

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE RAAV

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos núm. 63/442,608, presentada el 1 de febrero de 2023 y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 63/448,872 presentada el 28 de febrero de 2023, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

10 Esta descripción proporciona métodos mejorados de producción de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) para su uso en terapia génica.

ANTECEDENTES

15 Los productos terapéuticos capaces de proporcionar reemplazos génicos funcionales o medios para editar genes defectuosos prometen el alivio de los trastornos causados por mutaciones de un solo gen, muchos de los cuales no tienen actualmente esperanza de recibir tratamiento aparte de los cuidados paliativos.

Los virus adenoasociados recombinantes (rAAV) con frecuencia se proponen como vectores para las genoterapias. Sin embargo, los rAAV también plantean varios problemas que deben resolverse para cada tratamiento (Au 2022). Estos problemas incluyen:

20 - El tamaño limitado (~4.7 kb de ADN monocatenario) del material genético del rAAV, que debe incluir las repeticiones terminales invertidas (ITR) necesarias para el empaquetamiento y la replicación del casete genético, los promotores, al menos un gen de interés y los terminadores de la transcripción. Por lo tanto, los defectos en los genes grandes hospedadores y en varios genes son
25 difíciles de tratar con vectores de rAAV.

- Los anticuerpos preexistentes contra la cápside del rAAV pueden impedir que el tratamiento transduzca una cantidad eficaz de células en el tejido afectado.

- El rAAV puede infectar una variedad de diferentes tipos celulares, no solo células en el tejido afectado, lo que provoca efectos fuera de la diana. A menudo, se observa una patología hepática.

30 Los promotores específicos de tejidos pueden evitar tales efectos, pero la identificación de los promotores óptimos puede ser desafiante.

- Se necesitan grandes cantidades de partículas de rAAV para suministrar un tratamiento eficaz a los seres humanos, en el intervalo de 10^{14} a 10^{16} genomas víricos (gv) para la administración sistémica (por ejemplo, intravenosa), pero la fabricación de rAAV está limitada por las tecnologías actuales.

5 Existe la necesidad de mejores métodos de producción de rAAV. Se han evaluado varios aditivos de medios y condiciones de cultivo para determinar los efectos en la transfección celular y la producción de proteínas, pero con resultados variables. Por ejemplo, se ha informado que el butirato de sodio/ácido butírico, un inhibidor de histona desacetilasa, aumenta la producción de proteínas de la cápside de AAV cuando se agrega 18 horas después de la transfección junto con triptona N1 (Zhao
10 2020). Cuando se usa la infección por adenovirus para estimular la expresión de AAV de las células HEK293, el butirato de sodio con fortificación de calcio (mediante el uso de cloruro de calcio) aumentó la producción de virus, pero la adición de otros factores tales como el dimetilsulfóxido (DMSO), alcohol etílico y N-acetil-L-cisteína no aumentó aún más la producción de virus (Tsao 2001). También se demostró que el butirato de sodio tiene un efecto positivo en la transfección
15 transitoria y la producción de proteínas, pero con la adición de algunos otros reactivos, provocó una disminución de la viabilidad celular (Cervera 2015). Otras variables como el acetato de litio agregado antes de la transfección y el ácido valproico agregado después de la transfección aumentaron la viabilidad celular, la eficiencia de la transfección y la producción de proteínas. (*Id.*) Alternativamente, para otro grupo, el butirato de sodio demostró un efecto neutro o negativo cuando
20 se agregó en el momento de la transfección (Chahal 2014). El ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA) agregado a 2 mM antes de la transfección también aumentó la eficiencia de la transfección, aunque las concentraciones más altas fueron citotóxicas (Feng 2007). El ácido valproico agregado en el momento de la transfección o poco después aumentó los valores de AAV (WO2018/226887, WO2020/172624). También se ha informado que
25 complementar con cloruro de sodio después de la transfección aumenta los valores de AAV (Adamson-Small 2017). La cafeína aumentó el valor de los lentivirus, pero redujo drásticamente la producción de AAV (Ellis 2011).

En la presente descripción se describe un enfoque sistemático para cribar una biblioteca de moléculas pequeñas para detectar potenciadores de la producción de rAAV. Las moléculas pequeñas son de
30 varias clases de compuestos que incluyen modificadores de osmolalidad, compuestos orgánicos volátiles, agentes redox, agentes quelantes, efectores epigenéticos y aminos. Sorprendentemente, una

combinación de bajas dosis de dimetilsulfóxido (DMSO) y ácido valproico tiene un efecto sinérgico en la producción de rAAV.

