácido glutámico	Glu	E	polar	aniónico	intermedio
Glutamina	Gln	Q	polar	neutral	intermedio
Glicina	Gly	G	no polar	neutral	pequeño
Histidina	His	H	polar	Ambas formas neutra y catiónica en equilibrio a pH 7,4	grande
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutral	grande
Leucina	Leu	L	no polar	neutral	grande
Lisina	Lys	K	polar	catiónico	grande
Metionina	Met	M	no polar	neutral	grande
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutral	grande
Prolina	Pro	P	no polar	neutral	intermedio
Serina	Ser	S	polar	neutral	pequeño
Treonina	Thr	T	polar	neutral	intermedio
Triptófano	Trp	W	no polar	neutral	voluminoso
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutral	grande
Valina	Val	V	no polar	neutral	intermedio

[†]basado en el volumen en Å³: 50-100 es pequeño, 100-150 es intermedio, 150-200 es grande y >200 es voluminoso

De esta tabla se aprecia que las familias de aminoácidos conservadoras incluyen, por ejemplo, (i) G, A, V, L, I, P y M; (ii) D y E; (iii) C, S y T; (iv) H, K y R; (v) N y Q; y (vi) F, Y y W. Por lo tanto, una mutación o sustitución conservadora es aquella que sustituye un aminoácido por un miembro de la misma familia de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución de Ser por Thr o Lys por Arg).

5 Por "sitios CpG" se entiende regiones de ADN donde un nucleótido de citosina aparece junto a un nucleótido de guanina en la secuencia de nucleótidos de ácido nucleico lineal a lo largo de su longitud, por ejemplo, —C—fosfato—G—, citosina y guanina separadas sólo por un fosfato o una citosina en 5' del nucleótido de guanina.

Como se usa en el presente documento, el término "endógeno" describe una molécula (por ejemplo, un polipéptido, ácido nucleico o cofactor) que se encuentra naturalmente en un organismo particular (por ejemplo, un ser humano) o en una ubicación particular dentro de un organismo (por ejemplo, un órgano, tejido o célula, como una célula humana).

10

El término "frataxina" se refiere a la proteína frataxina, y el término "*FXN*" se refiere al gen (también denominado en la técnica como "FA", "X25", "CyaY", "FARR" y "MGC57199") que codifica la proteína frataxina. Como se usan en este documento, los términos "frataxina" y "*FXN*" se refieren indistintamente al polipéptido y al ácido nucleico, respectivamente, incluidas variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos entre especies que: (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 905 aminoácidos de identidad de secuencia, por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente en una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, o más aminoácidos, o en toda su longitud, respecto a una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de *FXN* (SEQ ID NO: 5; véase, por ejemplo, números de acceso de GenBank NM_000144.4 (isoforma 1); o respecto a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de frataxina (SEQ ID NO: 3; véanse, por ejemplo, números de acceso de GenBank NP_000135.2 (isoforma 1); tienen una secuencia de ácidos nucleicos que tiene más de aproximadamente 95 %, por ejemplo más de aproximadamente 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia de nucleótidos, preferiblemente en una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 o más nucleótidos, o en toda la longitud, respecto a un ácido nucleico de *FXN* (por ejemplo, polinucleótidos de frataxina, como se describe en el presente documento, y polinucleótidos de *FXN* que codifican polipéptidos de frataxina, como se describe en el presente documento).

Tal como se utiliza en este documento, el término "ataxia de Friedreich" se refiere a una ataxia congénita autosómica recesiva causada por una mutación en el gen de *FXN* (anteriormente conocido como X25) que codifica la frataxina, ubicada en el cromosoma 9. La base genética de la ataxia de Friedreich involucra repeticiones del trinucleótido GAA se repite en una región intrónica del gen que codifica la frataxina. Este segmento normalmente se repite de 5 a 33 veces dentro del gen de *FXN*. En personas con ataxia de Friedreich, el segmento GAA se repite entre 66 y más de 1000 veces. Las personas con segmentos GAA repetidos menos de 300 veces tienden a tener una aparición más tardía de los síntomas (después de los 25 años) que aquellos con repeticiones de trinucleótidos GAA más grandes. La presencia de estas repeticiones da como resultado una transcripción y expresión reducidas del gen. La frataxina participa en la regulación del contenido de hierro mitocondrial. La mutación en el gen de *FXN* causa daño progresivo al sistema nervioso, resultando en síntomas que van desde alteraciones de la marcha hasta problemas del habla; también puede provocar enfermedades cardíacas y diabetes. La ataxia de la Ataxia de Friedreich resulta de la degeneración del tejido nervioso de la médula espinal, en particular de las neuronas sensoriales esenciales (a través de conexiones con el cerebelo) para dirigir el movimiento muscular de brazos y piernas. La médula espinal se vuelve más delgada y las células nerviosas pierden parte de su vaina de mielina (la cubierta aislante de algunas células nerviosas que ayuda a conducir los impulsos nerviosos). Un sujeto con ataxia de Friedreich puede presentar uno o más de los siguientes síntomas: debilidad muscular en brazos y piernas, pérdida de coordinación, discapacidad visual, discapacidad auditiva, dificultad para hablar, curvatura de la columna (escoliosis), arcos plantares altos (deformidad del pie cavo), intolerancia a los carbohidratos, diabetes mellitus, trastornos cardíacos (p. ej., fibrilación auricular, taquicardia (frecuencia cardíaca rápida) y miocardiopatía hipertrófica). Un sujeto con ataxia de Friedreich puede presentar además movimientos oculares involuntarios y/o rápidos, pérdida de reflejos tendinosos profundos, pérdida de respuestas plantares extensoras, pérdida de sensación vibratoria y propioceptiva, cardiomegalia, hipertrofia simétrica, soplos cardíacos y defectos de conducción cardíaca. El análisis

patológico puede revelar esclerosis y degeneración de los ganglios de la raíz dorsal, los tractos espinocerebelosos, los tractos corticoespinales laterales y las columnas posteriores.

Como se usa en este documento, el término "contenido de GC" se refiere a la cantidad de nucleósidos en una molécula de ácido nucleico particular, como un polinucleótido de ADN o ARN, que son guanosina (G) o citidina (C) en relación con la cantidad total de nucleósidos presentes en la molécula de ácido nucleico. El contenido de GC puede expresarse como porcentaje, por ejemplo, según la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de GC} = \frac{((\text{Cantidad total de nucleósidos de guanosina}) + (\text{Cantidad total de nucleósidos de citidina}))}{(\text{Cantidad total de nucleósidos})} \times 100$$

Tal como se utiliza en la presente, el término "gen" se refiere a una región del ADN que codifica una proteína. Un gen puede incluir regiones reguladoras y una región codificadora de proteínas. En algunas modalidades, un gen incluye dos o más intrones y tres o más exones, en donde cada intrón forma una secuencia intermedia entre dos exones.

Tal como se utiliza en la presente, el término "intrón" se refiere a una región dentro de la región codificante de un gen, cuya secuencia de nucleótidos no se traduce en la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente. El término intrón también se refiere a la región correspondiente del ARN transcrito a partir de un gen. En algunas modalidades, un gen, por ejemplo, puede contener como mínimo dos intrones, cada uno de los cuales forma la secuencia intermedia entre dos exones. Los intrones se transcriben en pre-ARNm, pero se eliminan durante el procesamiento y no se incluyen en el ARNm maduro.

Una "ITR" es un ácido nucleico palindrómico, por ejemplo, una repetición terminal invertida, que tiene una longitud de aproximadamente 120 nucleótidos a aproximadamente 250 nucleótidos y es capaz de formar una horquilla. El término "ITR" incluye el sitio de replicación del genoma viral que puede ser reconocido y unido por una proteína parvoviral (p. ej., Rep78/68). Una ITR puede ser de cualquier virus adenoasociado (AAV), prefiriéndose el serotipo 2. Una ITR incluye un elemento de unión a proteínas de replicación (RBE) y secuencias de resolución terminal (TRS). El término "ITR" no requiere una ITR de parvovirus en estado natural (p. ej., una secuencia de ácidos nucleicos en estado natural puede alterarse mediante inserción, delección, truncamiento o mutaciones sin sentido), siempre que la ITR funcione para mediar el empaquetamiento, replicación, integración y/o rescate viral de provirus, y similares. La "ITR 5'" pretende significar la ITR parvoviral ubicada en el límite 5' de la molécula de ácido nucleico; y el término "ITR 3'" pretende significar la ITR parvoviral ubicada en el límite 3' de la molécula de ácido nucleico.

Tal como se utiliza en la presente, el término "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido o parte del mismo (por ejemplo, adenosina, guanosina, timidina, citidina o uridina) que ha sido alterado por una o más transformaciones químicas enzimáticas o sintéticas. Las alteraciones ilustrativas observadas en los nucleótidos modificados descritos en el presente documento o conocidos en la técnica incluyen la introducción de sustituyentes químicos, tales como halo, tio, amino, azido, alquilo, acilo u otros grupos funcionales en una o más posiciones (p. ej., la posición 2', 3' y/o 5') de un 2-desoxirribonucleótido o un ribonucleótido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "mutación" se refiere a un cambio en la secuencia de nucleótidos de un gen o un cambio en la secuencia polipeptídica de una proteína. Las mutaciones en un gen o proteína pueden ocurrir naturalmente como resultado de, por ejemplo, errores en la replicación

del ADN, la reparación del ADN, la irradiación y la exposición a carcinógenos o las mutaciones pueden ser inducidas como resultado de la administración de un transgén que expresa un gen mutante. Las mutaciones pueden resultar de inserciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos únicos o múltiples.

- 5 "Ácido nucleico" y "polinucleótido", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "unido operativamente" se refiere a una primera molécula unida a una segunda molécula, en donde las moléculas están dispuestas de tal manera que la primera molécula afecta la función de la segunda molécula. Las dos moléculas pueden o no ser parte de una única molécula contigua y pueden ser adyacentes o no. Por ejemplo, un promotor está operativamente
10 unido a una molécula de polinucleótido transcribible si el promotor modula la transcripción de la molécula de polinucleótido transcribible de interés en una célula. Además, dos porciones de un elemento regulador de la transcripción están operativamente unidas entre sí si se unen de manera que la funcionalidad activadora de la transcripción de una porción no se vea afectada negativamente por la presencia de la otra porción. Dos elementos reguladores de la transcripción pueden estar unidos operativamente entre sí
15 mediante un ácido nucleico enlazador (por ejemplo, un ácido nucleico no codificante intermedio) o pueden estar unidos operativamente entre sí sin nucleótidos intermedios presentes.

El término "parvovirus", tal como se utiliza en el presente documento, abarca la familia Parvoviridae, incluidos los parvovirus y dependovirus que se replican de forma autónoma. Los parvovirus autónomos
20 incluyen miembros de los géneros Parvovirus, Erythrovirus, Densovirus, Iteravirus y Contravirus. Los parvovirus autónomos ilustrativos incluyen, entre otros, virus del minuto del ratón, parvovirus bovino, parvovirus canino, parvovirus del pollo, virus de la panleucopenia felina, parvovirus felino, parvovirus del ganso, parvovirus H1, parvovirus del pato muscovy, parvovirus de la serpiente y virus B19. Los expertos en la técnica conocen otros parvovirus autónomos. Véase, por ejemplo, Fields et ál. Virology, 4^a
25 ed. Editores Lippincott-Raven, Filadelfia, 1996. El género Dependovirus contiene virus adenoasociados (AAV), incluidos, entre otros, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV tipo 12, AAV tipo 13, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV caprino, AAV serpiente, AAV equino y AAV ovino.

30 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a una secuencia de polinucleótidos o polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de ácidos nucleicos o aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los ácidos nucleicos o aminoácidos en la secuencia de polinucleótidos o polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de
35 identidad de secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos puede lograrse de varias maneras dentro de las capacidades del experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-2 o Megalign. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para alinear las secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Por
40 ejemplo, los valores de porcentaje de identidad de secuencia se pueden generar usando el programa informático de comparación de secuencias BLAST. Como ilustración, el porcentaje de identidad de

secuencia de una secuencia de un ácido nucleico o aminoácido dada, A para, con o contra una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos dada, B (que se puede expresar de forma alternativa como una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos dada, A que tiene un determinado porcentaje de identidad de secuencia para, con o contra una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos B dada) se calcula como se indica a continuación:

$$100 \text{ multiplicado por (la fracción } X/Y)$$

donde X es la cantidad de nucleótidos o aminoácidos calificados como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias (p. ej., BLAST) en la alineación del programa de A y B y donde Y es la cantidad total de ácidos nucleicos en B. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos B, el porcentaje de identidad de secuencia de A con respecto a B no será igual al porcentaje de identidad de secuencia de B con respecto a A.

Como entendería un experto en la técnica, tal como se utiliza en el presente documento, con el fin de determinar el "porcentaje de identidad de secuencia", un nucleósido de uridina en una molécula de ARN se considera equivalente a un nucleósido de timidina en una molécula de ADN. Por lo tanto, se puede considerar que un equivalente de ARN tiene una identidad de secuencia del 100 % con respecto a un polinucleótido de ADN si el equivalente de ARN y el polinucleótido de ADN difieren entre sí únicamente por la sustitución de nucleósidos de uridina en el equivalente de ARN con nucleósidos de timidina en el polinucleótido de ADN.

El término "señal de poliadenilación" o "sitio de poliadenilación" se utiliza en el presente documento para referirse a una secuencia de ácidos nucleicos suficiente para dirigir la adición de ácido poliadenosina ribonucleico a una molécula de ARN expresada en una célula.

Un "promotor" es un ácido nucleico que permite el inicio de la transcripción de un gen en un ARN mensajero, iniciando dicha transcripción con la unión de una ARN polimerasa sobre o cerca del promotor.

Como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla que contiene un compuesto terapéutico para ser administrado a un sujeto, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano, con el fin de prevenir, tratar o controlar una enfermedad o afección particular que afecta o que pueda afectar al sujeto. Tal como se utiliza en la presente, la expresión "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, son adecuados para el contacto con los tejidos de un sujeto, tal como un mamífero (p. ej., un ser humano) sin provocar una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica y otro problema o complicación, con una relación beneficio/riesgo correspondiente razonable.

Tal como se utiliza en este documento, el término "equivalente de ARN" de un gen se refiere a un polinucleótido de ARN que corresponde a un polinucleótido de ADN que codifica el gen, como un transcrito de ARN que se obtiene mediante la transcripción de un polinucleótido de ADN que contiene el gen. Los equivalentes de ARN ilustrativos incluyen transcritos de ARNm producidos sintéticamente, como mediante técnicas de síntesis de ácidos nucleicos en fase sólida conocidas en la técnica y/o descritas en el presente documento, así como mediante métodos de preparación de ácidos nucleicos recombinantes.

Un "espaciador" es cualquier polinucleótido de al menos 1,0 Kb de longitud que contiene un marco de lectura abierto (ORF) de menos de 100 aminoácidos; tiene un contenido de CpG que es inferior al 1 % de la secuencia de ácidos nucleicos total; o no contiene sitios de unión al factor de transcripción (TF) (por

ejemplo, sitios reconocidos por un factor de transcripción procariota o baculoviral). El término espaciador no incluye ácidos nucleicos de origen procariota o baculoviral. Un espaciador puede aislarse de una fuente natural o modificarse, por ejemplo, para reducir el tamaño de un ORF, el contenido de CpG o el número de sitios de unión del factor de transcripción. Un espaciador puede seleccionarse entre ácidos nucleicos naturales que promueven la expresión de un polinucleótido, por ejemplo, un intrón que se encuentra adyacente a un ORF o un potenciador que se encuentra cerca de un sitio de inicio de la transcripción. El uso de un "espaciador", como se define en este documento, resulta en una reducción de los ácidos nucleicos contaminantes empaquetados en una partícula viral.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "elemento regulador de la transcripción" se refiere a un ácido nucleico que controla, al menos en parte, la transcripción de un gen de interés. Los elementos reguladores de la transcripción pueden incluir promotores, potenciadores y otros ácidos nucleicos (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan o ayudan a controlar la transcripción génica. Ejemplos de elementos reguladores de la transcripción se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990).

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a un tratamiento terapéutico, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, como la ataxia de Friedreich, entre otros. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. En el contexto de la ataxia de Friedreich, el tratamiento de un paciente puede manifestarse en uno o más cambios detectables, como un aumento en la concentración de frataxina o ácidos nucleicos (p. ej., ADN o ARN, como el ARNm) que codifican la frataxina (p. ej., en 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más). La concentración de frataxina se puede determinar usando ensayos de detección de proteínas conocidos en la técnica, incluidos los ensayos ELISA descritos en el presente documento. La concentración de ácidos nucleicos que codifican frataxina se puede determinar utilizando ensayos de detección de ácidos nucleicos (por ejemplo, ensayos de secuencia de ARN) descritos en el presente documento. En el Ejemplo 3 a continuación se proporcionan protocolos ilustrativos para la detección de proteínas y ácidos nucleicos de frataxina. Además, el tratamiento de un paciente que sufre de ataxia de Friedreich puede manifestarse en mejoras en la función muscular del paciente (por ejemplo, función del músculo cardíaco o esquelético), así como en mejoras en la coordinación muscular. Por ejemplo, el tratamiento de un paciente que sufre de ataxia de Friedreich puede manifestarse en una reducción en la puntuación total de la Escala de calificación de la ataxia de Friedreich (FARS) (p. ej., aproximadamente 12 semanas después del tratamiento).

Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, que puede funcionar como vehículo para la administración de un gen de interés en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana), como por ejemplo con fines de replicación y/o expresión. Los vectores ilustrativos útiles junto con las composiciones y métodos

descritos en el presente documento son plásmidos, vectores de ADN, vectores de ARN, viriones u otros replicones adecuados (por ejemplo, vectores virales). Se ha desarrollado una variedad de vectores para la administración de polinucleótidos que codifican proteínas exógenas en una célula procariota o eucariota. Ejemplos de dichos vectores de expresión se describen, por ejemplo, en el documento WO 1994/11026, cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia. Los vectores de expresión descritos en el presente documento contienen una secuencia de polinucleótidos, así como, por ejemplo, elementos de secuencia adicionales utilizados para la expresión de proteínas y/o la integración de estas secuencias de polinucleótidos en el genoma de una célula de mamífero. Ciertos vectores que pueden usarse para la expresión de los transgenes descritos en el presente documento incluyen plásmidos que contienen secuencias reguladoras, como regiones promotoras y potenciadoras, que dirigen la transcripción génica. Otros vectores útiles para la expresión de transgenes contienen secuencias de polinucleótidos que aumentan la velocidad de traducción de estos genes o mejoran la estabilidad o la exportación nuclear del ARNm que resulta de la transcripción del gen. Estos elementos de secuencia incluyen, por ejemplo, regiones no traducidas 5' y 3', un sitio de entrada ribosomal interno (IRES) y un sitio de señal de poliadenilación para dirigir la transcripción eficiente del gen transportado en el vector de expresión. Los vectores de expresión descritos en el presente documento también pueden contener un polinucleótido que codifica un marcador para la selección de células que contienen dicho vector. Los ejemplos de un marcador adecuado incluyen genes que codifican la resistencia a los antibióticos, como ampicilina, cloranfenicol, kanamicina o nourseotricina.