COMPENDIO

- 5 En la presente se describe un método para producir un vector vírico adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende transfectar células con al menos un ácido nucleico capaz de expresar un rAAV; añadir una dosis baja de dimetilsulfóxido (DMSO) y una dosis baja de ácido valproico; cultivar las células transfectadas; y recoger el rAAV. En la presente descripción se proporcionan métodos ilustrativos de transfección de células y otros métodos de transfección son conocidos en la
- 10 técnica; la invención reivindicada no se limita a un método de transfección particular. En la presente descripción se proporcionan ejemplos de células capaces de ser transfectadas y que expresan rAAV y otras células adecuadas son conocidas en la técnica; la invención reivindicada no se limita a una célula o estirpe celular particular. En la presente descripción se proporcionan ejemplos de ácidos nucleicos capaces de expresar rAAV y otros ácidos nucleicos adecuados son conocidos en la técnica;
- 15 la invención reivindicada no se limita a un ácido nucleico o tipo de rAAV particular. En la presente descripción se proporcionan ejemplos de métodos de cultivo celular y otros métodos de cultivo celular adecuados son conocidos en la técnica; la invención reivindicada no se limita a un método de cultivo celular particular. En la presente descripción se proporcionan métodos ilustrativos de recolección de rAAV y otros métodos de recolección de rAAV adecuados son conocidos en la
- 20 técnica; la invención reivindicada no se limita a un método de recolección de rAAV particular. La dosis baja de DMSO podría ser de aproximadamente 1,6 % volumen/volumen, o la dosis baja podría ser de 1.2 % a 2 %, o la dosis baja podría ser de 1,57 % $\pm$ 0,4 %. La dosis baja de DMSO es igual o inferior al 2 %. La dosis baja podría ser 1.2 %, 1.3 %, 1.4 %, 1.5 %, 1.6 %, 1.7 %, 1.8 %, 1.9 % o 2.0 %, o una dosis dentro de ± 0.05 % de lo anterior. En la Figura 4 se presenta una representación
- 25 gráfica de dosis bajas de DMSO adecuadas para la producción de los métodos reivindicados. Los métodos son adecuados para potenciar la producción de rAAV.
- La dosis baja de ácido valproico podría ser de 0 mM a 2 mM, o la dosis baja podría ser de 1.3 mM a 1.9 mM, o la dosis baja podría ser de aproximadamente 1.6 mM, o la dosis baja podría ser de 1.59 mM $\pm$ 0.3 mM. La dosis baja podría ser de 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM o 2,0 mM, o una dosis con ± 0.25
- 30 mM de lo anterior. En algunos ejemplos, el efecto de una dosis de 1.6 % de DMSO no fue estadísticamente significativo a partir del efecto logrado con 1.6 % de DMSO/ 1.6 mM de ácido valproico, lo que indica que en algunas situaciones (por ejemplo, rAAV, gen de interés, etc.) la dosis

baja de ácido valproico puede no ser necesaria para potenciar la producción de rAAV. La dosis baja de ácido valproico es igual o inferior al 2 %. En la Figura 4 se presenta una representación gráfica de dosis bajas de ácido valproico adecuadas para los métodos reivindicados. Los métodos son adecuados para potenciar la producción de rAAV.

- 5 En los métodos reivindicados, la adición de DMSO a dosis baja y ácido valproico a dosis baja podría hacerse de 0 a 6 horas después de la transfección, o de 0.5 a 5 horas después de la transfección, o de 1 a 4 horas después de la transfección, o de 2 a 4 horas después de la transfección.

En la presente se describe además un medio de cultivo celular que comprende una dosis baja de dimetilsulfóxido (DMSO) y una dosis baja de ácido valproico. La dosis baja de DMSO es igual o inferior al 2 % pero mayor que aproximadamente 1 %. Preferentemente, la dosis baja de DMSO podría ser del 1.2 % al 2 %, o la dosis baja podría ser del 1.57 % $\pm$ 0.4 %. La dosis baja de ácido valproico es igual o inferior al 2 %. La dosis baja de ácido valproico o la dosis baja podría ser de 1.3 mM a 1.9 mM, o la dosis baja podría ser de aproximadamente 1.6 mM, o la dosis baja podría ser de 1.59 mM $\pm$ 0.3 mM.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 proporciona el cribado inicial de aditivos de cultivos celulares para la capacidad de potenciar la producción de rAAV. A. Las CTS VPC se sembraron en biorreactores Ambr 15, se transfectaron por triplicado con un plásmido cooperador, un plásmido que codifica genes rep y cap de AAV, y un plásmido que contiene un casete de expresión que codifica el gen de anoctamina-5 de tipo silvestre (ANO5 WT) y se trataron con aditivos de acuerdo con el tiempo y las concentraciones en la Tabla 1 (DMSO - 1 %, butirato de sodio ALTO - 5 mM, butirato de sodio BAJO - 1 mM; ácido valproico ALTO - 3.36 mM). El medio Max Production de CTS LV (ThermoFisher Scientific) es un medio químicamente definido, sin suero ni proteínas para el crecimiento y la transfección de células HEK 293 adaptadas para suspensión. El valor promedio total del día cuatro en VG/ml de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental según lo determinado por la qPCR. Las barras de error, cuando corresponda, representan el error estándar de la media. Control/CTS LV-Max, $n = 4$; todas las demás condiciones, $n = 2$. B. Las CTS VPC se sembraron en biorreactores Ambr 15, se transfectaron con plásmidos que permiten la producción de un rAAV de ANO5 WT y se trataron con aditivos de acuerdo con el tiempo en la Tabla 1. El valor promedio total del día cuatro en VG/ml de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental

30

según lo determinado por la qPCR. Las barras de error, cuando corresponda, representan el error estándar de la media. Control, $n = 6$; todas las demás condiciones, $n = 3$.

La Figura 2 proporciona una prueba de combinaciones de aditivos seleccionados. Las CTS VPC se sembraron en matraces de agitación de 125 ml, se transfectaron con plásmidos que permiten la producción de un rAAV de ANO5 WT y se trataron con aditivos cuatro horas después de la transfección (dosis baja: alcohol etílico [EA] – 50 mM, ácido valproico [VPA] – 1 mM, DMSO – 1 %; dosis alta: EA – 100 mM, VPA – 2 mM, DMSO - 2 %). El valor promedio total del día cuatro en VG/ml de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental según lo determinado por la qPCR.

La Figura 3 proporciona una evaluación del tiempo adecuado para la adición de los aditivos seleccionados y el efecto de la densidad celular de emplatado. A. Las CTS VPC se sembraron en biorreactores Ambr 15, se transfectaron con plásmidos que permiten la producción de un rAAV de ANO5 WT y se trataron con aditivos de acuerdo con el tiempo del eje x (horas). El valor promedio total del día cuatro en VG/ml de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental según lo determinado por la qPCR. Las barras de error, cuando corresponda, representan el error estándar de la media. B. Las células HEK 293 adherentes se sembraron a 7,000 células/cm² (Proceso C) o 14,000 células/cm² (Proceso B) y se cultivaron durante cuatro días antes de la transfección con plásmidos que permiten la producción de una microdistrofina (μDYS) o un ANO5 rAAV WT y tratamiento con aditivos. El valor promedio total del día cuatro en VG/cm² de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental según lo determinado por la qPCR. Las barras de error, cuando corresponda, representan el error estándar de la media.

La Figura 4 proporciona un refinamiento adicional de las concentraciones de aditivos del cultivo celular. A. Las CTS VPC se sembraron en biorreactores Ambr 15, se transfectaron con plásmidos que permiten la producción de un rAAV de ANO5 WT y se trataron con aditivos de EA, VPA, y DMSO de acuerdo con un diseño de DoE factorial completo de 3 x 3 x 3. El valor promedio total del día cuatro en VG/ml de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental según lo determinado por la qPCR. El análisis de regresión polinomial del valor de D4 se determina mediante un método de ajuste por mínimos cuadrados. Un perfilador de predicción optimiza la respuesta (es decir, el valor de D4) de las variables de entrada en función del modelo de regresión al maximizar la deseabilidad. Las áreas sombreadas representan los intervalos de confianza del 95 %. B. Un mapa de perfil de contorno del aumento de la producción de rAAV mediante una concentración de DMSO (% v/v) y ácido valproico (mM).

La Figura 5 proporciona la traducción de los resultados con los aditivos seleccionados a diferentes estirpes celulares, con diferentes cápsides de AAV, y con diferentes genes de interés. A. Las células CTS VPC y Expi293 (Expi) se sembraron en matraces de agitación de 125 ml, se transfectaron con plásmidos que permiten la producción de un rAAV de ANO5 WT y se trataron con aditivos después de 2 horas (VPA/DMSO) o 4 horas (etanol, VPA, DMSO). El valor promedio total del día cuatro en VG/ml de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental según lo determinado por la qPCR. Las barras de error, cuando corresponda, representan el error estándar de la media. B. Las CTS VPC se sembraron en biorreactores Ambr 15, se transfectaron con plásmidos que permiten la producción de un AAV1.ANO5 WT o AAV9.ANO5 WT y se trataron con aditivos dos horas después de la transfección. El valor promedio total del día cuatro en VG/ml de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental según lo determinado por la qPCR. Las barras de error, cuando corresponda, representan el error estándar de la media. C. Las CTS VPC se siembran en biorreactores Ambr 15, se transfectaron con *NT3*, *5' DYSF* o *SaCas9* y se tratan con aditivos dos horas después de la transfección. El valor promedio total del día cuatro en VG/ml de todas las series se muestra de acuerdo con cada condición experimental según lo determinado por la qPCR. Las barras de error, cuando corresponda, representan el error estándar de la media.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos (incluidos los términos técnicos y científicos) usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Se entenderá además que los términos, tales como los definidos en los diccionarios comúnmente usados, deben interpretarse según un significado que es coherente con su significado en el contexto de la presente solicitud y la técnica pertinente y no deben interpretarse en un sentido idealizado o demasiado formal a menos que se defina expresamente en la presente descripción. Si bien no se define explícitamente más abajo, dichos términos deben interpretarse de acuerdo con su significado común.

La terminología usada en la descripción de la presente tiene el propósito de describir modalidades particulares solamente y no pretende ser limitante de la invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente descripción se incorporan como referencia en su totalidad.

La práctica de la presente tecnología empleará, a menos que se indique de otra forma, técnicas convencionales de cultivo tisular, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular, y ADN recombinante, que están dentro de la técnica.

A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diversas características de la invención descritas en la presente descripción puedan usarse en cualquier combinación. Además, la descripción también contempla que, en algunas modalidades, cualquier característica o combinación de características establecidas en la presente descripción pueden excluirse u omitirse. Para ilustrar, si la descripción establece que un complejo comprende los componentes A, B y C, se pretende específicamente que cualquiera de A, B o C, o una de sus combinaciones, pueda omitirse y rechazarse de manera singular o en cualquier combinación.

A menos que se indique explícitamente de cualquier otra manera, todas las modalidades, características, y términos especificados pretenden incluir tanto la modalidad, característica, o término mencionado como equivalentes biológicos de estos.