Descripción detallada

Las composiciones y métodos descritos en el presente documento son útiles para estimular la expresión de la proteína frataxina humana y para tratar trastornos asociados con mutaciones en el gen de la frataxina (*FXN*), tales como la ataxia de Friederich. Las composiciones descritas en el presente documento incluyen un plásmido (por ejemplo, un vector viral, por ejemplo, un virus adenoasociado (AAV)) que codifica un *FXN* humano optimizado por codones (*hFXNco*) o un equivalente de ARN del mismo para la expresión de la proteína frataxina en una célula. Los plásmidos descritos en el presente documento incluyen un AAV que incluye dos repeticiones terminales invertidas (ITR; por ejemplo, una primera ITR (ITR1) y una segunda ITR (ITR2)), en donde la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,7 Kb. Sin estar limitadas por el mecanismo, las composiciones descritas en el presente documento pueden mejorar la patología asociada con la ataxia de Friederich estimulando eficazmente la expresión de la proteína frataxina humana.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la administración de una molécula de ácido nucleico que incluye ITR1-*hFXNco*-ITR2, en donde la longitud de los ácidos nucleicos entre ITR1 e ITR2 inclusive es de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,7 Kb, conduce a una capacidad sorprendentemente superior para inducir la expresión de la proteína frataxina humana en una célula. Esta propiedad es particularmente beneficiosa en vista de la prevalencia de mutaciones del gen de *FXN* en genomas de mamíferos, como en los genomas de pacientes humanos con ataxia de Friederich. Utilizando las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se puede mejorar eficazmente la expresión de transcripciones de *FXN* o ARN importantes y sanas de los mismos y su producto proteico frataxina codificado.

Las secciones que siguen proporcionan una descripción de ejemplos de optimización por codones y

métodos de producción de los mismos para producir hFXNco que se pueden usar junto con los vectores que codifican dichas construcciones descritas en el presente documento y métodos que se pueden usar para tratar la ataxia de Friederich.

Proteínas Terapéuticas

- 5 Los genes que pueden incorporarse en un plásmido (por ejemplo, un vector viral) según los métodos descritos en el presente documento incluyen aquellos que codifican proteínas terapéuticas (por ejemplo, frataxina), tales como aquellos que pueden transferirse a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que padece una enfermedad o afección (p. ej., ataxia de Friederich) caracterizada por una deficiencia de la proteína. Por ejemplo, un gen que puede administrarse a un paciente según los métodos descritos en el
10 presente documento incluye un gen que codifica la frataxina.

En un enfoque, la invención proporciona un *FXN* humano (hFXN) o un equivalente de ARN del mismo que tiene una secuencia de polinucleótidos que es al menos 95 % (por ejemplo, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a una molécula de ARN endógena que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (p. ej., SEQ ID NO: 5). Por ejemplo, en algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 95 % de
15 identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 96 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 97 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína
20 frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 98 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 99 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido es idéntico a una
25 molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5).

En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 85 % (p. ej., 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, en algunas
30 modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 86 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 87 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 88 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En
35 algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 89 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En
40 algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 92 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un

equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 93 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 94 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 97 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el hFXN, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Optimización por codones

Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se pueden usar para optimizar la secuencia de ácidos nucleicos de un gen o equivalente de ARN del mismo (por ejemplo, FXN) que codifica una proteína de interés (por ejemplo, frataxina) para lograr, por ejemplo, una expresión mejorada de la proteína en un tipo de célula particular. Por ejemplo, utilizando las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se pueden optimizar genes y equivalentes de ARN de los mismos para la expresión específica de tejido de una proteína codificada (por ejemplo, frataxina). Los genes y sus equivalentes de ARN optimizados utilizando las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden sintetizarse mediante técnicas de síntesis química y pueden amplificarse, por ejemplo, utilizando métodos de amplificación basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o mediante transfección del gen en una célula, tal como una célula bacteriana o una célula de mamífero capaz de replicar ácidos nucleicos exógenos.

Los genes y equivalentes de ARN descritos en el presente documento pueden tener una utilidad clínica importante. Una variedad de enfermedades y afecciones, incluidos trastornos genéticos hereditarios, como la ataxia de Friederich, son manifestaciones de una deficiencia en una proteína nativa (p. ej., frataxina). Con la llegada de la terapia génica, se ha desarrollado una amplia gama de vectores y técnicas de administración de genes para la introducción de ácidos nucleicos exógenos que codifican proteínas en células diana (p. ej., células humanas). Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de variantes optimizadas del transgén codificado por el ácido nucleico exógeno para lograr una expresión sólida y estable de la proteína codificada en la célula de interés.

Reducción del contenido de CpG y del contenido de homopolímeros

La optimización por codones se puede realizar mediante técnicas conocidas en la técnica. Como ejemplo no limitativo, un experto en la técnica puede manipular la secuencia del gen que codifica proteínas de un gen diana incorporando sustituciones de codones que disminuyen el contenido de CpG y/o el contenido de homopolímero del gen. Por ejemplo, se puede comenzar con una secuencia de gen en estado natural e introducir sustituciones (p. ej., sustituciones de un solo nucleótido) que reduzcan el contenido de CpG y/o el contenido de homopolímero del gen preservando al mismo tiempo la identidad de la secuencia de proteínas codificadas. Luego se puede seguir el proceso de minimización de identidad de secuencia

descrito anteriormente y en el **Ejemplo 1** para obtener una secuencia genética que se parezca mínimamente al gen (p. ej., *FXN*) codificado en un tipo de célula de interés. Alternativamente, se puede comenzar con una secuencia que ha sido optimizada por codones de acuerdo con el proceso de minimización de identidad de secuencia descrito anteriormente y posteriormente se puede manipular mediante la introducción de mutaciones (p. ej., sustituciones de un solo nucleótido) que reducen el contenido de CpG y/o el contenido de homopolímero del gen. Los sitios CpG y los homopolímeros pueden promover cambios de marco +1 durante el proceso de traducción del ARNm. Alternativamente, si el homopolímero codifica residuos de aminoácidos que no son esenciales para la función de la proteína (por ejemplo, si los aminoácidos codificados no están presentes dentro del sitio activo de una enzima codificada o dentro de un sitio necesario para la unión no covalente a otra molécula biológica), un experto en la técnica puede incorporar sustituciones de codones que interrumpen el homopolímero y que introducen una sustitución conservadora en la proteína codificada en el sitio del aminoácido correspondiente.

Preparación de genes optimizados por codones

Una vez diseñado, el gen final optimizado por codones se puede preparar, por ejemplo, mediante procedimientos de ácido nucleico en fase sólida conocidos en la técnica. Por ejemplo, para realizar la síntesis química de moléculas de ácido nucleico, como ADN, ARN y similares, se puede emplear un proceso de síntesis en fase sólida utilizando un método de fosforamidita. Según este procedimiento, un ácido nucleico generalmente se sintetiza mediante los siguientes pasos.

En primer lugar, un nucleósido protegido con 5-OH que se producirá en el extremo terminal 3' del ácido nucleico que se va a sintetizar se esterifica mediante la función 3'-OH hasta obtener un soporte sólido añadiendo el nucleósido a un enlazador escindible. Luego, el soporte para la síntesis en fase sólida sobre el cual se inmoviliza el nucleósido se puede colocar en una columna de reacción que luego se coloca en un sintetizador automatizado de ácidos nucleicos.

Posteriormente, se puede realizar un proceso de síntesis iterativo que incluye los siguientes pasos en la columna de reacción de acuerdo con un programa de síntesis del sintetizador automatizado de ácidos nucleicos:

- (1) una etapa de desprotección del resto 5'-OH del nucleósido inmovilizado y protegido (por ejemplo, con un ácido tal como ácido tricloroacético en solución de diclorometano o similar para eliminar los grupos protectores hidroxilo lábiles a los ácidos);
- (2) una etapa de acoplamiento de un nucleósido fosforamidita protegido con 5-OH con el grupo 5'-OH desprotegido del nucleósido inmovilizado en presencia de un activador (por ejemplo, tetrazol o similar);
- (3) una etapa de bloquear el grupo 5'-OH sin reaccionar del nucleósido 3'-terminal (por ejemplo, con anhídrido acético o similar); y
- (4) una etapa de oxidación del sustituyente fosfito inmovilizado (por ejemplo, con yodo acuoso o similar).

El proceso anterior se puede repetir para alargar el ácido nucleico según sea necesario en la dirección 3' a 5'. Se promueve la dirección terminal 5' y se sintetiza un ácido nucleico que tiene una secuencia deseada. Por último, el enlazador escindible se hidroliza (por ejemplo, con amoniaco acuoso, solución de metilamina o similar) para escindir el ácido nucleico sintetizado del soporte de fase sólida. Procedimientos como los anteriores para la síntesis química de ácidos nucleicos se conocen en la técnica y se describen,

por ejemplo, en la patente estadounidense número 8,835,656, cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia en lo que respecta a protocolos para la síntesis de moléculas de ácido nucleico. Además, el gen preparado se puede amplificar, por ejemplo, usando técnicas basadas en PCR descritas en el presente documento o conocidas en la técnica, y/o mediante transformación de DH5α *E. coli* con un plásmido que contiene el gen diseñado. Las bacterias se pueden cultivar posteriormente para amplificar el ADN en ellas, y el gen se puede aislar mediante técnicas de purificación de plásmido conocidas en la técnica, seguidas opcionalmente de una digestión de restricción y/o secuenciación del plásmido para verificar la identidad del gen optimizado por codones.

FXN humano optimizado por codones ilustrativo

- En un enfoque, la invención proporciona un hFXNco o un equivalente de ARN del mismo que tiene una secuencia de polinucleótidos que es al menos 85 % (p. ej., 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos un 86 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 87 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 88 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 89 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 92 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 93 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 94 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 97 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 98 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 99 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene la secuencia de ácidos

nucleicos de SEQ ID NO: 1.

Métodos para la administración de ácidos nucleicos exógenos a células diana

Técnicas de transfección

Se conocen en la técnica técnicas que pueden usarse para introducir un transgén, tal como un transgén operativamente unido a un elemento regulador de la transcripción descrito en el presente documento, en una célula diana. Por ejemplo, la electroporación se puede utilizar para permeabilizar células de mamíferos (por ejemplo, células diana humanas) mediante la aplicación de un potencial electrostático a la célula de interés. Las células de mamíferos, como por ejemplo las células humanas, sometidas de esta manera a un campo eléctrico externo, están posteriormente predispuestas a la absorción de ácidos nucleicos exógenos.

La electroporación de células de mamíferos se describe en detalle, por ejemplo, en Chu et ál., *Nucleic Acids Res* 15:1311 (1987), cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia. Una técnica similar, Nucleofection™, utiliza un campo eléctrico aplicado para estimular la absorción de polinucleótidos exógenos en el núcleo de una célula eucariota. Nucleofection™ y los protocolos útiles para realizar esta técnica se describen en detalle, por ejemplo, en Distler et ál., *Exp. Dermatol.* 14:315 (2005), así como en US 2010/0317114, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento como referencia.

Técnicas adicionales útiles para la transfección de células diana incluyen la metodología de poración exprimida. Esta técnica induce la rápida deformación mecánica de las células para estimular la absorción de ADN exógeno a través de poros membranosos que se forman en respuesta al estrés aplicado. Esta tecnología es ventajosa porque no se requiere un vector para la administración de ácidos nucleicos a una célula, como una célula diana humana. La poración exprimida se describe en detalle, por ejemplo, en Sharei et ál., *JoVE* 81:e50980 (2013), cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia.

La lipofección representa otra técnica útil para la transfección de células diana. Este método implica la carga de ácidos nucleicos en un liposoma, que a menudo presenta grupos funcionales catiónicos, como aminos cuaternarios o protonados, hacia el exterior del liposoma. Esto promueve interacciones electrostáticas entre el liposoma y una célula debido a la naturaleza aniónica de la membrana celular, lo que finalmente conduce a la absorción de los ácidos nucleicos exógenos, por ejemplo, por fusión directa del liposoma con la membrana celular o por endocitosis del complejo. La lipofección se describe en detalle, por ejemplo, en la patente estadounidense número 7,442,386, cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia. Técnicas similares que aprovechan las interacciones iónicas con la membrana celular para provocar la absorción de ácidos nucleicos extraños incluyen poner en contacto una célula con un complejo de polímero catiónico y ácido nucleico. Moléculas catiónicas ilustrativas que se asocian con polinucleótidos para impartir una carga positiva favorable para la interacción con la membrana celular son dendrímeros activados (descritos, por ejemplo, en Dennig, *Top Curr Chem* 228:227 (2003), cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia) y dietilaminoetil (DEAE)-dextrano, cuyo uso como agente de transfección se describe en detalle, por ejemplo, en Gulick et ál., *Curr Protoc Mol Biol* 40:I:9.2: 9.2.1 (1997), cuya descripción se incorpora en la presente como referencia. Las perlas magnéticas son otra herramienta que se puede utilizar para transfectar células diana de una manera suave y eficiente, ya que esta metodología utiliza un campo magnético aplicado para dirigir la absorción de ácidos nucleicos. Esta tecnología se describe en detalle, por ejemplo, en el documento US

2010/0227406, cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia.

Otra herramienta útil para inducir la absorción de ácidos nucleicos exógenos por las células diana es la infección por láser, una técnica que implica exponer una célula a radiación electromagnética de una longitud de onda particular para permeabilizar suavemente las células y permitir que los polinucleótidos penetren en la membrana celular. Esta técnica se describe en detalle, por ejemplo, en Rhodes et ál., *Methods Cell Biol.* 82:309 (2007), cuya divulgación se incorpora a la presente como referencia.

Las microvesículas representan otro vehículo potencial que se puede utilizar para modificar el genoma de una célula diana según los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, las microvesículas que han sido inducidas por la sobreexpresión conjunta de la glicoproteína VSV-G con, por ejemplo, una proteína modificadora del genoma, como una nucleasa, pueden usarse para administrar eficientemente proteínas en una célula que posteriormente catalizan la escisión específica de sitio de una secuencia de polinucleótido endógena para preparar el genoma de la célula para la incorporación covalente de un polinucleótido de interés, tal como un gen o una secuencia reguladora. El uso de tales vesículas, también denominadas Gesículas, para la modificación genética de células eucariotas se describe en detalle, por ejemplo, en Quinn et ál., Genetic Modification of Target Cells by Direct Delivery of Active Protein [resumen]. En: Cambios de metilación en genes embrionarios tempranos en el cáncer [resumen], en: Actas de la 18ª Reunión Anual de la Sociedad Estadounidense de Terapia Génica y Celular; 13 de mayo de 2015, Resumen No. 122.

Incorporación de genes diana mediante técnicas de edición de genes

Además de lo anterior, se han desarrollado una variedad de herramientas que pueden usarse para la incorporación de un gen de interés en una célula diana, como una célula humana. Uno de esos métodos que se puede utilizar para incorporar polinucleótidos que codifican genes diana en células diana implica el uso de transposones. Los transposones son polinucleótidos que codifican enzimas transposasas y contienen una secuencia de polinucleótidos o un gen de interés flanqueado por sitios de escisión 5' y 3'.

Una vez que un transposón ha sido introducido en una célula, comienza la expresión del gen de la transposasa y da como resultado enzimas activas que escinden el gen de interés del transposón. Esta actividad está mediada por el reconocimiento específico de los sitios de escisión de transposones por parte de la transposasa. En algunos casos, estos sitios de escisión pueden ser repeticiones terminales o repeticiones terminales invertidas (ITR). Una vez extirpado del transposón, el gen de interés puede integrarse en el genoma de una célula de mamífero mediante la escisión catalizada por transposasa de sitios de escisión similares que existen dentro del genoma nuclear de la célula. Esto permite que el gen de interés se inserte en el ADN nuclear escindido en los sitios de escisión complementarios, y la posterior unión covalente de los enlaces fosfodiéster que unen el gen de interés al ADN del genoma de la célula de mamífero completa el proceso de incorporación. En ciertos casos, el transposón puede ser un retrotransposón, de modo que el gen que codifica el gen diana se transcribe primero a un producto de ARN y luego se transcribe de manera inversa a ADN antes de su incorporación al genoma de la célula de mamífero. Los sistemas de transposones ilustrativos son el transposón piggybac (descrito en detalle, por ejemplo, en el documento WO 2010/085699) y el transposón de la bella durmiente (descrito en detalle, por ejemplo, en el documento US 2005/0112764), cuyas divulgaciones de cada uno de los cuales se incorporan en el presente documento mediante referencia en lo que respecta a transposones para su uso en la administración de genes a una célula de interés.

Otra herramienta para la integración de genes diana en el genoma de una célula diana es el sistema Cas/repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR), un sistema que originalmente evolucionó como un mecanismo de defensa adaptativo en bacterias y arqueas contra la infección viral. El sistema CRISPR/Cas incluye secuencias repetidas palindrómicas dentro del ADN plasmídico y una nucleasa Cas9 asociada. Este conjunto de ADN y proteínas dirige la escisión de ADN de un sitio específico de una secuencia diana incorporando primero ADN extraño en los loci CRISPR. Los polinucleótidos que contienen estas secuencias extrañas y los elementos espaciadores repetidos del locus CRISPR se transcriben a su vez en una célula huésped para crear un ARN guía, que posteriormente puede hibridarse con una secuencia diana y localizar la nucleasa Cas9 en este sitio. De esta manera, la escisión de ADN mediada por cas9 altamente específica de sitio puede generarse en un polinucleótido extraño porque la interacción que acerca a cas9 a la molécula de ADN diana se rige por la hibridación ARN:ADN. Como resultado, se puede diseñar un sistema CRISPR/Cas para escindir cualquier molécula de ADN de interés. Esta técnica se ha aprovechado para editar genomas eucariotas (Hwang et ál., *Nat. Biotechnol.* 31:227 (2013)) y puede usarse como un medio eficaz para editar genomas de células diana de manera específica para un sitio con el fin de escindir ADN antes de la incorporación de un gen que codifica un gen diana. El uso de CRISPR/Cas para modular la expresión génica se ha descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 8,697,359, cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia en lo que respecta al uso del sistema CRISPR/Cas para la edición del genoma. Los métodos alternativos para escindir ADN genómico de forma específica antes de la incorporación de un gen de interés en una célula diana incluyen el uso de nucleasas con dedos de zinc (ZFN) y nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN). A diferencia del sistema CRISPR/Cas, estas enzimas no contienen un polinucleótido guía para localizar una secuencia diana específica. En cambio, la especificidad de la diana está controlada por los dominios de unión al ADN dentro de estas enzimas. El uso de ZFN y TALEN en aplicaciones de edición del genoma se describe, por ejemplo, en Urnov et ál., *Nat. Rev. Genet.* 11:636 (2010); y en Joung et ál., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 14:49 (2013), cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia en lo que respecta a composiciones y métodos para la edición del genoma.