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración, y peso molecular, incluidos los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 1.0 o 0.1, según corresponda, o alternativamente por una variación de +/- 15 %, o alternativamente 10 %, o alternativamente 5 %, o alternativamente 2 % y tales intervalos se incluyen. Debe entenderse, aunque no siempre esté explícitamente indicado, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término “aproximadamente”. También debe entenderse, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en la presente descripción son meramente ilustrativos y que los equivalentes de estos se conocen en la técnica.

La práctica de la presente tecnología empleará, a menos que se indique de otra forma, técnicas convencionales de química orgánica, farmacología, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular, y ADN recombinante, que están dentro de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a edición (1989); *Current Protocols In Molecular Biology* (F. M. Ausubel, y otros. eds., (1987)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, a Laboratory Manual*, y *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)).

Como se usa en la presente descripción, los términos “aumento”, “disminución”, “alto”, “bajo” o cualquier variación gramatical de estos se refieren a una variación de aproximadamente 90 %, 80 %, 50 %, 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0.5 %, o incluso 0.1 % de la composición de referencia, polipéptido,

proteína, etc. “Potenciado” o “mejorado” significa un aumento del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % (es decir, una duplicación o 2 veces), 3 veces, 4 veces, 5 veces o más en comparación con el método de referencia.

- 5 Los términos “aceptables”, “eficaces” o “suficientes” cuando se usan para describir la selección de cualquiera de los componentes, intervalos, formas de dosis, etc. descritos en la presente descripción pretenden que dicho componente, intervalo, forma de dosis, etc. sea adecuado para el propósito descrito.

Además, como se usa en la presente descripción, “y/o” se refiere y abarca cualquiera y todas las
10 combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como también la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (“o”).

Debe inferirse sin mención explícita y, a menos que se pretenda lo contrario, que cuando la presente descripción se refiere a un polipéptido, proteína, polinucleótido o anticuerpo, un equivalente o un equivalente biológicamente de este se pretende dentro del alcance de esta descripción. Como se usa
15 en la presente descripción, el término “equivalente biológico de este” pretende ser sinónimo de “equivalente de este” cuando se refiere a una proteína de referencia, anticuerpo, polipéptido o ácido nucleico, pretende que aquellos que tienen una identidad de secuencia mínima mientras mantienen la estructura o funcionalidad deseada. A menos que se indique específicamente en la presente descripción, se contempla que cualquier polinucleótido, polipéptido o proteína mencionada en la
20 presente descripción también incluye equivalentes de estos. Por ejemplo, un equivalente pretende al menos aproximadamente 70 % de homología o identidad, o al menos 80 % de homología o identidad y alternativamente, o al menos aproximadamente 85 %, o alternativamente al menos aproximadamente 90 %, o alternativamente al menos aproximadamente 95 %, o alternativamente 98 % de homología o identidad a lo largo de la longitud de la secuencia de referencia y exhibe actividad
25 biológica sustancialmente equivalente a la proteína de referencia, polipéptido o ácido nucleico. Alternativamente, cuando se refiere a polinucleótidos, un equivalente de estos es en un aspecto, un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas al polinucleótido de referencia o su complemento que, en un aspecto adicional, tiene la misma actividad o función o actividad similar que el polinucleótido de referencia o su complemento. Una actividad biológica es un nucleótido que
30 codifica una proteína, y, debido a la redundancia del código genético, los nucleótidos serían biológicamente equivalentes si codificaran la misma secuencia de aminoácidos incluso si se usaran codones diferentes.

Un equivalente de una proteína o un polipéptido (denominado en la presente descripción como la referencia) comparte al menos 50 % (o al menos 60 %, o al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %) de identidad con la referencia y retiene la función y capacidad de fabricación de la referencia.

- 5 Como se usa en la presente descripción, los términos “función”, “actividad”, y “actividad enzimática” se usan indistintamente.

Como se usa en la presente descripción, los términos “purificación”, “purificar”, o “separar” se refieren al proceso de aislar uno o más biomateriales (por ejemplo, polinucleótidos, polipéptidos, o vectores víricos) a partir de una mezcla compleja, tal como un lisado celular o una mezcla de polipéptidos. La purificación, separación, o aislamiento no necesitan estar completos, es decir, algunos componentes de la mezcla del complejo pueden permanecer con uno o más biomateriales (por ejemplo, polinucleótidos, polipéptidos, o vectores víricos) después del proceso de purificación. Sin embargo, el producto de purificación debe enriquecerse para uno o más biomateriales (por ejemplo, polinucleótidos, polipéptidos, o vectores víricos) con relación a la mezcla del complejo antes de la purificación y una porción significativa de los otros componentes inicialmente presentes dentro de la mezcla del complejo debe eliminarse mediante el proceso de purificación. La purificación no excluye las subpoblaciones del material purificado.

El término “célula” como se usa en la presente descripción puede referirse a una célula procariota o eucariota, obtenida opcionalmente de un sujeto o una fuente disponible comercialmente. En algunos casos, la célula es una célula hospedadora, por ejemplo, una célula de mamífero o una célula de mamífero hospedadora. En algunos casos, la célula hospedadora también se denomina en la presente descripción como una célula de producción o una célula de empaquetamiento. En algunos casos, la estirpe celular es una estirpe celular de empaquetamiento.

Las “células eucariotas” comprenden todos los reinos vivos, excepto monera. Pueden distinguirse fácilmente a través de un núcleo unido a la membrana. Los animales, las plantas, los hongos y los protistas son eucariotas u organismos cuyas células están organizadas en estructuras complejas mediante membranas internas y un citoesqueleto. La estructura unida a la membrana más característica es el núcleo. A menos que se indique específicamente, el término “hospedador/a” incluye una hospedadora eucariota, que incluye, por ejemplo, levadura, planta superior, células de insectos y mamíferos. Los ejemplos no limitantes de células u hospedadoras eucariotas incluyen células de simios, bovinos, porcinos, murinos, de rata, aviares, reptilianas y humanas, por ejemplo, células HEK293, células de ovario de hámster chino (CHO), células CHO-S, células CHO-K1,

células 293T, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células Sf9, células madres, células satélites y células musculares. Los ejemplos de células musculares incluyen, entre otros, células musculares esqueléticas, células musculares cardíacas y células musculares lisas.

Las “células procariotas” que generalmente carecen de un núcleo o de cualquier otro orgánulo unido a la membrana y se dividen en dos dominios: bacterias y arquea. Además del ADN cromosómico, estas células también pueden contener información genética en un bucle circular llamado episoma. Las células bacterianas son muy pequeñas, aproximadamente del tamaño de una mitocondria animal (aproximadamente 1-2 μm de diámetro y 10 μm de largo). Las células procariotas tienen tres formas principales: en forma de bastón, esféricas y en espiral. En lugar de pasar por procesos de replicación complejos como las eucariotas, las células bacterianas se dividen por fisión binaria. Los ejemplos incluyen, entre otros, la bacteria *Bacillus*, la bacteria *E. coli*, y la bacteria *Salmonella*.

El término “codificar” cuando se aplica a secuencias de ácido nucleico se refiere a un polinucleótido que se dice que “codifica” un polipéptido si, en su estado natural o cuando se manipula mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, puede transcribirse y/o traducirse para producir el ARNm para el polipéptido y/o un fragmento de este. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante puede deducirse de esta.

Como se usa en la presente descripción, los términos “mantener”, “similar”, y “igual” se usan indistintamente al describir una función, una actividad o una actividad funcional de un polinucleótido, una proteína y/o un péptido, que se refiere a una actividad funcional de al menos aproximadamente 20 % (que incluye pero no se limita a: al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente el 97 %, o aproximadamente 100 %) de la actividad de la proteína de referencia, polinucleótido y/o péptido.

Como se usa en la presente descripción, “expresión” o “expresar” se refiere al proceso mediante el cual los polinucleótidos se transcriben en ARNm y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrito se traduce subsecuentemente en péptidos, polipéptidos, o proteínas. Si el polinucleótido se deriva del ADN genómico, la expresión puede incluir el empalme del ARNm en una célula eucariota.

Como se usa en la presente descripción, el término “funcional” puede usarse para modificar cualquier material biológico, celular o molecular para intentar que logre un efecto específico particular.

Como se usa en la presente descripción, los términos “secuencia de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de

cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, pero no se limita a, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multcatenario, ADN genómico, ADN complementario (ADNc), híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales, o derivadas. En determinadas modalidades, el polinucleótido comprende y/o codifica un ARN mensajero (ARNm), un ARN de horquilla corta, y/o un ARN de horquilla pequeña. En una modalidad, el polinucleótido es un ARNm o lo codifica. En determinadas modalidades, el polinucleótido es un ADN bicatenario (bc), tal como un ADN bicatenario (bc) modificado genéticamente o un ADNc bc sintetizado a partir de un ARN monocatenario.

El término “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se usan indistintamente y en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otro aspecto, la subunidad puede estar unida por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se coloca ninguna limitación en la cantidad máxima de aminoácidos que puede comprender una secuencia de proteína o péptido. Como se usa en la presente descripción, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y ambos isómeros ópticos D y L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

Como se usa en la presente descripción, el término “sistema de expresión recombinante” se refiere a una construcción o construcciones genéticas para la expresión de cierto material genético formado por recombinación.

Un “vehículo de administración génica” o “vector de administración génica” se define como cualquier molécula que puede transportar polinucleótidos insertados en una célula hospedadora. Algunos ejemplos de vehículos de administración génica son los liposomas, polímeros biocompatibles con micelas, que incluyen polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; nanopartículas lipídicas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; envolturas víricas artificiales; partículas metálicas; y bacterias, o virus, como el virus de la rabia, flavivirus, lentivirus, baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófago, cósmido, plásmido, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación típicamente usados en la técnica que se han descrito para la expresión en una variedad de hospedadores eucariotas y procariotas, y pueden usarse para genoterapia, así como también para la expresión simple de proteínas.