Técnicas adicionales de edición del genoma que pueden usarse para incorporar polinucleótidos que codifican genes diana en el genoma de una célula diana incluyen el uso de meganucleasas ARCUSTM que pueden diseñarse racionalmente para escindir ADN genómico de manera específica. El uso de estas enzimas para la incorporación de genes que codifican genes diana en el genoma de una célula de mamífero es ventajoso en vista de las relaciones estructura-actividad definidas que se han establecido para tales enzimas. Las meganucleasas de cadena sencilla se pueden modificar en ciertas posiciones de aminoácidos para crear nucleasas que escindan selectivamente el ADN en las ubicaciones deseadas, permitiendo la incorporación específica del sitio de un gen diana en el ADN nuclear de una célula diana. Estas nucleasas de cadena sencilla se han descrito ampliamente, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 8,021,867 y US 8,445,251, cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia en lo que respecta a composiciones y métodos para la edición del genoma.

Vectores para la administración de ácidos nucleicos exógenos a células diana

40 Vectores virales para la administración de ácido nucleico

Los genomas virales proporcionan una rica fuente de vectores que pueden usarse para la administración

eficaz de un gen de interés en el genoma de una célula diana (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana). Los genomas virales son vectores particularmente útiles para la administración de genes porque los polinucleótidos contenidos en dichos genomas generalmente se incorporan al genoma de una célula diana mediante transducción generalizada o especializada. Estos procesos ocurren como parte del ciclo de replicación viral natural y no requieren proteínas o reactivos agregados para inducir la integración genética. Los ejemplos de vectores virales incluyen AAV, retrovirus, adenovirus (p. ej., Ad5, Ad26, Ad34, Ad35 y Ad48), parvovirus (p. ej., virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa como ortomixovirus (p. ej., virus influenza), rhabdovirus (p. ej., virus de la rabia y de la estomatitis vesicular), paramyxovirus (p. ej., sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva, como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN de doble cadena, incluidos adenovirus, herpesvirus (p. ej., tipos de virus del herpes simple 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (p. ej., vaccinia, vaccinia Ankara modificada (MVA), viruela aviar y viruela del canario). Otros virus útiles para administrar polinucleótidos que codifican cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención incluyen virus de Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus tipo C de mamíferos, virus tipo B, virus tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, spumavirus (Coffin, J.M., Retroviridae: The virus and their replication, In Fundamental Virology, tercera edición, BN Fields, et ál., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996). Otros ejemplos incluyen virus de la leucemia murina, virus del sarcoma murino, virus del tumor mamario de ratón, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia felina, virus del sarcoma felino, virus de la leucemia aviar, virus de la leucemia de células T humana, virus endógeno del babuino, virus de la leucemia del simio Gibón, Virus del mono Mason Pfizer, virus de la inmunodeficiencia simia, virus del sarcoma de los simios, virus del sarcoma de Rous y lentivirus. Otros ejemplos de vectores se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5,801,030, cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia en lo que respecta a vectores virales para su uso en terapia génica.

Vectores de AAV para la administración de ácidos nucleicos

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos de las composiciones y métodos descritos en el presente documento se incorporan en vectores y/o viriones de AAV recombinantes (rAAV) para facilitar su introducción en una célula. Los vectores de rAAV útiles en la invención son construcciones de ácido nucleico recombinantes que incluyen (1) un transgén a expresar (por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína frataxina) y (2) ácidos nucleicos virales que facilitan la integración y expresión de los genes heterólogos. Los ácidos nucleicos virales pueden incluir aquellas secuencias de AAV que se requieren en cis para la replicación y empaquetamiento (por ejemplo, ITR funcionales) del ADN en un virión. En aplicaciones típicas, el transgén codifica frataxina, que es útil para corregir una deficiencia de frataxina en pacientes que padecen ataxia de Friederich. Dichos vectores de rAAV también pueden contener genes marcadores o informantes. Los vectores de rAAV útiles tienen uno o más de los genes de AAV WT eliminados total o parcialmente, pero conservan secuencias ITR flanqueantes funcionales. Las ITR de AAV pueden ser de cualquier serotipo (p. ej., derivadas del serotipo 2) adecuado para una aplicación particular. En algunas modalidades, las ITR de AAV pueden ser ITR de AAV de serotipo 2. Los métodos para usar vectores de rAAV se describen, por ejemplo, en Tal et ál., *J. Biomed. Sci.* 7:279-291 (2000), y Monahan y Samulski, *Gene Delivery* 7:24-30 (2000), cuyas descripciones se incorporan en

el presente documento como referencia en lo que respecta a vectores de AAV para la administración de genes.

Los ácidos nucleicos y los vectores descritos en el presente documento se pueden incorporar en un virión de rAAV para facilitar la introducción del ácido nucleico o vector en una célula. Las proteínas de la cápside de AAV componen la porción exterior, no de ácido nucleico, del virión y están codificadas por el gen cap de AAV. En algunas modalidades, el AAV de la invención comprende una proteína de la cápside recombinante. El gen cap codifica tres proteínas de la cubierta viral, VP1, VP2 y VP3, que son necesarias para el ensamblaje del virión. La construcción de viriones de rAAV se ha descrito, por ejemplo, en las patentes estadounidenses nº 5,173,414; 5,139,941; 5,863,541; 5,869,305; 6,057,152; y 6,376,237; así como en Rabinowitz et ál., *J. Virol.* 76:791-801 (2002) y Bowles et ál., *J. Virol.* 77:423-432 (2003), cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia en lo que respecta a vectores de AAV para la administración de genes.

Los viriones de rAAV útiles junto con las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen aquellos derivados de una variedad de serotipos de AAV que incluyen AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Para atacar células musculares, los viriones de rAAV que incluyan al menos una proteína de la cápside de serotipo 1 pueden ser particularmente útiles. Los viriones de rAAV que incluyen al menos una proteína de la cápside del serotipo 6 también pueden ser particularmente útiles, ya que las proteínas de la cápside del serotipo 6 son estructuralmente similares a las proteínas de la cápside del serotipo 1 y, por lo tanto, se espera que también den como resultado una alta expresión de *FXN* en las células musculares. También se ha descubierto que el serotipo 9 de rAAV es un transductor eficaz de las células musculares. La construcción y el uso de vectores de AAV y proteínas de AAV de diferentes serotipos se describen, por ejemplo, en Chao et ál., *Mol. Ther.* 2:619-623 (2000); Davidson et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 97:3428-3432 (2000); Xiao et ál., *J. Virol.* 72:2224-2232 (1998); Halbert et ál., *J. Virol.* 74:1524-1532 (2000); Halbert et ál., *J. Virol.* 75:6615-6624 (2001); y Auricchio et ál., *Hum. Molec. Genet.* 10:3075-3081 (2001), cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia en lo que respecta a vectores de AAV para la administración de genes.

También son útiles junto con las composiciones y métodos descritos en el presente documento los vectores de rAAV pseudotipados. Los vectores pseudotipados incluyen vectores de AAV de un serotipo determinado (p. ej., AAV9) pseudotipados con un gen de la cápside derivado de un serotipo distinto del serotipo dado (p. ej., AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, etc.). Por ejemplo, un vector pseudotipado representativo es un vector AAV8 o AAV9 que codifica una proteína terapéutica (p. ej., frataxina) pseudotipada con un gen de la cápside derivado del serotipo 2 de AAV. Las técnicas que implican la construcción y el uso de viriones de rAAV pseudotipados se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Duan et ál., *J. Virol.* 75:7662-7671 (2001); Halbert et ál., *J. Virol.* 74:1524-1532 (2000); Zolotukhin et ál., *Methods*, 28:158-167 (2002); y Auricchio et ál., *Hum. Molec. Genet.*, 10:3075-3081 (2001).

Los viriones de AAV que tienen mutaciones dentro de la cápside del virión se pueden usar para infectar tipos de células particulares de manera más efectiva que los viriones de la cápside no mutados. Por ejemplo, los mutantes de AAV adecuados pueden tener mutaciones de inserción de ligando para facilitar el direccionamiento de AAV a tipos de células específicos. La construcción y caracterización de mutantes de la cápside de AAV, incluidos mutantes de inserción, mutantes de detección de alanina y mutantes de

etiquetas de epítomos, se describen en Wu et ál., *J. Virol.* 74:8635-45 (2000). Otros viriones de rAAV que se pueden usar en los métodos de la invención incluyen aquellos híbridos de cápside que se generan mediante reproducción molecular de virus, así como mediante combinación de exones. Véase, por ejemplo, Soong et ál., *Nat. Genet.*, 25:436-439 (2000) y Kolman y Stemmer, *Nat. Biotechnol.* 19:423-428 (2001).

Vectores AAV ilustrativos

Como se describe en el presente documento, los componentes del vector AAV ilustrativos pueden incluir un promotor, un intrón, un polinucleótido que codifica *FXN* humano o un polinucleótido que codifica *hFXNco*, y/o un sitio de poliadenilación (pA).

En algunas modalidades, el AAV puede incluir un promotor procariota (P_{Euk}). En algunas modalidades, el AAV puede incluir un promotor específico del músculo. En algunas modalidades, el promotor específico de músculo es un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK), un promotor de desmina, un promotor de creatina quinasa muscular, un promotor de cadena ligera de miosina, un promotor de cadena pesada de miosina, un promotor de troponina C cardíaca, un promotor de troponina I, un promotor de la familia de genes myoD, un promotor de actina alfa, un promotor de actina beta, un promotor de actina gamma o un promotor dentro del intrón 1 del homeodominio 3 similar al par ocular, un promotor de citomegalovirus o un promotor de β -actina de pollo. Por ejemplo, en algunas modalidades, el promotor específico de músculo es un promotor PGK.

En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 85 % (por ejemplo, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, en algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que está en al menos un 86 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 87 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 88 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 89 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 92 % idéntico a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 93 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 94 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 97 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que

es al menos 98 % idéntica. a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 99 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el promotor PGK tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 2.

- 5 En algunas modalidades, el AAV incluye un intrón. En algunas modalidades, el intrón es un intrón SV40. En algunas modalidades, el intrón está colocado en 5' con respecto al polinucleótido.
- En algunas modalidades, el *hFXN* o un equivalente de ARN del mismo tiene una secuencia de polinucleótidos que es al menos 95 % (por ejemplo, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a una molécula de ARN endógena que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (p. ej., SEQ ID NO: 5). Por
- 10 ejemplo, en algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 95 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 96 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 97 % de identidad de secuencia
- 15 con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 98 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido exhibe al menos un 99 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ
- 20 ID NO: 5). En algunas modalidades, el polinucleótido es idéntico a una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de la proteína frataxina (por ejemplo, SEQ ID NO: 5).
- En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 85 % (p. ej., 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, en algunas
- 25 modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 86 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 87 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 88 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En
- 30 algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 89 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En
- 35 algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 92 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 93 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 94 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En
- 40 algunas modalidades, el *hFXN*, o un equivalente de ARN del mismo, codifica una proteína que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el *hFXN*, o un

En algunas modalidades, el hFXNco o un equivalente de ARN del mismo tiene una secuencia de polinucleótidos que es al menos 85 % (p. ej., 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 86 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 87 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 88 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 89 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 92 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 93 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 94 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 97 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 98 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el hFXNco, o un equivalente de ARN del mismo, tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 99 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, el polinucleótido tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, el AAV incluye un sitio de poliadenilación (pA). Por ejemplo, el sitio pA puede seleccionarse de la lista no limitativa que comprende un sitio de poliadenilación tardía de SV40, un sitio de poliadenilación temprana de SV40, un sitio de poliadenilación de β -globina humana o un sitio de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina. En algunas modalidades, el AAV incluye un sitio de poliadenilación tardía de SV40.

En algunas modalidades, el pA está colocado en 3' con respecto al polinucleótido.

Como se describe en el presente documento, los componentes del vector AAV ilustrativos, incluido un promotor de fosfoglicerato quinasa humana (hPGK), un hFXNco, como se describe en el presente documento, se ejemplifican mediante las secuencias de ácidos nucleicos en la Tabla 2, que se muestra a continuación, un intrón del virus 40 (SV40) de simio, y un sitio de poliadenilación tardía de SV40.

Tabla 2: secuencias de ácidos nucleicos de componentes de vectores AAV ilustrativos

SEQ NO:	ID	Secuencia de ácidos nucleicos	Componente genético
2		GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGG TTTGCGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCG GGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATT CTTCACGTCCGTTTCGCAGCGTCACCCGGATCTTCGCCG CTACCCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTCCTGCTCCG CCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTGCGGTTTCGCGGCGT GCCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAG TACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGGCA GCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCT GCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAG GGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCGGTAGTGT GGGCCCTGTTCTGCCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGC AAGCCTCCGGAGCGCACGTTCGGCAGTCGGCTCCCTCG TTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG	Promotor PGK humano
1		ATGTGGACCCTGGGCAGGAGGGCTGTGGCTGGCCTGC TGGCCAGCCCCAGCCCTGCCCAGGCCAGACCCTGAC CAGGGTGCCCAGGCCTGCTGAGCTGGCCCCCCTGTGT GGCAGGAGGGGCCTGAGGACTGACATTGATGCCACCT GCACCCCCAGGAGGGCCAGCAGCAACCAGAGGGGCC TGAACCAGATCTGGAATGTGAAGAAGCAGTCTGTGTA CCTGATGAACCTGAGGAAGTCTGGCACCTGGGCCAC CCTGGCAGCCTGGATGAAACCACCTATGAGAGGCTGG CTGAGGAAACCCTGGACAGCCTGGCTGAGTTCTTTGA GGACCTGGCTGACAAGCCCTACACCTTTGAGGACTAT GATGTGAGCTTTGGCTCTGGGGTGCTGACTGTGAAGC TGGGGGGGGACCTGGGCACCTATGTGATCAACAAGCA GACCCCCAACAAGCAGATCTGGCTGAGCAGCCCCAGC	hFXNco

	TCTGGCCCCAAGAGATATGACTGGACTGGCAAGA GGGTGTACAGCCATGATGGGGTGAGCCTGCATGAGCT GCTGGCTGCTGAGCTGACCAAGGCCCTGAAGACCAAG CTGGACCTGAGCAGCCTGGCCTACTCTGGCAAGGATG CCTGA	
--	--	--

En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 85 % (por ejemplo, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. Por ejemplo, en algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 86 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 87 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 88 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 89 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 91 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 92 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 93 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 94 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 96 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 97 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 98 % idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el AAV tiene una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4.

Como se describe en el presente documento, a continuación, se muestra un vector de AAV2/8 ilustrativo que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 4:

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGACGTCA
TTGTCGATCCTGCAGGCGTACGCCATCCAATGGAAAAGGGGGGGTTGGATTTCGCTT
GTTGCATAGGTTGGTCTCAAACCTCCTGGCCTCAAGTGATTCTCCTGCCTCTGCCTCCC
AAAGTGCTGAGATTACAGGTGTGAGGCACCATGCCAGGTCTCTTACTGTTTGTAATT
AAATACATACACATTTTGTGTGTTTGTGTGCACCTTTATAAAGTCAAAGGTGATAGT
AACCCATTTAAGTTCCTACTCAATTTTACTTTCCAGGGATAACTAACTACTTTTTCTT
TTTGAGATGGAGTCTCGCTGTGTAGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACCATCTCGGC
TCACTGCAAGCTCCTCCTCCCTGGTTCACGCTATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCCAACA

ACTAGGACTACAGGCTCACCTCGCCATACCTGGCTAATTTTTTGTATTTTGTAGTAGAG
 ACAGGGTTTCACTGTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTTGTGATCCGCCT
 GCCTCTGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCAACCTCACCCAGCTGGG
 ATAACACTTTTTTACAGGTTGATATTCTTTTGGACTTTTCCCCTGTGTAAAAATATAC
 5 TATATTTGTTATGTACATATTATGTACATACAGACACAAATTGGACCATTCTCAGTAT
 AATGATTCTCAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGGTGGGGAAGTAGATAATTATGGACA
 TCTTTCCATACTAGCATATCAATATCTACCTCATTCTTTTAATATTTTTTGCTAGTATT
 CCATTGTATGAATGTCCTATGATTTACTTAACCTGTCCATCAATATTTGTTTCCAGGT
 TTTTGCTATTATAATGCTGCTGCAAAGTACATCCTCACACATCTTTATTTTGTCTATTC
 10 ATATTTCTGTAAGATAGGTTACTAAAGTTGGAAGTGCCTCAATTAACACTATCATACT
 ATTTTGTTTTTTAATTTTAATTTTTTTAAAAAATGTAAAATGTGCAATTTCAAGAGGAG
 AAACCTGAACACAAGGAGCAAAATCTATTTTTATAACATCCTATTAAAAGCTTGCTT
 TACATAAAGATTTTGAAAGAATAGCATAAATAACAAGATTTCTATTTTAATTGGATTC
 TTAGGGCTAATAAAATAATCAGCCTTAGCACTTATTTATTTATTTTTTTTTTGAGAGGGA
 15 GTCTCGCTCTGTTGTCCATGCTGGAGTGCAGTGGCGTGATCTCGGCTCACTGCAAGC
 TCCACCTCATGAGTTCACACCATTCTCCTGCCTCAGTCTCCCGAGTAGCTGGGACTCC
 AGGCGCCCTCTACAAAGCCCGTCTAATTTTTTTTTGTATTTTGTAGTAGAGACAGGGTTT
 CACTGTGTTAGCCAGGATGGTCTTGATCTCCTGACCTTGTGATCTGCCCCGCTCGGCC
 TCCCAAAGTGCTGGGATTATAGGCTTGAGCCACTGCTCCCGGCCAGCACTTATTTTT
 20 ATAATTCTTCATGATTACTGTGTTACTGTCCCATGGGCCGCCAGGGCCAGCTAGGTT
 GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC
 CCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG
 GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCCTAGCACGCGTAGAATCAGAAAATCT
 GAGAAGAAAACCTTAAAAACCTTTGAATCTAACCTACTCAAATAAACTTTGAATATAT
 25 TTATTGAAATATTTAATTTGTTTATTTTTTATTTTTTTATTTTAGAGACAAGGTCTCAC
 TAAAGTGCAGGCTAGAGTGCAGTGACACAATCATGGCTATGGCTCACTGCAACCTC
 AAACCTCCTGGGCTCAAGCGATTCTGTTGCCTTAGGTTCGCCAGGAGCTGGCACTACA
 GGTGCCACCACACCTGGCTTTTTTGTGTTTTTTTTTTGGGTAGAGAAGGGGATTTGG
 TATGTTGCTTAGGCTGATCTTGAAGTACGCTCACGCAATCCTGCTTCGGCTTCCAAA
 30 ATGTTGGGATTATAGGCATGAGCCATGCGCCTGACCTTGATTACCTCGATGATGTGT
 ATGTCATACATTGGAGGGCAAAGACATCTCTGAATTCCTCACAACAGCCATGGCAG
 GGGGCAGGTACCCATGTTACAGATGACAGACTGATGCATAGAGAAGTTAAGTCGTG
 GGGAGTTTACTTTCTCCTAAATTGTCCTGTTACTAGATGAATTTGTTTTTGTTCATTT
 TGTTTTGTTTTTGGAGACAGAGTCTCATGTTGTCACCCAGACTGGAGTGCAGTGGCTCC
 35 ATCTCGGCTCACTATAGCCTCCGCCTCCTGAGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCT
 CCAAAGTAGCTGGGTGCATGCCACCACGCCTGGCTAATTTTTGTATTTTGTAGTATAG
 ATGGGGTTTCAACCATGTTGGCCAGACTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAAGTGATCCA
 CCCC GCGCTTAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTATAGGCGTGAGCCACCACACCAGG
 CCATGAATTTGTTTTCAATATTTATTTATTTTGTATTTTCTATTTTGTAGATGGAGTCT
 40 CGCTCTGCTGTCCAGGCTAGAGTGCAGTGGTGTGATCTTGGCTCACTGTAGCCTCCA
 CCTCCTGAGTTCAAGTGATTCTCCTGCCTTAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGG

CGCCACCATCACACCCGGCTAATTTTTGTATTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCAT
 GTTGGCCACGCTGGTCTCAAACCTGACCTCAATTGATCCACCCACCTTGACCTCCCAA
 AGTGCTGGGATTACAGACCTGAGCCACAGCGCCCAGCCCTTCAATATTTATTTAAAT
 TTGCCTGCTGGCTAACTTCTCATTGCACCTGGGCTCTAGTGTAATTAAATTACTTCAT
 5 TCTCTTTTTAAAACTTTTTACTTTTTTCTTTTTTGTGTTTTTCATTCTCTTATCTACGAG
 AGCCACAATACTTGAAGACACCAATTGATACCCCTTAGTCACATCTGAGCTAAACAC
 TTTCAGTTCCTACAGCTGTTTCTTAATCTTAGGTCACATGGTTTCTTCCCATGCTGTTT
 TCCCAGACAGCATTTTTTTTTTTTTTTGAGAGTCTCACTCTGTTGCCCAGGCTGGAGT
 ACAGTAGCACAATCTCAGTTTACTGCAACCTCTGCCTTCCAGGTTTCCAGGTGATTCTCC
 10 TGCTTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACTACAGGAGCGTGCCACCACGCCCCGGCTAAT
 TTTTGTATTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTC
 CTTACCTTGTGATCCGCCTGTCTCGGCCTCCCAAAGTGGTGGGATTACAGGTGTGAG
 CCACCACGCCTGGTTCTTACATTTATTTTGAATAAAATTTAGATACACAGAAAAGTT
 GCAAAGATAAGAGTTTCCATATAACCCTCACCCAGTTTGCCTTCCCTAATGTTTCGCG
 15 TGGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCGCAGGGACGCGGCT
 GCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATTCT
 TCACGTCCGTTTCGCAGCGTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCCTTGTGGGGCCCCCGG
 CGACGCTTCTGCTCCGCCCCTAAGTCGGGAAGGTTCCCTTGCGGTTTCGCGGCGTGCC
 GGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGC
 20 CAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTC
 AGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCGCGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGT
 GGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCCCTGCCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCT
 CCGGAGCGCACGTGCGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCC
 CAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTTAAGTGTATAATGTGTAAACTACTGATTCT
 25 AATTGTTTCTCTCTTTTAGATTCCAACCTTTAGAACTGACCACCATGTGGACCCTGGG
 CAGGAGGGCTGTGGCTGGCCTGCTGGCCAGCCCCAGCCCTGCCCAGGCCCAGACCC
 TGACCAGGGTGCCCAGGCCTGCTGAGCTGGCCCCCTGTGTGGCAGGAGGGGCCTG
 AGGACTGACATTGATGCCACCTGCACCCCCAGGAGGGCCAGCAGCAACCAGAGGGG
 CCTGAACCAGATCTGGAATGTGAAGAAGCAGTCTGTGTACCTGATGAACCTGAGGA
 30 AGTCTGGCACCCCTGGGCCACCCTGGCAGCCTGGATGAAACCACCTATGAGAGGCTG
 GCTGAGGAAACCCTGGACAGCCTGGCTGAGTTCTTTGAGGACCTGGCTGACAAGCC
 CTACACCTTTGAGGACTATGATGTGAGCTTTGGCTCTGGGGTGCTGACTGTGAAGCT
 GGGGGGGGACCTGGGCACCTATGTGATCAACAAGCAGACCCCCAACAAGCAGATCT
 GGCTGAGCAGCCCCAGCTCTGGCCCCAAGAGATATGACTGGACTGGCAAGAACTGG
 35 GTGTACAGCCATGATGGGGTGAGCCTGCATGAGCTGCTGGCTGCTGAGCTGACCAA
 GGCCCTGAAGACCAAGCTGGACCTGAGCAGCCTGGCCTACTCTGGCAAGGATGCCT
 GAGATATCGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATA
 AGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAG
 GGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTTAAAGCGGCCAACATCTTACATTATCATGGTACATT
 40 TGTCAAAACTAAGACACTTTTTTTTCTAATAAAAATAATAGAGATGAGGTCTCACTA
 TATTGTCCAGGCTGGTCTCAAACCTTTGAGCTCAAGCAGTCCTCCCACCTCCACCTCCC

AAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAACCACCACACCCAGCCTACATTGTTATGTTACT
 ACTCTCCAGACTATTCAGATTTTCACCAATTTTTCTATCCATAGCCTTTTTTTCTGTTTC
 AGGATCCAATTCAGGACACCATACCACTGTATGGTTAATTTTAAAAACTCAAATGTT
 GGGAGTTTGCTTTATCACCGCTGTATCTTATCATCTCGTTAGATAATTTTGTATCTGG
 5 AGCCTGCTCTCTAGCATGAATAAGTAAAAATGTGGACTTTGTGATTTACAGATCTGA
 TATTTATGTTTTTGTGTTTTTACTTTAAGTACTAGACAAAGTAAATCTAAGAGGTCTG
 TGGTACTGCACTAGAGAATTGTTACTTGATTATGGTGGGCCAAGTGGTTGAAAATTT
 ACCTAACAATACTATAACATAGGCCATATTTTCATAATTTTAATCACAAGGCAATTGT
 GAAAATTTTATCAAATGTTTAATAAAAAGCAAGGTGAAGAAGGTGATAGCTTTAAATT
 10 TACTTGCCATTTTTGGGCACACAAAAGTAATTTGCTCTGCCACTTAGAGTTATAAGG
 TCAAAGTGGGAGTAAATAATCTTTGTATTAGGAATGCGGCCGCTCTAGGAGGAACC
 CCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC
 CCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGGCAGCCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC
 GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTAGAGGCCGCCAGGGCCATATTTCTCAAT
 15 TTTTAAATTTTTCAAAAAAATTAATCCTTAATGTGCATATTTTTGAATTGTTAATATA
 ACTTTTTGAGGTGATGTCTTCATGTGTTTCAACTACTTAAAAACTTTTAAACAGTATA
 TAATAAAAAATCTTCCAGGCCACTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGA
 GGTGGGCAGATCACCTGAGGGCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAATATATATAT
 ATTCATATATTCATATATATATATATATATTCATATATTCATATATATATATTCATATATT
 20 CATATATATATATATATATATATATATAGCAAAACCTCATCTCTAATAAAATACAAAAA
 TTAGCTGAGCGTGGTGATGGATGCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCA
 GGAGAATCTCTTGAACCTGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATGGTGCCACT
 GCCCTCCAGCCTGAGTGACAGAGCGAGACTCGGTCTCCAAAAAAAAACAACAAAAA
 AATCTTCCATCCTTGTCTCCCATCCACCCCTTCCCCCAGCATGTACTTGCAGACTTT
 25 ATGCATATACAGTGAGTACTGTATATACACAAATAATAAAAAAATCATATATATAAT
 ATATGTAATTCCCCTTTACATGAAAGGTAGCACACTGGTCTGTACAGTCTGTCTGCA
 CTGTGCTATTTCACTTTATATTTTTATAGTTTGACAGAGTTCTAACATTTCTTTTTTTT
 TTTTTTTAACAGAGTCTTGTTCCCTGATTGTTAAATTTTAAAGCATCCTAAAGTTTGGT
 TTCACACTTGAATGAATACCATGTAAGGATTCACTTACATAGATGTGGTTGCCTGAA
 30 TCTTAAGAATAAAATAACATTGTTTGTATTTATTTAAATTAGTGTTCCTTTTATGGTT
 TGCCTGAAAGCACAAACAAAATCCTCACCAAGATATTACAATTATGACTCCCATACAG
 GTAAACTGTTTAGAGATTGGCAAGCACCTTTTAATGAAAGGAGTCAGCCAGCTTAGT
 GTGCAGTATTTATTTCTGCCGGAAGAGGGAGCTTCAGGGACAGACTTTGGTTTAGTC
 ATGAAGCCTCCAGCACTCCCAAGCGTTGTGGTTGACCAAGCAATTTATGCTTTTAC
 35 CTTTCTACTTCCAGAGGCTTGTTTACTTATCAGTAAGCATTAATTTAGTGTCCCCTCA
 GATGCCTTTTACTTTCTTCTTTTCTGCCTAGAATAAGCTGCTCTTCCAATTTTGCAGCT
 ACATGTTTCCACCCCAGTTGGAATTTCTCCATAACATCCATTGTAGCTATCCTTCAAT
 CTACAGCCTCTATTTCTGTATAGCTGGTCAGGTCTAATCCCTCAAATACTCTGTC
 CCCTGCTTCCCTTATCTGCTGGCCACCTTTTTCCCCCACATACACTGCCATGTCCC
 40 ACCCTTCACTCAAGTTGTTCCCTGCCACCTCAACAAATTTAAGTCCATAAAACCATC
 CAATGGGCTCGAGCCCTGCAGGATCATTGTCACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA

GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC
 TGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
 TATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGA
 CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
 5 TCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGG
 CTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATCG
 TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
 CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGC
 CTAACCTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAG
 10 TTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTA
 GCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAG
 AAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTT
 AAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATT
 AAAAATGAAGTTTTTAAATCAAGCCCAATCTGAATAATGTTACAACCAATTAACCAAT
 15 TCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
 TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCG
 AGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCA
 ACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAA
 TCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTC
 20 CAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACC
 AAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTA
 AAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCG
 CATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTT
 TCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCT
 25 TGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTG
 TAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGG
 GCTTCCCATAACAAGCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCC
 ATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGACGTTTC
 CCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTT
 30 ATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACA
 CGGGCCAGAGCTGCA

En algunas modalidades, los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección de 5' a 3' como ITR1-*FXN*-ITR2. En algunas modalidades, los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección de 5' a 3' como ITR1- P_{Euk} -*FXN*-ITR2. En algunas modalidades, los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección de 5' a 3' como ITR1- P_{Euk} -*FXN*-pA-ITR2. En algunas modalidades, los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección de 5' a 3' como ITR1- P_{Euk} -intrón-*FXN*-pA-ITR2.

En algunas modalidades, los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección de 5' a 3' como ITR1-h*FXN*co-ITR2. En algunas modalidades, los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección de 5' a 3' como ITR1-promotor-h*FXN*co-ITR2. En algunas modalidades, los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección de 5' a 3' como ITR1-promotor-

hFXNco-pA-ITR2. En algunas modalidades, los componentes están unidos operativamente entre sí en una dirección de 5' a 3' como *ITR1-promotor-intrón-hFXNco-pA-ITR2*.

En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb (por ejemplo, de 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb o de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb). Por ejemplo, en algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,0 Kb.

En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,7 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,8 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,9 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,0 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,1 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,2 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-FXN-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,3 Kb.

En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb (por ejemplo, de 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb o de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb). Por ejemplo, en algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,0 Kb.

En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,7 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,8 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,9 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,0 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,1 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,2 Kb. En algunas modalidades, *ITR1-hFXNco-ITR2* juntos tienen una longitud de aproximadamente 4,3 Kb.

En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo *ITR1* e *ITR2* es de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,7 Kb (por ejemplo, aproximadamente 4,0 Kb a aproximadamente 4,6 Kb, aproximadamente 4,1 Kb a aproximadamente 4,5 Kb, aproximadamente 4,2 Kb a aproximadamente 4,4 Kb, o aproximadamente 4,3 Kb). Por ejemplo, en algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre *ITR1* e *ITR2* inclusive es de aproximadamente 4,0 Kb a aproximadamente 4,7 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo *ITR1* e *ITR2* es de aproximadamente 4,1 Kb a aproximadamente 4,7 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo *ITR1* e *ITR2* es de aproximadamente 4,2 Kb a aproximadamente 4,7 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo *ITR1* e *ITR2* es de aproximadamente 4,3 Kb a aproximadamente 4,7 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo *ITR1* e *ITR2* es de aproximadamente 4,4 Kb a aproximadamente 4,7 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo *ITR1* e *ITR2* es de aproximadamente 4,5 Kb a aproximadamente 4,7 Kb.

En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 3,9 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,0 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,1 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,2 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,3 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,4 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,5 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,6 Kb. En algunas modalidades, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 es de aproximadamente 4,7 Kb.

En algunas modalidades, un plásmido (por ejemplo, un vector de transferencia) comprende el AAV, como se describe en el presente documento. En algunas modalidades, el plásmido puede contener uno o más (por ejemplo, dos) espaciadores. Los espaciadores pueden incluir moléculas de ácido nucleico de origen natural o moléculas de ácido nucleico sintéticas. Las moléculas espaciadoras de origen natural se pueden identificar utilizando herramientas web en línea, por ejemplo, el navegador del genoma UCSC, y se pueden seleccionar en función de las características inherentes de la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, la aparición natural de un ácido nucleico adyacente a un sitio de inicio de la transcripción. Se puede diseñar un espaciador para eliminar características potencialmente negativas que pueden producir toxicidad si son introducidas por una partícula viral o suprimir la funcionalidad de la partícula viral. Fuentes ilustrativas de toxicidad y características de supresión de funcionalidad se encuentran en ácidos nucleicos contaminantes que se encuentran frecuentemente adyacentes a ácidos nucleicos que codifican el genoma viral que se va a empaquetar. Estos ácidos nucleicos contaminantes incluyen, entre otros, ácidos nucleicos procariotas (p. ej., bacterianos y baculovirales) (p. ej., origen de replicación, ácidos nucleicos que tienen un contenido de CpG superior al 2 %, marcos de lectura abiertos y sitios de unión de factores de transcripción). En algunas modalidades, los espaciadores están diseñados para minimizar la inclusión de ácidos nucleicos contaminantes. En algunas modalidades, uno o más SS no comprenden un marco de lectura abierto que tenga más de 100 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, uno o más espaciadores no comprenden sitios de unión de factores de transcripción procariotas.

Por ejemplo, en algunas modalidades, el plásmido contiene dos espaciadores, en donde los dos espaciadores incluyen un primer espaciador (SS1) y un segundo espaciador (SS2). En algunas modalidades, SS1 está ubicado en 5' con respecto a ITR1 y el SS2 está ubicado en 3' con respecto a ITR2. En algunas modalidades, SS1 tiene una longitud de aproximadamente 1,0 Kb a aproximadamente 5,0 Kb (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5 Kb, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0 Kb o aproximadamente 3,0 Kb). En algunas modalidades, SS2 tiene una longitud de aproximadamente 1,0 Kb a aproximadamente 5,0 Kb (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5 Kb, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0 Kb o aproximadamente 3,0 Kb).

Métodos de tratamiento

Ataxia de Friedreich

La ataxia de Friedreich es una enfermedad neuro y cardiodegenerativa, que resulta de alteraciones

hereditarias en el gen de la frataxina que disminuyen la expresión del polipéptido de la frataxina. La identificación de agentes eficaces para el tratamiento de la ataxia de Friedreich se ha visto obstaculizada anteriormente por la dificultad asociada con lograr la expresión de cantidades terapéuticamente efectivas de frataxina en los tejidos afectados.

- 5 La invención se basa en parte en la identificación de un nuevo uso para varios agentes existentes, es decir, para tratar la ataxia de Friedreich u otras enfermedades neurodegenerativas. Estos agentes incluyen moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento. Estos agentes aumentan los niveles de proteína frataxina, la deficiencia característica de la ataxia de Friedreich, en un modelo de ratón transgénico de ataxia de Friedreich.
- 10 Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen personas con riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas, así como pacientes que actualmente muestran síntomas. Generalmente, el sujeto es homocigoto para una mutación (una expansión GAA o mutación puntual) que inhibe o reduce los niveles de expresión de frataxina. Para sujetos homocigotos para una mutación en el gen de la frataxina que resulta en niveles de expresión insuficientes del polipéptido de frataxina, el riesgo de desarrollar síntomas de
- 15 ataxia de Friedreich generalmente aumenta con la edad. En consecuencia, en sujetos asintomáticos homocigotos para una mutación en el gen de frataxina que resulta en niveles de expresión insuficientes del polipéptido de frataxina, en determinadas modalidades, se contempla la aplicación profiláctica para sujetos mayores de 3 años de edad, por ejemplo, en sujetos mayores de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o años de edad. También pueden tratarse sujetos con una aparición tardía o muy
- 20 tardía de la enfermedad, como se describe anteriormente.

En algunas modalidades, el sujeto presenta síntomas de ataxia de Friedreich, por ejemplo, debilidad muscular en brazos y piernas, pérdida de coordinación, pérdida de reflejos tendinosos profundos, pérdida de respuestas plantares extensoras, pérdida de sensación vibratoria y propioceptiva, deterioro de la visión, movimientos oculares involuntarios y/o rápidos, discapacidad auditiva, dificultad para hablar, curvatura

- 25 de la columna (escoliosis), arcos plantares altos (deformidad del pie cavo), intolerancia a los carbohidratos, diabetes mellitus y trastornos cardíacos (p. ej., fibrilación auricular, taquicardia (frecuencia cardíaca rápida), miocardiopatía hipertrófica, cardiomegalia, hipertrofia simétrica, soplos cardíacos y defectos de conducción cardíaca).

En algunas modalidades, la divulgación proporciona un método para tratar la Ataxia de Friedreich en un

- 30 paciente humano que lo necesita, donde el método incluye administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido, descrito en el presente documento.

En algunas modalidades, la divulgación proporciona un método para aumentar la expresión de frataxina en un paciente humano diagnosticado con Ataxia de Friedreich, donde el método incluye administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido, descrito en el presente documento.

35 *Monitoreo de la eficacia*

La eficacia clínica se puede monitorear utilizando biomarcadores, entre otros métodos. Los marcadores medibles para monitorear la eficacia incluyen, entre otros, monitorear uno o más de los síntomas físicos de la ataxia de Friedreich, que incluye, debilidad muscular en brazos y piernas, pérdida de coordinación, pérdida de reflejos tendinosos profundos, pérdida de respuestas plantares extensoras, pérdida de sensación

- 40 vibratoria y propioceptiva, deterioro de la visión, movimientos oculares involuntarios y/o rápidos, discapacidad auditiva, dificultad para hablar, curvatura de la columna (escoliosis), arcos plantares altos

(deformidad del pie cavo), intolerancia a los carbohidratos, diabetes mellitus y trastornos cardíacos (p. ej., fibrilación auricular, taquicardia (frecuencia cardíaca rápida), miocardiopatía hipertrófica, cardiomegalia, hipertrofia simétrica, soplos cardíacos y defectos de conducción cardíaca). La observación de la estabilización, mejora y/o reversión de uno o más síntomas indica que el régimen de tratamiento o prevención es eficaz. La observación de la progresión, aumento o exacerbación de uno o más síntomas indica que el régimen de tratamiento o prevención no es eficaz. Un biomarcador preferido para evaluar el tratamiento en la ataxia de Friedreich es el nivel de frataxina. Este marcador se evalúa preferiblemente a nivel de proteína, pero la medición del ARNm que codifica la frataxina también se puede utilizar como una medida sustituta de la expresión de frataxina. Dicho nivel se puede medir en una muestra de sangre.

Tal nivel se reduce en sujetos con ataxia de Friedreich en relación con una población de control de individuos no enfermos. Por lo tanto, un aumento en el nivel proporciona una indicación de una respuesta favorable al tratamiento, mientras que un nivel sin cambios o en disminución proporciona una indicación de una respuesta al tratamiento desfavorable o al menos no óptima.

La eficacia también puede determinarse determinando el nivel de esclerosis y/o degeneración de los ganglios de la raíz dorsal, los tractos espinocerebelosos, los tractos corticoespinales laterales y las columnas posteriores. Esto se puede lograr utilizando técnicas de imágenes médicas, por ejemplo, imágenes por resonancia magnética o técnicas de tomografía, por ejemplo, exploración por tomografía computarizada (CT) o tomografía axial computarizada (CAT). Los sujetos que mantienen el mismo nivel o una reversión de la esclerosis y/o degeneración indican que el régimen de tratamiento o prevención es eficaz. Por el contrario, los sujetos que muestran un nivel más alto o una progresión de esclerosis y/o degeneración indican que el régimen de tratamiento o prevención no ha sido eficaz.

En determinadas modalidades, los métodos de monitoreo pueden implicar determinar un valor inicial de un biomarcador medible o parámetro de enfermedad en un sujeto antes de administrar una dosis de los polinucleótidos o plásmidos (por ejemplo, un vector viral) descritos en el presente documento, y comparar esto con un valor para el mismo biomarcador o parámetro medible después de un ciclo de tratamiento.

En otros métodos, se determina un valor de control (es decir, una media y una desviación estándar) del biomarcador o parámetro medible para una población de control. En determinadas modalidades, los individuos de la población de control no han recibido tratamiento previo y no tienen ataxia de Friedreich, ni tienen riesgo de desarrollar ataxia de Friedreich. En tales casos, si el valor del biomarcador medible o parámetro clínico se acerca al valor de control, entonces el tratamiento se considera eficaz. En otras modalidades, los individuos de la población de control no han recibido tratamiento previo y han sido diagnosticados con ataxia de Friedreich. En dichos casos, si el valor del biomarcador medible o parámetro clínico se acerca al valor de control, entonces el tratamiento se considera ineficaz.

En otros métodos, a un sujeto que actualmente no está recibiendo tratamiento pero que se ha sometido a un ciclo de tratamiento previo se le controla uno o más de los biomarcadores o parámetros clínicos para determinar si se requiere reanudar el tratamiento. El valor medido de uno o más de los biomarcadores o parámetros clínicos en el sujeto se puede comparar con un valor previamente alcanzado en el sujeto después de un ciclo de tratamiento previo. Alternativamente, el valor medido en el sujeto se puede comparar con un valor de control (media más desviación estándar) determinado en una población de sujetos después de someterse a un curso de tratamiento. Alternativamente, el valor medido en el sujeto se puede comparar con un valor de control en poblaciones de sujetos tratados profilácticamente que

permanecen libres de síntomas de enfermedad, o poblaciones de sujetos tratados terapéuticamente que muestran una mejora de las características de la enfermedad. En dichos casos, si el valor del biomarcador medible o parámetro clínico se acerca al valor de control, entonces el tratamiento se considera eficaz y no debe reanudarse. En todos estos casos, una diferencia significativa en relación con el nivel de control (es decir, más que una desviación estándar) es un indicador de que el tratamiento debe reanudarse en el sujeto. En algunas modalidades, al administrar una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, el paciente muestra un cambio en los niveles de frataxina en sangre total. Por ejemplo, en algunas modalidades, el paciente muestra el cambio en los niveles de frataxina en sangre total aproximadamente 12 semanas después de la administración.

En algunas modalidades, al administrar una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, el paciente muestra una reducción en la puntuación total de la Escala de calificación de ataxia de Friedreich (FARS). Por ejemplo, en algunas modalidades, el paciente muestra la reducción en la puntuación total FARS aproximadamente 12 semanas después de la administración.

Métodos para medir la expresión génica

El nivel de expresión de un gen expresado por una sola célula o tipo de célula (p. ej., una célula que pertenece a un determinado tejido) se puede determinar, por ejemplo, evaluando la concentración o abundancia relativa de transcritos de ARN (p. ej., ARNm)) derivado de la transcripción de un gen de interés. Además, o alternativamente, la expresión génica se puede determinar evaluando la concentración o abundancia relativa de proteína producida por la transcripción y traducción de un gen de interés. Las concentraciones de proteínas también se pueden evaluar mediante ensayos funcionales, como ensayos enzimáticos o ensayos de transcripción genética en el caso de que el gen de interés codifique una enzima o un modulador de la transcripción, respectivamente. Las secciones que siguen describen técnicas ilustrativas que pueden usarse para medir y clasificar los niveles de expresión de genes en una célula, tipo de célula o población de células de interés, por ejemplo, a nivel de una sola célula o una población de células. La expresión de genes en una muestra se puede analizar mediante varias metodologías, muchas de las cuales son conocidas en la técnica y comprendidas por el experto en la técnica, incluidas, entre otras, secuenciación de ácidos nucleicos, análisis de micromatrices, proteómica, hibridación situ (p. ej., hibridación fluorescente in situ (FISH)), ensayos basados en amplificación, hibridación in situ, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), análisis Northern y/o análisis por PCR de ARNm.

(i) Detección de ácido nucleico

Los conjuntos de datos basados en ácidos nucleicos adecuados para el análisis de la expresión génica específica de células diana pueden tener la forma de un perfil de expresión génica, que representa la identidad de los genes expresados en una célula de interés y el grado en que se expresa el gen, que se puede utilizar para determinar el orden de clasificación de los niveles de expresión génica dentro de una célula, tipo de célula o población de células de interés. Dichos perfiles pueden incluir datos de secuenciación del transcriptoma completo (p. ej., datos de RNA-Seq), paneles de ARNm, ARN no codificantes o cualquier otra secuencia de ácidos nucleicos que pueda expresarse a partir de ADN genómico. Otros conjuntos de datos de ácidos nucleicos adecuados para su uso con los métodos descritos en el presente documento pueden incluir datos de expresión recopilados mediante técnicas basadas en imágenes (por ejemplo, transferencia Northern o transferencia Southern conocidas en la técnica). El

análisis de transferencia Northern es una técnica convencional bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, segunda edición, 1989, Sambrook, Fritsch, Maniatis, Cold Spring Harbor Press, 10 Skyline Drive, Plainview, NY 11803-2500, cuya descripción se incorpora a la presente como referencia. Los protocolos típicos para evaluar el estado de genes y productos

5 génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel et ál., eds., 1995, *Curr Protoc Mol Biol*, Unidades 2 (Transferencia Northern), 4 (Transferencia Southern), 15 (electrotransferencia) y 18 (Análisis por PCR), cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia.

Los perfiles de expresión genética que se analizarán junto con los métodos descritos en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, datos de micromatrices o datos de secuenciación de ácidos

10 nucleicos producidos mediante un método de secuenciación conocido en la técnica (por ejemplo, secuenciación de Sanger y métodos de secuenciación de última generación, también conocidos como secuenciación de alto rendimiento o secuenciación profunda). Las tecnologías de secuenciación de última generación ilustrativas incluyen, entre otras, secuenciación Illumina, secuenciación Ion Torrent, secuenciación 454, secuenciación SOLiD y plataformas de secuenciación de nanoporos. También se

15 pueden utilizar métodos adicionales de secuenciación conocidos en la técnica. Por ejemplo, los niveles de expresión de ARNm se pueden determinar usando RNA-Seq (por ejemplo, como se describe en Mortazavi et ál., *Nat. Methods* 5:621-628 (2008), cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad). RNA-Seq es una tecnología sólida conocida en la técnica para monitorear la expresión mediante la secuenciación directa de las moléculas de ARN en una muestra. Brevemente, esta

20 metodología puede implicar la fragmentación del ARN a una longitud promedio de 200 nucleótidos, la conversión a ADNc mediante cebado aleatorio y la síntesis de ADNc bicatenario (por ejemplo, utilizando el kit de síntesis de ADNc bicatenario Just de Agilent Technology). Luego, el ADNc se convierte en una biblioteca molecular para secuenciación mediante la adición de adaptadores de secuencia para cada biblioteca (por ejemplo, de Illumina®/Solexa), y las lecturas de 50 a 100 nucleótidos resultantes se

25 mapean en el genoma.

Los niveles de expresión génica se pueden determinar utilizando plataformas basadas en micromatrices (p. ej., matrices de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)), ya que la tecnología de micromatrices ofrece alta resolución. Los detalles de varios métodos de micromatrices se pueden encontrar en la literatura. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6,232,068 y Pollack et ál., *Nat. Genet.* 23:41-46

30 (1999), cuyas descripciones se incorporan a la presente como referencia en su totalidad. Utilizando micromatrices de ácidos nucleicos, las muestras de ARNm se transcriben de forma inversa y se etiquetan para generar ADNc. Las sondas pueden entonces hibridarse con uno o más ácidos nucleicos complementarios dispuestos e inmovilizados sobre un soporte sólido. La matriz se puede configurar, por ejemplo, de manera que se conozca la secuencia y posición de cada miembro de la matriz. La hibridación

35 de una sonda marcada con un miembro particular de la matriz indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. El nivel de expresión se puede cuantificar según la cantidad de señal detectada a partir de complejos hibridados sonda-muestra. Un experimento típico de micromatrices implica los siguientes pasos: 1) preparación de una diana marcada con fluorescencia a partir de ARN aislado de la muestra, 2) hibridación de la diana marcada con la micromatriz, 3) lavado, tinción y escaneo de la matriz,

40 4) análisis de la imagen escaneada y 5) generación de perfiles de expresión génica. Un ejemplo de procesador de micromatrices es el sistema Affymetrix GENECHIP®, que está disponible comercialmente

y comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Se pueden utilizar otros sistemas como conoce un experto en la técnica.

También se pueden usar ensayos basados en amplificación para medir el nivel de expresión de uno o más marcadores (por ejemplo, genes). En tales ensayos, las secuencias de ácido nucleico del gen actúan como molde en una reacción de amplificación (por ejemplo, PCR, como qPCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de amplificación es proporcional a la cantidad de molde en la muestra original. La comparación con controles apropiados proporciona una medida del nivel de expresión del gen, correspondiente a la sonda específica utilizada, de acuerdo con los principios descritos en este documento. Los métodos de qPCR en tiempo real que utilizan sondas TaqMan son bien conocidos en la técnica. Se proporcionan protocolos detallados para qPCR en tiempo real, por ejemplo, en Gibson et ál., *Genome Res.* 6:995-1001 (1996) y en Heid et ál., *Genome Res.* 6:986-994 (1996), cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia. Los niveles de expresión génica como se describen en este documento pueden determinarse mediante tecnología RT-PCR. Las sondas utilizadas para la PCR pueden marcarse con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales o una enzima.

(ii) Detección de proteínas

La expresión génica se puede determinar adicionalmente midiendo la concentración o abundancia relativa de un producto proteico correspondiente codificado por un gen de interés. Los niveles de proteína se pueden evaluar utilizando técnicas de detección estándar conocidas en la técnica. Los ejemplos de análisis de expresión de proteínas que generan datos adecuados para su uso con los métodos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, enfoques proteómicos, análisis inmunohistoquímico y/o de transferencia Western, inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ensayo de inmunofiltración ligado a enzimas (ELIFA), espectrometría de masas, inmunoensayo espectrométrico de masas y ensayos de actividad enzimática bioquímica. En particular, los métodos proteómicos se pueden utilizar para generar conjuntos de datos de expresión de proteínas a gran escala en multiplex. Los métodos proteómicos pueden utilizar espectrometría de masas para detectar y cuantificar polipéptidos (p. ej., proteínas) y/o micromatrices de péptidos utilizando reactivos de captura (p. ej., anticuerpos) específicos de un panel de proteínas diana para identificar y medir los niveles de expresión de las proteínas expresadas en una muestra (p. ej., una muestra de una sola célula o una población de múltiples células).

Las micromatrices de péptidos ilustrativas tienen una pluralidad de polipéptidos unidos a un sustrato, siendo detectable por separado la unión de un oligonucleótido, un péptido o una proteína a cada uno de la pluralidad de polipéptidos unidos. Alternativamente, la micromatriz de péptidos puede incluir una pluralidad de aglutinantes, incluidos, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, aglutinantes de presentación en fagos, aglutinantes de dos híbridos de levadura, aptámeros, que pueden detectar específicamente la unión de oligonucleótidos, péptidos o proteínas específicos. Se pueden encontrar ejemplos de matrices de péptidos en las patentes estadounidenses números 6,268,210, 5,766,960, y 5,143,854, cuyas descripciones se incorporan en el presente documento como referencia.

La espectrometría de masas (MS) se puede utilizar junto con los métodos descritos en el presente documento para identificar y caracterizar el perfil de expresión génica de una población de una sola célula o de varias células. Se puede utilizar cualquier método de MS conocido en la técnica para determinar,

detectar y/o medir un péptido o péptidos de interés, por ejemplo, LC-MS, ESI-MS, ESI-MS/MS, MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF/TOF-MS, MS en tándem y similares. Los espectrómetros de masas generalmente contienen una fuente de iones y una óptica, un analizador de masas y un sistema electrónico de procesamiento de datos. Los analizadores de masas incluyen espectrómetros de masas de barrido y de haz de iones, como los de tiempo de vuelo (TOF) y cuádruples (Q), y espectrómetros de masas de captura, como los de trampa de iones (IT), Orbitrap y resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier (FT-ICR), se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento. Los detalles de varios métodos de MS se pueden encontrar en la literatura. Véase, por ejemplo, Yates et ál., *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11:49-79 (2009), cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

Antes del análisis de MS, las proteínas de una muestra se pueden digerir primero en péptidos más pequeños mediante digestión química (p. ej., mediante escisión con bromuro de cianógeno) o enzimática (p. ej., tripsina). Las muestras de péptidos complejos también se benefician del uso de técnicas de separación inicial, por ejemplo, 2D-PAGE, HPLC, RPLC y cromatografía de afinidad. La muestra digerida y, opcionalmente, separada, se ioniza utilizando una fuente de iones para crear moléculas cargadas para su posterior análisis. La ionización de la muestra se puede realizar, por ejemplo, mediante ionización por electropulverización (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización, ionización electrónica, bombardeo atómico rápido (FAB)/ionización secundaria líquida (LSIMS), desorción láser asistida por matriz/ionización (MALDI), ionización de campo, desorción de campo, ionización por termopulverización/plasmaspray e ionización por haz de partículas. Los expertos en la técnica conocen información adicional relacionada con la elección del método de ionización.

Después de la ionización, los péptidos digeridos pueden fragmentarse para generar espectros MS/MS característicos. La MS en tándem, también conocida como MS/MS, puede ser particularmente útil para los métodos descritos en este documento que permiten la ionización seguida de la fragmentación de una muestra de péptido complejo, como una muestra obtenida de una población multicelular descrita en este documento. La MS en tándem implica múltiples pasos de selección de MS, con alguna forma de fragmentación de iones entre las etapas, lo que se puede lograr con elementos individuales del espectrómetro de masas separados en el espacio o usando un único espectrómetro de masas con los pasos de MS separados en el tiempo. En MS tándem espacialmente separados, los elementos están físicamente separados y distintos, con una conexión física entre los elementos para mantener un alto vacío. En la MS en tándem separada temporalmente, la separación se logra con iones atrapados en el mismo lugar, con múltiples pasos de separación que se llevan a cabo a lo largo del tiempo. Los espectros MS/MS característicos se pueden comparar con una base de datos de secuencias peptídicas (p. ej., SEQUEST). Las modificaciones postraduccionales de los péptidos también se pueden determinar, por ejemplo, buscando espectros en una base de datos, permitiendo al mismo tiempo modificaciones peptídicas específicas.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones, moléculas de ácido nucleico y plásmidos descritos en el presente documento se pueden formular en composiciones farmacéuticas para la administración a un paciente, tal como un paciente humano que presenta o está en riesgo de padecer Ataxia de Friedreich, en una forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo*. Una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que incluye uno o más transgenes descritos en el

presente documento, normalmente incluye un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica puede incluir (por ejemplo, consistir en), por ejemplo, una solución salina estéril y un ácido nucleico. La solución salina estéril suele ser una solución salina de calidad farmacéutica. Una composición farmacéutica puede incluir (p. ej., consistir en), p. ej., agua esterilizada y un ácido nucleico. El agua esterilizada suele ser agua de calidad farmacéutica. Una composición farmacéutica puede incluir (por ejemplo, consistir en), por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y un ácido nucleico. El PBS estéril suele ser un PBS de calidad farmacéutica.

En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas incluyen una o más composiciones o moléculas de ácido nucleico y uno o más excipientes. En determinadas modalidades, los excipientes se seleccionan de agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

En determinadas modalidades, se pueden mezclar moléculas de ácido nucleico con sustancias inertes y/o activas farmacéuticamente aceptables para la preparación de formulaciones o composiciones farmacéuticas. Las composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de diversos criterios que incluyen, de modo no taxativo, la vía de administración, el grado de la enfermedad o la dosis que se ha de administrar.

En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas que incluyen una molécula de ácido nucleico abarcan cualquier sal farmacéuticamente aceptable del inhibidor, ésteres del inhibidor o sales de dichos ésteres. En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas que incluyen una molécula de ácido nucleico, tras la administración a un sujeto (por ejemplo, un ser humano), son capaces de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la descripción también se dirige a sales farmacéuticamente aceptables de inhibidores, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de esos profármacos, y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, de modo no taxativo, sales de sodio y potasio. En determinadas modalidades, los profármacos incluyen uno o más grupos conjugados unidos a una molécula de ácido nucleico, en donde el grupo conjugado se escinde mediante nucleasas endógenas dentro del cuerpo.

Los restos lipídicos se han utilizado en terapias con ácidos nucleicos en una variedad de métodos. En ciertos métodos de este tipo, el ácido nucleico se introduce en liposomas o lipoplexos preformados hechos de mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. En ciertos métodos, los complejos de ADN con lípidos mono o policationicos se forman sin la presencia de un lípido neutro. En determinadas modalidades, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a una célula o tejido particular. En determinadas modalidades, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a un tejido adiposo. En determinadas modalidades, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a un tejido muscular.

En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas incluyen un sistema de administración. Los ejemplos de sistemas de administración incluyen, entre otros, liposomas y emulsiones. Ciertos sistemas de administración son útiles para preparar ciertas composiciones farmacéuticas, incluidas aquellas que incluyen compuestos hidrófobos. En determinadas modalidades, se usan ciertos solventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido.

En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas incluyen una o más moléculas de

administración específicas de tejido diseñadas para administrar uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención a tejidos o tipos de células específicos. Por ejemplo, en determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas recubiertos con un anticuerpo específico de tejido.

En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas incluyen un sistema de cosolvente.