Un polinucleótido descrito en la presente descripción puede administrarse a una célula o tejido mediante el uso de un vehículo de administración génica. “Administración génica”, “transferencia génica” “administración basada en ARNm”, “transducción”, y similares como se usan en la presente descripción, son términos que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (a veces denominado “transgén”) en una célula hospedadora, independientemente del método usado para la introducción. Tales métodos incluyen una variedad de técnicas bien conocidas tales como la transferencia génica mediada por vectores (por, por ejemplo, infección/transfección vírica, o varios otros complejos de administración génica basados en proteínas o lípidos, incluidos, por ejemplo, los complejos de protamina, nanopartículas lipídicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas híbridas de polímeros y lípidos, y nanopartículas inorgánicas, o combinaciones de estos), así como también técnicas que facilitan la administración de polinucleótidos “desnudos” (tales como electroporación, administración con “cañón génico” y varias otras técnicas utilizadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido puede ser no modificado o puede comprender una o más modificaciones; por ejemplo, un ARNm modificado puede comprender la adición de caperuzas a ARCA; poliadenilación enzimática para agregar una cola de 100-250 residuos de adenosina; y sustitución de una o ambas de citidina con 5-metilcitidina y/o uridina con pseudouridina. El polinucleótido introducido puede mantenerse de manera estable o transitoria en la célula hospedadora. El mantenimiento estable típicamente requiere que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula hospedadora o se integre en un replicón de la célula hospedadora tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se sabe que una cantidad de vectores es capaz de mediar la transferencia de genes a células de mamíferos, como se conoce en la técnica y se describe en la presente descripción.

Un “plásmido” es una molécula de ADN extracromosómico separada del ADN cromosómico que es capaz de replicarse independientemente del ADN cromosómico. En muchos casos, es circular y bicatenario. Los plásmidos proporcionan un mecanismo para la transferencia génica horizontal dentro de una población de microbios y típicamente proporcionan una ventaja selectiva bajo un estado ambiental dado. Los plásmidos pueden portar genes que proporcionan resistencia a los antibióticos naturales en un nicho ambiental competitivo, o alternativamente las proteínas producidas pueden actuar como toxinas en circunstancias similares.

Los “plásmidos” usados en la ingeniería genética se denominan “vectores de plásmidos”. Muchos plásmidos están disponibles comercialmente para tales usos. El gen que se va a replicar se inserta en

copias de un plásmido que contiene genes que hacen que las células sean resistentes a antibióticos particulares y a un sitio de clonación múltiple (MCS, o polienlazador), que es una región corta que contiene varios sitios de restricción comúnmente usados que permiten la fácil inserción de fragmentos de ADN en esta ubicación. Otro uso importante de los plásmidos es fabricar grandes cantidades de proteínas. En este caso, los investigadores cultivan bacterias que contienen un plásmido que alberga el gen de interés. Así como la bacteria produce proteínas para conferir su resistencia a los antibióticos, también puede inducirse a producir grandes cantidades de proteínas del gen insertado.

Un “cromosoma artificial de levadura” o “YAC” se refiere a un vector usado para clonar fragmentos de ADN grandes (más grandes que 100 kb y hasta 3,000 kb). Es un cromosoma artificialmente construido y contiene las secuencias teloméricas, centroméricas y de origen de replicación necesarias para la replicación y preservación en células de levadura. Fabricados mediante el uso de un plásmido circular inicial, se linealizan mediante el uso de enzimas de restricción, y luego la ligasa de ADN puede agregar una secuencia o gen de interés dentro de la molécula lineal mediante el uso de extremos cohesivos. Los vectores de expresión de levaduras, tales como YAC, YIp (plásmidos integradores de levaduras) y YE_p (plásmidos episómicos de levaduras), son extremadamente útiles ya que uno puede obtener productos de proteínas eucariotas con modificaciones postraduccionales, ya que las levaduras son en sí mismas células eucariotas; sin embargo, se ha descubierto que los YAC son más inestables que los BAC, lo que produce efectos quiméricos.

Como se usa en la presente descripción, el término “cápside vírica” o “cápside” se refiere a la cubierta o recubrimiento proteínico de una partícula vírica. Las cápsides funcionan para encapsidar, proteger, transportar y liberar en la célula hospedadora un genoma vírico. Las cápsides generalmente se componen de subunidades estructurales oligoméricas de proteína (“proteínas de la cápside”). Como se usa en la presente descripción, el término “encapsidado” significa contenido dentro de una cápside vírica.

Como se usa en la presente descripción, el término “cooperador” en referencia a un virus o plásmido se refiere a un virus, una secuencia de ácido nucleico, o un plásmido usado para proporcionar los componentes adicionales necesarios para la replicación y el empaquetamiento de una partícula vírica o una partícula vírica recombinante, tal como el AAV modificado descrito en la presente descripción. Los componentes codificados por un cooperador pueden incluir cualquier gen requerido para el ensamblaje de viriones, encapsidación, replicación del genoma, y/o empaquetamiento. Por ejemplo, el virus cooperador puede codificar las enzimas necesarias para la replicación del genoma vírico.

Los ejemplos no limitantes de virus cooperadores y plásmidos adecuados para su uso con construcciones de AAV incluyen pHELP (plásmido), adenovirus (virus), o herpesvirus (virus).

Como se usa en la presente descripción, una “muestra biológica”, o una “muestra”, puede obtenerse de un sujeto, estirpe celular o célula o tejido cultivado. Las muestras ilustrativas incluyen, entre otras, muestra de células, muestra de tejido, muestras líquidas, como muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico (incluidas, entre otros, líquidos oculares (humor acuoso y vítreo). sangre periférica, suero, plasma, ascitis, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), esputo, saliva, médula ósea, líquido sinovial, humor acuoso, líquido amniótico, cerumen, leche materna, líquido de lavado broncoalveolar, semen, líquido prostático, líquido de Cowper o líquido pre eyaculatorio, eyaculación femenina, sudor, desgarros, líquido del quiste, líquido pleural y peritoneal, líquido pericárdico, ascitis, linfa, quimo, quilo, bilis, líquido intersticial, menstruación, pus, sebo, vómitos, secreciones vaginales/lavado, líquido sinovial, secreción mucosa, heces, jugo pancreático, líquidos de lavado de las cavidades sinusales, aspirados broncopulmonares, líquido de la cavidad blastocítica, o sangre del cordón umbilical.