5 Algunos de estos sistemas cosolventes incluyen, por ejemplo, alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. En determinadas modalidades, dichos sistemas cosolventes se utilizan para compuestos hidrófobos. Un ejemplo no limitante de dicho sistema cosolvente es el sistema cosolvente VPD, que es una solución de etanol absoluto que incluye 3 % p/v de alcohol bencílico, 8 % p/v del tensioactivo no polar Polysorbate 80™ y 65 % p/v de polietilenglicol 300. Las
10 proporciones de dichos sistemas cosolventes pueden variarse considerablemente sin alterar significativamente sus características de solubilidad y toxicidad. Además, se puede variar la identidad de los componentes cosolventes: por ejemplo, se pueden usar otros tensioactivos en lugar de Polysorbate 80™; se puede variar el tamaño de la fracción de polietilenglicol; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, por ejemplo, polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden
15 sustituir a la dextrosa.

En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración oral. En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración bucal. En determinadas modalidades, se prepara una composición farmacéutica para administración mediante inyección (p. ej., intraocular (p. ej., intravítrea), intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal,
20 intracerebroventricular, intraparenquimatosa, etc.). En algunas de tales modalidades, una composición farmacéutica incluye un portador y se formula en una solución acuosa, tal como agua o tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico. En determinadas modalidades, se incluyen otros ingredientes (por ejemplo, ingredientes que ayudan en la solubilidad o sirven como conservantes). En determinadas modalidades, las suspensiones
25 inyectables se preparan utilizando portadores líquidos, agentes de suspensión y similares apropiados. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Ciertos disolventes
30 adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas para inyección incluyen, entre otros, disolventes lipófilos y aceites grasos, tales como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, y liposomas.

Kits

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden proporcionar en un kit para usar en el
35 tratamiento de la ataxia de Friedreich. El kit puede incluir una o más composiciones, moléculas de ácido nucleico, plásmidos o composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento. El kit puede incluir un prospecto que instruya a un usuario del kit, como un médico, a realizar cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. El kit puede incluir opcionalmente una jeringa u otro dispositivo para administrar la composición. En algunas modalidades, el kit puede incluir uno o más
40 agentes terapéuticos adicionales.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción de cómo se pueden usar y evaluar las composiciones y métodos que se describen en la presente, y se pretende que sean puramente a modo ilustrativo de la divulgación y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su divulgación.

5 Ejemplo 1. Materiales y métodos

Optimización por codones del gen de frataxina para la expresión eficaz de proteínas y restauración de la expansión de la repetición de trinucleótidos intrónicos GAA en la ataxia de Friedreich

La secuencia génica de la isoforma 1 de *FXN*, excluyendo el ADN intrónico, es la siguiente:

```

10 AGTCTCCCTTGGGTCAGGGGTCCTGGTTGCACTCCGTGCTTTGCACAAAGCAG
    GCTCTCCATTTTTGTAAATGCACGAATAGTGCTAAGCTGGGAAGTTCTTCCT
    GAGGTCTAACCTCTAGCTGCTCCCCACAGAAGAGTGCCTGCGGCCAGTGGC
    CACCAGGGGTCGCCGCAGCACCCAGCGCTGGAGGGCGGAGCGGGCGGCAGA
    CCCGGAGCAGCATGTGGACTCTCGGGCGCCGCGCAGTAGCCGGCCTCCTGGC
    GTCACCCAGCCCAGCCCAGGCCAGACCCTCACCCGGGTCCCGCGGCCGGCA
15 GAGTTGGCCCCACTCTGCGGCCGCGGTGGCCTGCGCACCGACATCGATGCGA
    CCTGCACGCCCCGCGCGCAAGTTCGAACCAACGTGGCCTCAACCAGATTTG
    GAATGTCAAAAAGCAGAGTGTCTATTTGATGAATTTGAGGAAATCTGGAAC
    TTGGGCCACCCAGGCTCTCTAGATGAGACCACCTATGAAAGACTAGCAGAGG
    AAACGCTGGACTCTTTAGCAGAGTTTTTTGAAGACCTTGCAGACAAGCCATA
20 CACGTTTGAGGACTATGATGTCTCCTTTGGGAGTGGTGTCTTAAGTGTCAAAC
    TGGGTGGAGATCTAGGAACCTATGTGATCAACAAGCAGACGCCAAACAAGC
    AAATCTGGCTATCTTCTCCATCCAGTGGACCTAAGCGTTATGACTGGACTGGG
    AAAAAGTGGGTGTACTCCACGACGGCGTGTCCCTCCATGAGCTGCTGGCCG
    CAGAGCTCACTAAAGCCTTAAAAACCAAAGTGGACTTGTCTTCCTTGGCCTAT
25 TCCGGAAGATGCTTGATGCCAGCCCCGTTTTAAGGACATTAAGCTAT
    CAGGCCAAGACCCAGCTTCATTATGCAGCTGAGGTCTGTTTTTTGTTGTTGT
    TGTGTTTTATTTTTTTTATTCCTGCTTTTGAGGACAGTTGGGCTATGTGTCACA
    GCTCTGTAGAAAGAATGTGTTGCCTCCTACCTTGCCCCCAAGTTCTGATTTTT
    AATTTCTATGGAAGATTTTTTGATTGTGCGGATTTCCCTCCCTCACATGATACCC
30 CTTATCTTTTATAATGTCTTATGCCTATACCTGAATATAACAACCTTTAAAAA
    AGCAAAATAATAAGAAGGAAAAATTCCAGGAGGGAAAATGAATTGTCTTCA
    CTCTTCATTCTTTGAAGGATTTACTGCAAGAAGTACATGAAGAGCAGCTGGTC
    AACCTGCTCACTGTTCTATCTCCAAATGAGACACATTAAAGGGTAGCCTACA
    AATGTTTTTCAGGCTTCTTTCAAAGTGTAAGCACTTCTGAGCTCTTTAGCATTG
35 AAGTGTCGAAAGCAACTCACACGGGAAGATCATTTCCTATTTGTGCTCTGTGA
    CTGCCAAGGTGTGGCCTGCACTGGGTTGTCCAGGGAGACCTAGTGCTGTTTCT
    CCCACATATTCACATACGTGTCTGTGTGTATATATATTTTTTTCAATTTAAAGGT
    TAGTATGGAATCAGCTGCTACAAGAATGCAAAAAATCTTCCAAAGACAAGAA
    AAGAGGAAAAAAGCCGTTTTTCATGAGCTGAGTGATGTAGCGTAACAAACA
40 AAATCATGGAGCTGAGGAGGTGCCTTGTAACATGAAGGGGCAGATAAAGG
    AAGGAGATACTCATGTTGATAAAGAGAGCCCTGGTCCTAGACATAGTTCAGC

```

CACAAAGTAGTTGTCCCTTTGTGGACAAGTTTCCCAAATTCCCTGGACCTCTG
 CTTCCCCATCTGTAAATGAGAGAATAGAGTATGGTTGATTCCCAGCATTTCAG
 TGGTCCTGTCAAGCAACCTAACAGGCTAGTTCTAATTCCCTATTGGGTAGATG
 AGGGGATGACAAAGAACAGTTTTTAAGCTATATAGGAAACATTGTTATTGGT
 5 GTTGCCCTATCGTGATTTTCAGTTGAATTCATGTGAAAATAATAGCCATCCTTG
 GCCTGGCGCGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTTGGAGGCCAAGGT
 GGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGATGA
 AACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCATGATGGCAGGTG
 CCTGTAATCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAAGCGGAAGAATCGCTTGAACCCA
 10 GAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCGTGCCATTGCACTGTAACCTGGGT
 GACTGAGCAAACTCTGTCTCAAATAATAATAACAATATAATAATAATAAT
 AGCCATCCTTTATTGTACCCTTACTGGGTAAATCGTATTATACCACATTACCTC
 ATTTTAATTTTTACTGACCTGCACTTTATACAAAGCAACAAGCCTCCAGGACA
 TTAAAATTCATGCAAAGTTATGCTCATGTTATATTATTTTCTTACTTAAAGAA
 15 GGATTTATTAGTGGCTGGGCATGGTGGCGTGCACCTGTAATCCCAGGTACTCA
 GGAGGCTGAGACGGGAGAATTGCTTGACCCCAGGCGGAGGAGGTTACAGTG
 AGTCGAGATCGTACCTGAGCGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAA
 AAAAGGAGGGTTTATTAATGAGAAGTTTGTATTAATATGTAGCAAAGGCTTT
 TCCAATGGGTGAATAAAAACACATTCCATTAAGTCAAGCTGGGAGCAGTGGC
 20 ATATACCTATAGTCCCAGCTGCACAGGAGGCTGAGACAGGAGGATTGCTTGA
 AGCCAGGAATTGGAGATCAGCCTGGGCAACACAGCAAGATCCTATCTCTTAA
 AAAAAGAAAAAAAAAACCTATTAATAATAAAACAGTATAAACAAAAGCTAAA
 TAGGTAAAATATTTTTTCTGAAATAAAATTATTTTTTGAGTCTGATGGAAATG
 TTTAAGTGCAGTAGGCCAGTGCCAGTGAGAAAATAAATAACATCATACATGT
 25 TTGTATGTGTTTGCATCTTGCTTCTACTGAAAGTTTCAGTGCACCCCACTTACT
 TAGAACTCGGTGACATGATGTACTCCTTTATCTGGGACACAGCACAAAAGAG
 GTATGCAGTGGGGCTGCTCTGACATGAAAGTGGAAGTTAAGGAATCTGGGCT
 CTTATGGGGTCCTTGTGGGCCAGCCCTTCAGGCCTATTTTACTTTTCATTTTACA
 TATAGCTCTAATTGGTTTGATTATCTCGTTCCCAAGGCAGTGGGAGATCCCCA
 30 TTTAAGGAAAGAAAAGGGGCCTGGCACAGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGC
 ACTTTGGGAGGCTGAGGCAAGTGTATCACCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCA
 GCCTGGCCAACATGGCAAAATCCCGTCTCTACTAAAAATATTAAAAAATTGG
 CTGGGCGTGGTGGTTCGTGCCTATAATTTTCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCA
 GGAGAATCGCTGTAACCTGGGGGGTGGAGGTTGCAGTGAGACGAGATCATGC
 35 CACTTCACTCCAGCCTGGCCAACAGAGCCATACTCCGTCTCAAATAAATAAA
 TAAATAAATAAAGGGACTTCAAACACATGAACAGCAGCCAGGGGAAGAATC
 AAAATCATATTCTGTCAAGCAAACCTGGAAAAGTACCACTGTGTGTACCAATA
 GCCTCCCCACCACAGACCCTGGGAGCATCGCCTCATTTATGGTGTGGTCCAGT
 CATCCATGTGAAGGATGAGTTTCCAGGAAAAGGTTATTAAATATTTACTGTA
 40 ACATACTGGAGGAGGTGAGGAATTGCATAATAACAATCTTAGAAAACTTTTTT
 TTCCCTTTCTATTTTTTGAGACAGGATCTCACTTTGGCACTCAGGCTGGAGG

ACAGTGGTACAATCAAAGCTCATGGCAGCCTCGACCTCCCTGGGCTTGGGCA
 ATCCTCCCACAGGTGTGCACCTCCATAGCTGGCTAATTTGTGTATTTTTTGTA
 GAGATGGGGTTTCACCATGTTGCCCAGGCTGGTCTCTAACACTTAGGCTCAAG
 TGATCCACCTGCCTCGTCTCCCAAGATGCTGGGATTACAGGTGTGTGCCACA
 5 GGTGTTTCATCAGAAAGCTTTTTCTATTATTTTACCTTCTTGAGTGGGTAGAAC
 CTCAGCCACATAGAAAATAAAATGTTCTGGCATGACTTATTTAGCTCTCTGGA
 ATTACAAAGAAGGAATGAGGTGTGTAAAAGAGAACCTGGGTTTTTGAATCAC
 AAATTTAGAATTTAATCGAAACTCTGCCTCTTACTTGTTTGTAGACACTGACA
 GTGGCCTCATGTTTTTTTTTTTTTAATCTATAAAATGGAGATATCTAACATGT
 10 TGAGCCTGGGCCCACAGGCAAAGCACAATCCTGATGTGAGAAGTACTCAGTT
 CATGACAACTGTTGTTCTCACATGCATAGCATAATTTTCATATTCACATTGGAG
 GACTTCTCCCAAATATGGATGACGTTCCCTACTCAACCTTGAACCTTAATCAA
 AATACTCAGTTTACTTAACTTCGTATTAGATTCTGATTCCCTGGAACCATTTAT
 CGTGTGCCTTACCATGCTTATATTTTACTTGATCTTTTGCATACCTTCTAAAAC
 15 TATTTTAGCCAATTTAAAATTTGACAGTTTGCATTAAATTATAGGTTTACAAT
 ATGCTTTATCCAGCTATACCTGCCCAAATTCTGACAGATGCTTTTGCCACCT
 CTAAAGGAAGACCCATGTTTCATAGTGATGGAGTTTGTGTGGACTAACCATGC
 AAGGTTGCCAAGGAAAAATCGCTTTACGCTTCCAAGGTACACACTAAGATGA
 AAGTAATTTTAGTCCGTGTCCAGTTGGATTCTTGGCACATAGTTATCTTCTGCT
 20 AGAACAAACTAAAACAGCTACATGCCAGCAAGGGAGAAAGGGGAAGGAGG
 GGCAAAGTTTTGAAATTTTCATGTAAATTTATGCTGTTCAAACGACGAGTTCA
 TGACTTTGTGTATAGAGTAAGAAATGCCTTTTCTTTTTTGAGACAGAGTCTTG
 CTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCTGGGCTCACTACAACCT
 CCGCCTCCTGGGTTCAAGCAATTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGAT
 25 TACAGGTGCCTGCCACCACACCCGGCTAATTTTTGTATTTTATAGTAGAGACGG
 GGTTTCACCATCATGGCCAGGCTGGTCTTGAACTCCTGACCTAGTAATCCACC
 TGCCTCCGCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACTGCACCCAG
 CCAGAAATGCCTTCTAATCTTTGGTTTATCTTAATTAGCCAGGACACTTGGAG
 TGCATCCCGAAGTACCTGATCAGTGGCCCCTTTGGAATGTGTAAAACCTCAGCT
 30 CACTTATATCCCTGCATCCGCTACAGAGACAGAATCCAAGCTCATATGTTCCA
 TCTTCTCTGGCTGTATAGTTTAAGGAATGGAAGGCACCAGAACAGATTTATTG
 AAATGTTTATTAGCTGAAGATTTATTTAGACAGTTGAGGAAAACATCAGCAC
 CCAGCAGTAAAATTGGCTCTCAAAGATTTTCTTCTCCTGTGGAAAGTCAGACC
 TCTGAGGCCCATCCAGGTAGAAGTACTAGTGCAAGAAGGGCCTCTGCTGTC
 35 CACTTGTGTTTCTGTGATCTGTGGGAACATTGTTAACGCCACATCTTGACCTC
 AAATTGTTTAGCTCCTGGCCAGACACGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCA
 CTTTGAGAGGCTGAGGCAGGTGGATCACCTGAGGTTAGGAGTTTCGAGGCCAG
 CCTGGTCAACATGGTAAAACCCCGCCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCTG
 GCCGTAGTGGCGCACGCCTGTTATCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGA
 40 GAATTGCTTGAACCTGGGTGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATTACACCAC
 TGCACTCCAGCCTGGGTGACAAGAGGGAACTCCATTAAAAAAATGTAATTC

CCGTGTCTGCCATCTTAAGTGTAAGGTGGCTAAATTATATAGAAAAATAAG
 ACAATATCATTTCCCAATTACATTCCTTTCCTACCGCACTCTATGATGCTAGCT
 GAGATTTTTCCTAAAAGAAAATGGCTTAAATAAAACCCTAAGAGAAAGAAAA
 ACTTTAAATCCCTCCAAAGCTCAAAAGTAATAGAAACAGATGAGTTTGGAGT
 5 CAGGATTTCTCTGTAAGATTGCCTAGGCTGTGTACTGCACATCTCCAGGTGCC
 ACTGTTGACAGAGATTATAACTACAATGTGAAGTGAATGGTGCCACTGACAG
 TTATGCAAACCGTCCAGAGCATAGCCACCTGATCCTGCTGGGATTCTCTTGC
 CAGTCCATCAGCAGTTCCCCTTGAAAGTTTCACCAAACATCCCTTAAATCTGC
 CCTCTCCTGCCCCGTCCCCAGTGGAGGTCCTCATCATTTTTTCACCTGCATTTTTG
 10 CAGGAGCTTTCTTATATCCACCTTCCTCCTTTTTCTCTCAGCCCATCATCTAGCT
 ACACAGTCTCCAGGGTAAGCTTTCAGAAAGGCAATCTCTTGTCTGTAAAACCT
 AAGCAGGACCAAGGCCAAGTTTCTTAGCCTGAAAAATGTGCTTTTCTGACTG
 AACTGTTCAAGGCACTGACTCTACATATAATTATGCTTTTCTACCCCCTCACAC
 TCAACACTTTGACTCCAGCAATCCCAAATCCCCAGATCCCTAAGTGTGCTGTG
 15 CTATTTTTCACGTGGCTCTCAGACTTGGCCAGTGCTGTTTCCATTTTGGTCTTTA
 TTCCCCACATCTCTGCCTGGGGGGTAGATTCTACCCTGAAAAATGTTCTTGGC
 ACAGCCTTGCAAACCTCCTCCTCCACTCAGCCTCTGCCTGGATGCCCTTGATTG
 TTCCATGTCCTCAGCATACCATGTTTGTCTTTCCCAGCACTGACCTACCATGTG
 TCACCCCTGCTTGGCTGTACCTTCCATGAGGCTAGGACTATGTGTCTCCTTTGT
 20 TGACTGCTGTTGCCCTAGCATCTTGCACAGTTCCTTGCACACAATTAGAGCTC
 TATAAATGTCAAATAAATGTGTTATAATTATATGTTTAAAGATAGTTGTTCAAA
 TAAACTCTAAATAACCCCAAC (SEQ ID NO: 5).

La secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de frataxina es la siguiente:

MWTLGRRVAGLLASPSAQAQTLTRVPRPAELAPLCGRRGLRTDIDATCTPRR
 25 ASSNQRGLNQIWNVKKQSVYLMNLRKSGTLGHPGSLDETTYERLAEETLDSLAE
 FFEDLADKPYTFEDYDVSFGSGVLTVKLGDDLGTIVINKQTPNKQIWLSSPSSGP
 KRYDWTGKNWVYSHDGVSLHELLAAELTKALKTKLDLSSLAYS GKDA (SEQ ID
 NO: 3)

30 El análisis de SEQ ID NO: 5 revela preferencias de codones específicas para diversos aminoácidos en todo el gen. La inspección de las frecuencias de codones revela que, para ciertos aminoácidos, un codón particular se usa predominantemente mientras que otros codones se usan con menos frecuencia o no se usan en absoluto. Un experto en la técnica puede diseñar racionalmente variantes del gen *FXN*, por ejemplo, para aumentar la estabilidad de la proteína, reducir el contenido de GC local y/o reducir la
 35 estructura secundaria del ARNm y los motivos inestables. Variantes de diseño optimizadas por codones del gen *FXN* que contienen un contenido reducido de CpG y/o un contenido reducido de homopolímero para mejorar la traducción de frataxina. Por ejemplo, un experto en la técnica puede manipular la secuencia del gen que codifica la frataxina incorporando sustituciones de codones que disminuyen el contenido de CpG y/o el contenido de homopolímero del gen *FXN* diseñado (**FIGURA 1**). Por ejemplo, en la secuencia
 40 génica de la isoforma 1 de *FXN* anterior, hay instancias del homopolímero GGGGGG. Los homopolímeros pueden ser un sitio de mutaciones por cambio de marco en la formación de una

transcripción de ARNm y/o durante el proceso de traducción. Si esta secuencia de homopolímero permanece en el gen *FXN* optimizado por codones incluso después de minimizar la identidad de secuencia del gen en relación con los genes expresados endógenamente en la célula diana, un experto en la técnica puede incorporar mutaciones adicionales que interrumpan este homopolímero preservando al mismo tiempo la identidad de la proteína codificada. Alternativamente, si el homopolímero codifica residuos de aminoácidos que no son esenciales para la función de la proteína (por ejemplo, si los aminoácidos codificados no están presentes dentro del sitio activo que media la función de la frataxina (p. ej., el sitio activo que media el ensamblaje de agrupaciones hierro-azufre), un experto en la técnica puede incorporar sustituciones de codones que interrumpen el homopolímero y que introducen una sustitución conservadora en la proteína codificada en el sitio del aminoácido correspondiente.