Como se usa en la presente descripción, el término “marcador detectable” se refiere a al menos un marcador capaz de producir directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no exhaustiva de este marcador incluye enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo, por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, cromóforos como tintes fluorescentes, luminiscentes, grupos con densidad de electrones detectada mediante microscopia electrónica o por su propiedad eléctrica, como la conductividad, amperometría, voltametría, impedancia, grupos detectables, por ejemplo, cuyas moléculas son de tamaño suficiente para inducir modificaciones detectables en sus propiedades físicas y/o químicas, dicha detección puede lograrse mediante métodos ópticos tales como difracción, resonancia de plasmones superficiales, variación de la superficie, cambio del ángulo de contacto o métodos físicos como la espectroscopia de fuerza atómica, efecto túnel, o moléculas radioactivas, como ^{32}P , ^{35}S , ^{89}Zr o ^{125}I .

Como se usa en la presente descripción, el término “marcador de purificación” se refiere a al menos un marcador útil para purificación o identificación. Una lista no exhaustiva de este marcador incluye His, lacZ, GST, proteína de unión a la maltosa, NusA, BCCP, c-myc, CaM, FLAG, GFP, YFP, cherry, tioredoxina, poli(NANP), V5, Snap, HA, proteína de unión a quitina, Softag 1, Softag 3, Strep, o proteína S. El marcador de fluorescencia directo o indirecto adecuado comprende FLAG, GFP, YFP, RFP, dTomato, cherry, Cy3, Cy 5, Cy 5.5, Cy 7, DNP, AMCA, Biotina, Digoxigenina,

Tamra, Texas Red, rhodamina, fluoruros Alexa, FITC, TRITC o cualquier otro tinte o hapteno fluorescente.

Como se usa en la presente descripción, una “etiqueta de epítipo” es una estructura o secuencia biológica, tal como una proteína o carbohidrato, que actúa como un antígeno que es reconocido por un anticuerpo. En determinadas modalidades, una etiqueta de epítipo se usa indistintamente con un marcador de purificación y/o una etiqueta de afinidad.

Una “composición” pretende significar una combinación de dos o más compuestos, tal como una combinación de un polipéptido activo, polinucleótido, vector vírico, o anticuerpo y/u otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, una etiqueta detectable) o activo (por ejemplo, un vehículo de administración génica).

Una “composición farmacéutica” pretende incluir la combinación de un polipéptido, polinucleótido o anticuerpo activo con un portador, inerte o activo tal como un soporte sólido, lo que hace que la composición sea adecuada para el diagnóstico o uso terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Como se usa en la presente descripción, el término “portador farmacéuticamente aceptable” abarca cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como una solución salina amortiguada con fosfato, agua, y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes. Para ver ejemplos de portadores, estabilizadores y adyuvantes, véase Martin (1975) Remington’s Pharm. Sci., 15.^a Ed. (Mack Publ. Co., Easton).

Un “sujeto”, “individuo” o “paciente” se usa indistintamente en la presente descripción, y se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, con mayor preferencia un ser humano. Los mamíferos incluyen, entre otros, primates no humanos, murinos, ratas, conejos, simios, bovinos, ovinos, porcinos, caninos, felinos, animales de granja, animales de deportes, mascotas, equinos, y primates, particularmente humanos. Además de ser útil para el tratamiento humano, la presente invención también es útil para el tratamiento veterinario de mamíferos de compañía, animales exóticos y animales domesticados, que incluyen mamíferos, roedores, y similares. En una modalidad, los mamíferos incluyen caballos, perros, y gatos. En otra modalidad de la presente invención, el ser humano es un adolescente o un lactante menor de dieciocho años de edad.

El término “transducción” o “transducir” se refiere a la transferencia mediada por partículas víricas de material genético en la célula (por ejemplo, transferencia génica mediada por AAV). Véase, por ejemplo, FIELDS y otros, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (3.^a ed., Lippincott-Raven Publishers).

“Tratar” o “tratamiento” de una enfermedad incluye: (1) prevenir la enfermedad, es decir, provocar que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un paciente que pueda estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no experimente o muestre síntomas de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos; o (3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos. En un aspecto, el término “tratamiento” excluye la prevención o profilaxis.

El término “sufrir” en relación con el término “tratamiento” se refiere a un paciente o individuo a quien se le ha diagnosticado una enfermedad o que está predispuesto a una enfermedad.

Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. Dicha administración depende de una serie de variables que incluyen el período para el cual se va a usar la unidad de dosificación individual, la biodisponibilidad del agente terapéutico, la vía de administración, etc. Se entiende, sin embargo, que los niveles de dosis específicos de los agentes terapéuticos de la presente invención para cualquier sujeto particular dependen de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, y la dieta del sujeto, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad del trastorno particular que se está tratando y la forma de administración. Las dosis del tratamiento generalmente se pueden valorar para optimizar la seguridad y la eficacia. En un aspecto, una cantidad eficaz es una cantidad terapéuticamente eficaz.