Además, el gen final optimizado por codones puede exhibir al menos un 95 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de frataxina (SEQ ID NO: 5). Por ejemplo, el gen final optimizado por codones puede exhibir al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de frataxina (SEQ ID NO: 5).

En otro ejemplo, el gen final optimizado por codones puede tener una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el gen *FXN* humano optimizado por codones puede incluir una secuencia de Kozak modificada que incluye la secuencia de ácido nucleico: CCACCATG (SEQ ID NO: 6), respecto a los ácidos nucleicos 8-15 de SEQ ID NO: 5.

Una vez diseñado, el gen final optimizado por codones se puede preparar, por ejemplo, mediante procedimientos de ácido nucleico en fase sólida conocidos en la técnica. Las técnicas para la síntesis de polinucleótidos en fase sólida son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5,541,307, cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia en lo que respecta a la síntesis y purificación de polinucleótidos en fase sólida. Además, el gen preparado se puede amplificar, por ejemplo, usando técnicas basadas en PCR descritas en el presente documento o conocidas en la técnica, y/o mediante transformación de *DH5α E. coli* con un plásmido que contiene el gen diseñado. Las bacterias se pueden cultivar posteriormente para amplificar el ADN en ellas, y el gen se puede aislar mediante técnicas de purificación de plásmido conocidas en la técnica, seguidas opcionalmente de una digestión de restricción y/o secuenciación del plásmido para verificar la identidad del gen optimizado por codones.

Inmunofluorescencia

El corazón biopsiado se fijó en formalina al 10 % durante la noche y luego se conservó en etanol al 70 %. El tejido se incrustó en parafina y se cortó en secciones de 5 µm.

Para el análisis de inmunofluorescencia, los tejidos se permeabilizaron y las láminas se lavaron y bloquearon durante 30 minutos con suero de cabra al 5 %. Las secciones se incubaron con anticuerpo primario antifrataxina (Abcam 175402; 2 µg/ml; reconoce humanos, ratones y ratas) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las láminas se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo de cabra (Thermo A11008; conjugado AlexaFluor 488, 4 µg/ml) durante 30 minutos. Las evaluaciones incluyeron la cuantificación detallada de la expresión de frataxina.

Construcciones de frataxina humana optimizadas por codones

Se diseñaron cebadores de PCR para unirse y amplificar el par de bases 633 de la secuencia de ácidos nucleicos de *FXN* del ADN genómico aislado de células HEK293 mediante PCR. Utilizando los métodos

de optimización por codones descritos anteriormente, el *FXN* aislado se modificó mediante mutagénesis dirigida de sitio (Stratgene) para reducir el contenido de CpG. El producto de amplificación modificado resultante se purificó en gel y se secuenció mediante métodos conocidos en la técnica.

Se usó un vector parental circular de virus adenoasociado pseudotipado (AAV) 2/8 (AAV 2/8) como vector de destino para la variante 1 de *FXN* humano optimizado por codones (h*FXN*co). El vector parental contiene una molécula de ácido nucleico que tiene los siguientes componentes: un primer espaciador (SS1), una primera repetición terminal invertida de AAV2 (ITR1), un relleno de ADN sintético, un promotor de fosfoglicerato quinasa humana (PGK), un intrón de virus de simio 40 (SV40), un sitio de poliadenilación tardía (pA) de SV40, un segundo relleno de ADN sintético, una segunda ITR de AAV2 (ITR2), un origen de replicación procariota, un segundo espaciador (SS2) y un gen de selección de antibiótico kanamicina (Kan^R) (**FIGURA 2**). El vector parental también contiene un sitio de clonación que contiene un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción PmeI en 5' con respecto a la primera ITR1 de AAV2; y un sitio de clonación que contiene el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción SmaI en 3' con respecto a la segunda ITR2 de AAV2. El h*FXN*co se clonó en el vector parental y el vector resultante incluyó los componentes de ácido nucleico unidos operativamente en una dirección 5' a 3' como: SS1-AAV2 ITR1-PGK-SV40 intron-SV40 LpA-AAV2 ITR2 -SS2-oriC-Kan^R, mediado por una ligación mediante ADN ligasa T4 a 16°C durante 1 hora. Se verificó la secuencia del vector resultante. Esta construcción AAV2/8-PGK-*FXN* mencionada anteriormente representa la versión 2 (V2), con una versión original (V1) creada que carece del ADN de relleno sintético y tiene una longitud más corta entre ITR1 e ITR2 de 1,5 Kb.

Se realizó un experimento de prueba de principio utilizando una línea celular derivada de células de músculo esquelético de ratón (C2C12). Como resultado, la preparación del vector produjo una expresión sólida de frataxina en células C2C12 transducidas, como lo demuestra la inmunofluorescencia (**FIGURAS 3A y 3B**).

25 *Modelo de ratón con ataxia de Friedreich*

Se cruzaron ratones homocigotos para un alelo condicional de *FXN* (*FXN*^{L3/L3}) con ratones heterocigotos para la delección del exón 4 de *FXN* (*FXN*^{Δ/+}) que portaba un transgén de recombinasa Cre específico del músculo bajo el control de la creatina quinasa muscular (MCK) para inducir la delección del exón 4 restringida al músculo estriado (por ejemplo, véase Puccio et ál., *Nat. Genet.* 27(2) (2001): 181-186).

30 Canónicamente, los mutantes comienzan a perder peso aproximadamente a las 7 semanas, desarrollan progresivamente signos de fatiga y mueren a los 76 ± 10 días.

Utilizando el ratón MCK knockout (KO) como modelo para la ataxia de Friedreich, se demostró la seguridad y eficacia de construcciones de frataxina humana optimizadas por codones, como se describe en el Ejemplo 2.

35 *Análisis de inmunotransferencia*

El análisis de transferencia Western se realizó en extractos de células completas preparados con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA). Las proteínas se separaron en geles de dodecilsulfato de sodio (SDS) con gradiente de poliacrilamida al 4-15 % (Bio-Rad) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen). Las transferencias Western se visualizaron con quimioluminiscencia mejorada (Perkin-Elmer). Los anticuerpos primarios se usaron contra la frataxina (Invitrogen #45-6300) y los anticuerpos secundarios fueron Licor IR Dye 800 CW Donkey anti-ratón. En resultado, un vector viral

pseudotipado AAV2/8 que codifica hFXNco expresó de manera efectiva la isoforma madura de FXN (**FIGURA 4**).

Ejemplo 2. Efectividad del FXN humano optimizado por codones sobre los fenotipos cardíacos y la mortalidad en un modelo de ataxia de Friedreich

5 Este ejemplo describe la seguridad y eficacia de un gen *FXN* optimizado por codones, incluidos genes humanos y murinos del mismo, por ejemplo, en un modelo murino de ataxia de Friedreich, para la mejora de los fenotipos cardíacos y la mortalidad temprana relacionada con la ataxia de Friedreich.

Materiales y métodos

10 Los materiales y métodos se describen en el Ejemplo 1. Este ejemplo probó AAV2/8-PGK-*FXN* versión 2 (V2).

Resultados

Las **FIGURAS 5 y 6A** muestran la probabilidad de supervivencia de ratones FRDA MCK KO a los que se les administró por vía intravenosa 3×10^{13} vg/kg o 1×10^{14} vg/kg de un AAV2/8 ilustrativo que codifica un promotor PGK humano para impulsar la expresión de hFXNco (hFXN) o su equivalente murino (mFXN); o controles del vehículo. Cuatro semanas (semanas) después de la dosificación, los ratones KO con vehículo mostraron una fuerte disminución en la probabilidad de supervivencia, mientras que los ratones a los que se les administró hFXN o mFXN sobrevivieron de manera equivalente a los controles con vehículo WT. Además, en ratones KO a los que se les administró hFXN o mFXN, se observó un rescate significativo en el peso corporal de hembras y machos (**FIGURA 6B**), el peso del corazón normalizado por el peso corporal (**FIGURA 6C**) y en la fracción de eyección (**FIGURA 6D**), en comparación con ratones KO con vehículo. Las **FIGURAS 7A y 7B** muestran el nivel de expresión de frataxina en biopsias del corazón tomadas de ratones del mismo experimento, medido mediante una transferencia Western y cuantificado por el número de copias del vector (VCN; **FIGURA 7A**) o el nivel de proteína frataxina (**FIGURA 7B**), respectivamente. En el corazón, no se observaron diferencias en VCN entre los niveles de dosis 4 semanas después de la administración intravenosa. Como se muestra en la **FIGURA 7B**, se observó un aumento de 3,7 y 13,4 veces en la frataxina cardíaca en ratones KO tratados con mFXN, en comparación con ratones WT tratados con vehículo (media WT ~136 ng/mg), en conexión con la lectura que se muestra en la **FIGURA 5**. Además, se observó un aumento de 3,7 y 23 veces en la frataxina cardíaca en ratones KO tratados con hFXN o mFXN, en comparación con ratones WT tratados con vehículo, en relación con la lectura posterior que se muestra en la **FIGURA 6A**. La **FIGURA 8** muestra el nivel de proteína frataxina en el tejido cardíaco, medido mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), 4 semanas y 12 semanas después de la administración de AAV2/8-PGK-*FXN*. Como se muestra en la **FIGURA 8**, 4 semanas después de la administración se observó un aumento de 3 y 13 veces en la frataxina cardíaca observado en ratones KO tratados con mFXN, en comparación con los ratones WT tratados con vehículo, y un aumento de 7,3 veces en la frataxina cardíaca observada en ratones KO tratados con hFXN, en comparación con ratones WT tratados con vehículo. Como se muestra en la **FIGURA 8**, 12 semanas después de la administración se observó un aumento de 5 y 21,2 veces en la frataxina cardíaca observado en ratones KO tratados con mFXN, en comparación con los ratones WT tratados con vehículo, y un aumento de 17,9 veces en la frataxina cardíaca observada en ratones KO tratados con hFXN, en comparación con ratones WT tratados con vehículo. La **FIGURA 9** muestra el número de copias de vector por genoma diploide detectado en el tejido cardíaco, medido por qPCR, a las

4 y 12 semanas después de la dosificación. Se detectó ADN vectorial en el tejido cardíaco de todos los ratones KO tratados con AAV2/8-PGK-*FXN* a las 4 y 12 semanas después de la dosificación, pero no en los ratones tratados con vehículo en ninguno de los momentos. Como se muestra en la **FIGURA 9**, 12 semanas después de la dosificación, se detectaron significativamente más copias de vector por genoma en los ratones tratados con h*FXN* o 1×10^{14} vg/kg de m*FXN*, en comparación con los 3×10^{13} vg/kg de ratones tratados con m*FXN*.

En la **FIGURA 10A** se muestra la inmunohistoquímica de la expresión de frataxina en tejido cardíaco. El porcentaje de células que exhiben expresión de frataxina fue similar en los ratones KO a los que se les administró 3×10^{13} vg/kg de un plásmido AAV2/8 que codifica m*FXN* (58,6 %) pero aumentó en los ratones KO a los que se les administró 1×10^{14} vg/kg de un plásmido AAV2/8 que codifica h*FXN* o m*FXN* (78-85 %), en comparación con ratones WT (54,4 %) (**FIGURA 10B**).

El análisis de transferencia Western reveló la expresión de la isoforma madura de frataxina en tejidos recolectados de ratones tratados con h*FXN* o m*FXN*. Además, un marcador de daño miocárdico, la cadena ligera de miosina, se redujo en el suero de ratones tratados con h*FXN* o m*FXN* (**FIGURA 6E**) y no se observó toxicidad o fibrosis aparente en los corazones de los ratones tratados cuatro semanas después de la dosificación.

En conjunto, estos resultados demuestran que un plásmido AAV2/8 ilustrativo que codifica un h*FXN*co rescató la mortalidad y provocó una expresión significativa de frataxina en el corazón en un modelo murino de ataxia de Friedreich.

Ejemplo 3. Uso de un gen *FXN* optimizado por codones para el tratamiento de la ataxia de Friedreich

Un gen que codifica frataxina puede optimizarse por codones usando los procedimientos descritos en el presente documento (p. ej., como se describe en el Ejemplo 1 anterior). El gen puede optimizarse por codones con el objetivo de disminuir el contenido de CpG y/o el contenido de homopolímero en la transcripción de ARNm o acomodar el sesgo de codones, por ejemplo, al introducir sustituciones de codones en la secuencia optimizada del gen *FXN* como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente. Por ejemplo, el gen *FXN* final optimizado por codones puede exhibir al menos 95 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de frataxina (SEQ ID NO: 5). Por ejemplo, el gen *FXN* final optimizado por codones puede exhibir al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una molécula de ARN endógeno que codifica la variante 1 de frataxina (SEQ ID NO: 5). En otro ejemplo, el gen final optimizado por codones puede tener una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 1.

Posteriormente, el gen puede incorporarse a un plásmido, como un vector viral, y administrarse a un paciente que padece ataxia de Friedreich. Por ejemplo, a un paciente que sufre de ataxia de Friedreich, un trastorno caracterizado por mutaciones en el gen *FXN*, se le puede administrar un vector viral que contiene un gen *FXN* optimizado por codones bajo el control de un promotor adecuado para la expresión en una célula humana, tal como una célula muscular humana. Por ejemplo, se puede generar un vector AAV, tal como un vector AAV2/8 pseudotipado, que incorpore el gen *FXN* optimizado por codones entre las repeticiones terminales invertidas 5' y 3' del vector, y el gen se puede colocar bajo el control de un promotor específico del músculo, como el promotor PGK. El vector AAV se puede administrar al sujeto de forma sistémica.

Un experto en la técnica puede controlar la expresión del gen *FXN* optimizado por codones mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, un experto en la técnica puede transfectar células cultivadas, tales como células C2C12, con el gen optimizado por codones para modelar la expresión del gen optimizado por codones en los músculos de un paciente. La expresión de la proteína codificada se puede controlar posteriormente utilizando, por ejemplo, un ensayo de expresión descrito en el presente documento, como qPCR, RNA-Seq, ELISA o un procedimiento de inmunotransferencia. Según los datos obtenidos del ensayo de expresión génica, se pueden realizar iteraciones adicionales del procedimiento de optimización por codones, por ejemplo, para disminuir aún más el contenido de CpG y el contenido de homopolímero en la transcripción de ARNm. Las secuencias de genes candidatos con patrones de expresión óptimos *in vitro* pueden prepararse posteriormente para su incorporación en un vector adecuado y su administración a un sujeto mamífero, tal como un modelo animal de ataxia de Friedreich, o un paciente humano.

Ejemplo 4. Tratamiento de la ataxia de Friedreich en pacientes humanos mediante la administración de *FXN* humano optimizado por codones

Usando las composiciones y métodos de la divulgación, a un paciente (por ejemplo, de 3 años de edad a 17 años de edad) que tiene ataxia de Friedreich se le puede administrar un vector AAV2/8 pseudotipado que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen de la variante 1 de *FXN* humano optimizado por codones unido operativamente a un promotor PGK, por ejemplo, el vector AAV que tiene un ácido nucleico de SEQ ID NO: 4.

Al administrar al paciente el vector pseudotipado AAV2/8 que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen de la variante 1 de *FXN* humano optimizado por codones, el paciente muestra un cambio en los niveles de frataxina en sangre total. Por ejemplo, el paciente muestra el cambio en los niveles de frataxina en sangre total aproximadamente 12 semanas después de la administración al paciente del vector pseudotipado AAV2/8 que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante 1 de *FXN* humano optimizado por codones. Además de, o alternativamente, por ejemplo, al administrar al paciente el vector pseudotipado AAV2/8 que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un gen de la variante 1 de *FXN* humano optimizado por codones, el paciente muestra una reducción en la Puntuación Total de la Escala de Calificación de Ataxia de Friedreich (FARS). Por ejemplo, el paciente muestra la reducción en la Puntuación total de FARS a las 12 semanas aproximadamente luego de la administración del vector pseudotipado AAV2/8 que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la variante 1 de frataxina humana optimizada por codones al paciente.

Ejemplo 5. Uso de una molécula de ácido nucleico con una longitud corta de ITR1 a ITR2 y un gen *FXN* para el tratamiento de la ataxia de Friedreich

Un gen que codifica frataxina se puede clonar en un plásmido (por ejemplo, un vector viral) usando los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente). El plásmido original puede contener una longitud corta de ITR1 a ITR2, incluida la carga útil, por ejemplo, de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb (por ejemplo, de aproximadamente 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb o de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb). De forma adicional o alternativa, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 puede ser de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,7 Kb (por ejemplo, aproximadamente 4,0 Kb a aproximadamente 4,6 Kb, aproximadamente 4,1 Kb a aproximadamente 4,5 Kb, aproximadamente 4,2 Kb a aproximadamente 4,4 Kb, o aproximadamente 4,3 Kb). Posteriormente, el

plásmido original puede administrarse a un paciente que padece ataxia de Friedreich. Por ejemplo, a un paciente que sufre de ataxia de Friedreich, un trastorno caracterizado por mutaciones en el gen *FXN*, se le puede administrar un vector viral que contiene un plásmido que incluye una molécula de ácido nucleico que incluye un ITR1-*FXN*-ITR2, en donde el ITR1-*FXN*-ITR2 juntos tienen entre aproximadamente 3,7 Kb y aproximadamente 4,3 Kb de longitud. El gen *FXN* puede estar bajo el control de un promotor adecuado para la expresión en una célula humana, tal como una célula muscular humana. Por ejemplo, se puede generar un vector de AAV, tal como un vector de AAV2/8 pseudotipado, que incorpore el gen *FXN* optimizado por codones entre las repeticiones terminales invertidas 5' y 3' del vector, y el gen se puede colocar bajo el control de un promotor específico del músculo, como el promotor PGK. El vector AAV se puede administrar al sujeto de forma sistémica. El gen puede optimizarse por codones con el objetivo de disminuir el contenido de CpG y/o el contenido de homopolímero en la transcripción de ARNm o acomodar el sesgo de codones, por ejemplo, introduciendo sustituciones de codones en la secuencia optimizada del gen *FXN* como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente. En otro ejemplo, el gen final optimizado por codones puede tener una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 1.

Un experto en la técnica puede monitorear la expresión del gen *FXN* optimizado por codones mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, un experto en la técnica puede transfectar células cultivadas, tales como células C2C12, con el gen optimizado por codones para modelar la expresión del gen optimizado por codones en los músculos de un paciente. La expresión de la proteína codificada se puede controlar posteriormente utilizando, por ejemplo, un ensayo de expresión descrito en el presente documento, como qPCR, RNA-Seq, ELISA o un procedimiento de inmunotransferencia. Según los datos obtenidos del ensayo de expresión génica, se pueden realizar iteraciones adicionales del procedimiento de optimización por codones, por ejemplo, para disminuir aún más el contenido de CpG y el contenido de homopolímero en la transcripción de ARNm. Las secuencias de genes candidatos con patrones de expresión óptimos *in vitro* pueden prepararse posteriormente para su incorporación en un vector adecuado y su administración a un sujeto mamífero, tal como un modelo animal de ataxia de Friedreich, o un paciente humano.

Ejemplo 6. Tratamiento de la ataxia de Friedreich en pacientes humanos mediante la administración de una molécula de ácido nucleico con longitud corta de ITR1 a ITR2 y un gen *FXN*

Usando las composiciones y métodos de la divulgación, a un paciente (por ejemplo, de 3 años de edad a 17 años de edad) que tiene ataxia de Friedreich se le puede administrar un vector de AAV2/8 pseudotipado que incluye una secuencia de ácidos nucleicos que codifica frataxina, en donde el AAV2/8 incluye una ITR1 y una ITR2 que flanquean el gen *FXN* y en donde ITR1-*FXN*-ITR2 juntos tienen una longitud de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb (por ejemplo, aproximadamente 3,8 Kb a aproximadamente 4,2 Kb o aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,1 Kb). De forma adicional o alternativa, la longitud de los ácidos nucleicos entre e incluyendo ITR1 e ITR2 puede ser de aproximadamente 3,9 Kb a aproximadamente 4,7 Kb (por ejemplo, aproximadamente 4,0 Kb a aproximadamente 4,6 Kb, aproximadamente 4,1 Kb a aproximadamente 4,5 Kb, aproximadamente 4,2 Kb a aproximadamente 4,4 Kb, o aproximadamente 4,3 Kb). El gen *FXN* puede estar bajo el control de un promotor adecuado para la expresión en una célula humana, tal como una célula muscular humana. Por ejemplo, el gen puede estar bajo el control de un promotor específico del músculo, como el promotor PGK. El gen puede optimizarse por codones con el objetivo de disminuir el contenido de CpG y/o el

contenido de homopolímero en la transcripción de ARNm o acomodar el sesgo de codones, por ejemplo, introduciendo sustituciones de codones en la secuencia optimizada del gen *FXN* como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente. En otro ejemplo, el gen final optimizado por codones puede tener una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntica a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 1.

5 Al administrar al paciente el vector pseudotipado de AAV2/8 que incluye una longitud ITR1-*FXN*-ITR2 que es de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb, el paciente muestra un cambio en los niveles de frataxina en sangre total. Por ejemplo, el paciente muestra el cambio en los niveles de frataxina en sangre total aproximadamente 12 semanas después de la administración del vector pseudotipado de AAV2/8 que incluye una longitud ITR1-*FXN*-ITR2 que es de aproximadamente 3,7 Kb a
10 aproximadamente 4,3 Kb al paciente. Además de, o alternativamente, por ejemplo, al administrar el vector AAV2/8 pseudotipado que incluye una longitud ITR1-*FXN*-ITR2 que es de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb al paciente, el paciente muestra una reducción en la Puntuación total de la Escala de Calificación de Ataxia de Friedreich (FARS). Por ejemplo, el paciente muestra la reducción en la Puntuación de FARS Total aproximadamente 12 semanas después de la administración del vector AAV2/8
15 pseudotipado que incluye una longitud de ITR1-*FXN*-ITR2 que es de aproximadamente 3,7 Kb a aproximadamente 4,3 Kb al paciente.

Ejemplo 7. Una comparación de la expresión de *FXN* humano optimizado por codones en un vector AAV2/8 pseudotipado con una longitud ITR1-*FXN*-ITR2 de 1,5 Kb y 4,3 Kb.

Se generó una versión original (V1) de un vector AAV 2/8 pseudotipado ilustrativo que codifica un
20 promotor PGK humano para impulsar la expresión de h*FXN*co como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente. El vector AAV 2/8 contiene una molécula de ácido nucleico que tiene los siguientes componentes: un primer espaciador (SS1), una primera repetición terminal invertida de AAV2 (ITR1), un promotor de fosfoglicerato quinasa humana (PGK), un intrón de virus de simio 40 (SV40), un gen *FXN* humano optimizado por codones (h*FXN*co), un sitio de poliadenilación tardía (pA) de SV40, una segunda
25 ITR de AAV2 (ITR2), un origen de replicación procariota, un segundo espaciador (SS2) y un gen de selección de antibiótico kanamicina (Kan^R).

Se generó una segunda versión (V2) de un vector AAV 2/8 pseudotipado ilustrativo que codifica un promotor PGK humano para impulsar la expresión de h*FXN*co como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente. El vector AAV 2/8 contiene una molécula de ácido nucleico que tiene los siguientes
30 componentes: un primer espaciador (SS1), una primera repetición terminal invertida de AAV2 (ITR1), un relleno de ADN sintético, un promotor de fosfoglicerato quinasa humana (PGK), un intrón de virus de simio 40 (SV40), un gen *FXN* humano optimizado por codones (h*FXN*co), un sitio de poliadenilación tardía (pA) de SV40, un segundo relleno de ADN sintético, una segunda ITR de AAV2 (ITR2), un origen de replicación procariota, un segundo espaciador (SS2) y un gen de selección de antibiótico kanamicina
35 (Kan^R) (**FIGURA 2**). Esta segunda versión (V2) de AAV2/8-PGK-*FXN* se diferencia de la V1 por la presencia de dos rellenos de ADN sintético para lograr una longitud de secuencia óptima entre ITR1 e ITR2 de 4,3 Kb. En la **Tabla 3** a continuación se resume una comparación de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 y V2.

Tabla 3: comparación de componentes genéticos de AAV2/8-PGK-*FXN* V1 y V2

	AAV2/8-PGK-FXN	
Componente genético	V1	V2
ITR1	Sí	Sí
Relleno de ADN 1	No	Sí
promotor PGK	Sí	Sí
SV40	Sí	Sí
hFXNco	Sí	Sí
pA	Sí	Sí
Relleno de ADN 2	No	Sí
ITR2	Sí	Sí
Longitud total de nucleótidos entre ITR1 e ITR2	1,5 Kb	4,3 Kb

Para probar la expresión de FXN en AAV2/8-PGK-FXN V2, se transdujeron líneas celulares de músculo humano y de ratón con AAV2/8-PGK-FXN V2 en dosis crecientes. Se observó expresión de FXN dependiente de la dosis después de la transducción con AAV2/8-PGK-FXN V2 en líneas celulares musculares de ratón (**FIGURA 11A**) y humana (**FIGURA 11B**). En comparación con AAV2/8-PGK-FXN V1, V2 se expresó al mismo nivel (**FIGURA 12A** y **FIGURA 12B**) y se procesó correctamente para producir FXN maduro de 14 kDa (**FIGURA 12C**). El FXN humano optimizado por codones mostró niveles de expresión similares a los del FXN humano WT en AAV2/8-PGK-FXN V2 cuando se trataron células C2C12 o AB1079 (**FIGURA 13**).

Ejemplo 8. Efectividad del FXN humano optimizado por codones sobre los fenotipos cardíacos y la mortalidad en un modelo de ataxia de Friedreich

Este ejemplo describe la seguridad y eficacia de un gen FXN (hFXNco) optimizado por codones, en un modelo murino de ataxia de Friedreich, para la mejora de los fenotipos cardíacos y la mortalidad temprana relacionada con la ataxia de Friedreich.

Materiales y métodos

A los ratones se les administró una dosis única de la versión 1 (control positivo V1) o la versión 2 (V2) de un vector AAV8 ilustrativo que codifica un promotor PGK humano para impulsar la expresión de hFXNco (AAV8-PGK-FXN) por vía intravenosa a las 6 semanas de edad para evaluar la eficacia y toxicología de un gen FXN optimizado por codones en un modelo de ratón con Ataxia de Friedreich (descrito en el Ejemplo 1, anteriormente). Los parámetros del estudio para cada grupo de tratamiento se describen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: parámetros del estudio para evaluar AAV8-PGK-FXN V2

Grupo	N	Genotipo	Compuestos	Dosis (vg/kg)	Vía de dosificación	Momento de la necropsia (después de la inyección)
1	5F/5M	En estado natural (C57BL/6J)	Vehículo	-	1x IV	4 semanas
2	5F/5M	En estado natural	Vehículo	-	1x IV	12 semanas

Grupo	N	Genotipo	Compuestos	Dosis (vg/kg)	Vía de dosificación	Momento de la necropsia (después de la inyección)
		(C57BL/6J)				
3	5F/5M	MCK-FXN-KO	Vehículo	-	1x IV	4 semanas
4	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	1E12	1x IV	4 semanas
5	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	1E12	1x IV	12 semanas
6	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	3E12	1x IV	4 semanas
7	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	3E12	1x IV	12 semanas
8	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	1E13	1x IV	4 semanas
9	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	1E13	1x IV	12 semanas
10	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	3E13	1x IV	4 semanas
11	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	3E13	1x IV	12 semanas
12	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	1E14	1x IV	4 semanas
13	5F/5M	MCK-FXN-KO	V2	1E14	1x IV	12 semanas
14	5F/5M	MCK-FXN-KO	V1-Original	3E13	1x IV	12 semanas

Resultados

Se llevaron a cabo estudios de supervivencia para evaluar el efecto de hFXNco sobre la mortalidad. Se practicó la eutanasia a los ratones si los animales mostraban cualquiera de las siguientes condiciones: una disminución de peso corporal >20 %, signos de dificultad respiratoria, falta de respuesta a estímulos significativos y/o mala condición corporal general antes de la necropsia programada. La edad media en el momento de la eutanasia fue significativamente diferente entre los tratados con vehículo (control no transducido) y todos los demás grupos de tratamiento, observándose un rescate de la mortalidad dependiente de la dosis en los animales tratados con AAV8-PGK-FXN V1 y V2 (**FIGURA 14**).

La función cardíaca se evaluó mediante ecografía de alta frecuencia durante el transcurso del estudio, comenzando a las 6 semanas de edad (WOA) y al final, ya sea 9-10 WOA o 18-19 WOA (como se detalla en la Tabla 4). La administración de AAV8-PGK-FXN V1 y V2 rescató la función cardíaca como lo demuestran los aumentos en la fracción de eyección (**FIGURA 15**) y el acortamiento fraccional (**FIGURA**

16) y la disminución de la masa ventricular izquierda (**FIGURA 17**). AAV8-PGK-*FXN* V1 y V2 redujeron los niveles de marcadores de lesión cardíaca, troponina cardíaca (**FIGURA 18**) y cadena ligera de miosina (**FIGURA 19**) en el suero, mientras que no se observaron cambios significativos en AST y ALT (**FIGURAS 20 y 21**).

La transducción y expresión de AAV8-PGK-*FXN* V2 se evaluaron midiendo el número de copias del vector (VCN), el ARNm y la expresión de la proteína *FXN* en el corazón, el hígado y el cuádriceps. Se detectó VCN dependiente de la dosis en el corazón, el hígado y el cuádriceps (**FIGURAS 22-24**), con aproximadamente 3 veces menor VCN en el cuádriceps que en el corazón para la mayoría de los grupos (**FIGURA 23**), lo que indica una mejor transducción en el corazón que el cuádriceps. Se detectó ARNm de *FXN* en el corazón y cuádriceps de ratones mutantes de una manera dependiente de la dosis para ratones mutantes tratados con AAV8-PGK-*FXN* V2 (**FIGURA 25**). Hubo un aumento dependiente de la dosis en la expresión de la proteína *FXN* en el corazón (**FIGURA 26**), hígado (**FIGURA 27**) y cuádriceps (**FIGURA 28**), con la proteína impulsada por AAV8-PGK-*FXN* V2 mostrando una expresión mucho menor en el cuádriceps que en el corazón.

Conclusión

En conjunto, estos resultados demuestran que V2 de un plásmido AAV8 ilustrativo que codifica un *hFXNco* bajo el control de un promotor PGK humano rescató la mortalidad y la función cardíaca, y provocó una expresión significativa de frataxina en el corazón, el hígado y el cuádriceps en un modelo murino de ataxia de Friedreich.

Ejemplo 9. Efectividad del *FXN* humano optimizado por codones en fenotipos del sistema nervioso central en un modelo de ratón de neurona específica de ataxia de Friedreich

Este ejemplo describe la eficacia de un gen *FXN* (*hFXNco*) humano optimizado por codones en un modelo de ratón con ataxia de Friedreich específico de neurona, para la mejora de los fenotipos del sistema nervioso central (SNC) relacionados con la ataxia de Friedreich.

Materiales y métodos

A los ratones se les administró una única dosis intracerebroventricular (ICV) o intraparenquimatosas (IPC) de la versión 1 (control positivo V1) y la versión 2 (V2) de un vector AAV8 ilustrativo que codifica un promotor PGK humano para impulsar la expresión de *hFXNco* (AAV8-PGK-*FXN*) a las 8 semanas de edad para evaluar la eficacia y toxicología de un gen *FXN* optimizado por codones en un modelo de ratón con ataxia de Friedreich específica de neuronas.

Se cruzaron ratones homocigotos para el exón 2 floxed de frataxina con ratones heterocigotos tanto para PV-Cre knockin como para KO global de frataxina para inducir el genotipo *Fxn*^{flox/null}::PV-Cre, que es heterocigoto compuesto en el locus de frataxina (exón 2 floxed y KO global en los respectivos cromosomas homólogos) y heterocigotos para el alelo PV-Cre knockin. Los ratones *Fxn*^{flox/null}::PV-Cre tienen un alelo de frataxina condicional Cre, un alelo de frataxina knockout global y un alelo knockin de recombinasa Cre específico de la neurona de parvalbúmina, lo que crea un modelo de ratón con ataxia de aparición temprana útil para el estudio de la ataxia de Friedreich.

Utilizando el ratón *Fxn*^{flox/null}::PV-Cre knockout (KO) como modelo para la ataxia de Friedreich, se demostró la eficacia de las construcciones de frataxina humana optimizadas por codones.

Los parámetros del estudio para cada grupo de tratamiento se describen en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5: parámetros del estudio para evaluar AAV8-PGK-*FXN* V2

Grupo	N	Edad de la dosis	Vía de dosificación	Tratamiento	Dosis (vg total/animal)	Necropsia (semanas)
1 – WT (B6)	8F/8M	N/A	N/A	NHS	N/A	8
2 – KO	8F/8M					
	15F/7M	N/A	N/A	NHS	N/A	
3 – WT (B6)	8F/8M	8 semanas	ICV bilateral	Vehículo	N/A	11
4 - KO	8F/8M	8 semanas	ICV bilateral	Vehículo	N/A	11
5 – KO	8F/8M	Día 2 postnatal	ICV bilateral	V2	3,00E+11	4
6 - KO	8F/8M	8 semanas	ICV bilateral	V2	6,00E+10	11
7 - KO	8F/8M	8 semanas	ICV bilateral	V2	3,00E+11	10
8 – KO	8F/8M	8 semanas	ICV bilateral	V1	6,00E+10	12
9 – KO	6F/6M	8 semanas	DN IPC bilateral	V2	6,00E+10	5
10 – KO	6F/6M	8 semanas	DN IPC bilateral	V2	2,40E+11	5
11 - WT	4F/4M	Día 2 postnatal	ICV bilateral	Vehículo	N/A	4
12 – KO	4F/4M	Día 2 postnatal	ICV bilateral	Vehículo	N/A	4
13 – WT (B6)	4F/4M	8 semanas	DN IPC bilateral	Vehículo	N/A	-
14 - KO	4F/4M	8 semanas	DN IPC bilateral	Vehículo	N/A	-

Resultados

El efecto de hFXNco sobre la coordinación motora se evaluó mediante una prueba de rendimiento rotarod. El tratamiento con AAV8-PGK-FXN V2 mejoró significativamente el tiempo de caída en comparación con el vehículo mutante (control no transducido) (**FIGURA 29**).

La transducción y expresión de AAV8-PGK-FXN V2 se evaluaron midiendo el número de copias del vector (VCN) y la expresión de la proteína FXN en los tejidos del SNC. Se observaron resultados de VCN dependientes de la dosis en animales que recibieron dosis mediante ICV a las 8 semanas de edad, mostrando la VCN cerebral una alta variabilidad (**FIGURA 30**). Los animales a los que se les administró IPC mostraron VCN 100 veces mayor en el cerebelo y aproximadamente 10 veces mayor VCN en la corteza que los animales a los que se les administró dosis mediante ICV a las 8 semanas de edad (**FIGURA 31**). Se observó expresión de la proteína FXN en la corteza y el cerebelo para animales a los que se les administró AAV8-PGK-FXN V2 a las 8 semanas de edad, y la inyección de IPC mejoró la administración de AAV8-PGK-FXN V2 al cerebelo (**FIGURA 32**).

El cerebelo es una indicación importante en la ataxia de Friedreich, ya que la enfermedad causa daño a la

porción del cerebelo del cerebro. Después de la dosificación de AAV8-PGK-*FXN* V2, el cerebelo produjo mayores cantidades de proteínas *FXN* por la misma cantidad de VCN que otros tejidos (**FIGURA 33**), lo que indica que se necesita menos AAV8-PGK-*FXN* V2 para obtener beneficios terapéuticos en el cerebelo.

- 5 La cadena ligera de neurofilamento (NFLC) es una proteína citoesquelética específica de la neurona que se libera en el líquido extracelular después de una lesión axonal y se reconoce como un biomarcador importante en muchas enfermedades neurodegenerativas. Después del tratamiento con AAV8-PGK-*FXN* V2, se descubrió que los ratones mutantes tenían niveles reducidos del marcador de lesión neural NFLC (**FIGURA 34**).

10 *Conclusión*

En conjunto, estos resultados demuestran que V2 de un plásmido AAV8 ilustrativo que codifica un h*FXN*co bajo el control de un promotor PGK humano rescató fenotipos del SNC y provocó la expresión de frataxina en tejidos del SNC en un modelo de ratón de neurona específica de ataxia de Friedreich.

Otras modalidades

- 15 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en la presente mediante referencia en la misma medida que si cada publicación o solicitud de patente independiente se indicara de forma individual y específica como incorporada mediante referencia.

- Si bien la invención se ha descrito en conexión con modalidades específicas de esta, se comprenderá que
 20 pueden realizarse modificaciones adicionales y que se pretende que la presente solicitud abarque todas las variaciones, usos o adaptaciones de la invención siguiendo, en términos generales, los principios de la invención e incluyendo desviaciones con respecto a la invención que se encuentran dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y que puedan aplicarse a las características esenciales establecidas anteriormente en la presente y a continuación dentro del alcance de
 25 las reivindicaciones.

Otras modalidades están dentro de las reivindicaciones.