Típicamente, las relaciones dosis-efecto de las pruebas *in vitro* y/o *in vivo* inicialmente pueden proporcionar orientación útil sobre las dosis adecuadas para la administración al paciente. En general, se desea administrar una cantidad del compuesto que sea eficaz para alcanzar un nivel en suero proporcional a las concentraciones que se encuentran eficaces *in vitro*. La determinación de estos parámetros se encuentra dentro de las habilidades de la técnica. Estas consideraciones, así como también las formulaciones y los procedimientos de administración eficaces, se conocen bien en la técnica y se describen en los libros de texto estándar. De acuerdo con esta definición, como se usa en la presente descripción, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad suficiente para inhibir la replicación del virus del ARN *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*.

El término “administración” incluirá, entre otros, administración oral, parenteral (por ejemplo, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, ICV, inyección o infusión intracisternal, inyección subcutánea, o implante), por inhalación en aerosol nasal, vaginal, rectal, sublingual, uretral (por ejemplo, supositorio uretral) o vías de administración tópicas (por ejemplo, gel, ungüento, crema,

aerosol, etc.) y pueden formularse, solos o juntos, en formulaciones de unidades de dosificación adecuadas que contienen portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, adyuvantes, excipientes, y vehículos adecuados para cada vía de administración. La invención no se limita por la vía de administración, la formulación o el cronograma de dosificación.

5 Como se usa en la presente descripción, el término “AAV” es una abreviatura estándar para virus adenoasociado. El virus adenoasociado de origen natural es un parvovirus de ADN monocatenario que crece solo en células en las que determinadas funciones son proporcionadas por un virus cooperador coinfectante, mientras que el AAV recombinante (rAAV) puede comprender tanto un ADN monocatenario como un ADN autocomplementario. La información general y las revisiones
10 de los AAV se pueden encontrar en, por ejemplo, Carter, Handbook of Parvoviruses, 1:169-228, 1989, y Berns, Virology 174:3-1764, 1999. Sin embargo, se espera que estos mismos principios sean aplicables a serotipos de AAV adicionales, ya que se sabe bien que los diversos serotipos están estrechamente relacionados, tanto estructural como funcionalmente, incluso a nivel genético. (Véase, por ejemplo, Blacklowe, Parvoviruses and Human Disease 165-174, 1988, J. R. Pattison, ed.; y Rose,
15 Comprehensive Virology 3:1-61, 1974). Por ejemplo, todos los serotipos de AAV aparentemente exhiben propiedades de replicación muy similares mediadas por genes rep homólogos; y todos tienen tres proteínas de cápside relacionadas, como las expresadas en AAV2. El grado de relación se sugiere además mediante análisis heterodúplex que revela una extensa hibridación cruzada entre serotipos a lo largo de la longitud del genoma; y la presencia de segmentos autohibridados análogos en los
20 extremos que corresponden a “secuencias de repetición terminal invertidas” (ITR). Los patrones de infectividad similares también sugieren que las funciones de replicación en cada serotipo están bajo control regulador similar.

El término “repetición terminal invertida” o “ITR” incluye cualquier repetición terminal vírica palindrómica o secuencia sintética que forma una estructura de horquilla y funciona como una
25 repetición terminal invertida (es decir, media determinadas funciones víricas tales como replicación, empaquetamiento de virus, integración y/o rescate de provirus, y similares). La ITR puede ser una ITR de AAV o una ITR no AAV. Por ejemplo, una secuencia de ITR no AAV tal como la de otros parvovirus (por ejemplo, parvovirus canino, parvovirus bovino, parvovirus de ratón, parvovirus porcino, parvovirus humano B-19) o la horquilla SV40 que sirve como el origen de la replicación de
30 SV40 puede usarse como una ITR, que puede modificarse además por truncamiento, sustitución, delección, inserción y/o adición. En una modalidad, la ITR es parcial o completamente sintética, tal como la “secuencia doble D” como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5,478,745 de

Samulski y otros. Véase también FIELDS y otros, VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4.^a ed., Lippincott-Raven Publishers). Una “repetición terminal invertida de AAV” o “ITR de AAV” puede ser de cualquier AAV,

incluidos, entre otros, los serotipos 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 13, serpiente

5 AAV, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, AAV de cabra, AAV de camarón, o cualquier otro AAV conocido actualmente o descubierto posteriormente. Una ITR de AAV no necesita tener la

secuencia de repetición terminal natural (por ejemplo, una secuencia de ITR de AAV natural puede alterarse por

10 inserción, delección, truncamiento y/o mutaciones de aminoácidos), siempre y cuando la repetición terminal

media las funciones deseadas, por ejemplo, replicación, empaque de virus, persistencia, y/o rescate de provirus, y similares.

Un “casete de expresión de AAV” como se usa en la presente descripción se refiere a una secuencia
15 de nucleótidos que comprende uno o más polinucleótidos de interés (o transgenes) que están flanqueados por secuencias de repetición terminal de AAV (ITR). Tal casete de expresión de AAV puede replicarse y empaquetarse en partículas víricas infecciosas (por ejemplo, vectores de AAV) cuando están presentes en una célula hospedadora que se ha transfectado con un vector que codifica y expresa productos génicos rep y cap.

20 Un “virión de AAV” o “vector de AAV” o “partícula vírica de AAV” o “partícula de vector de AAV” se refiere a una partícula vírica compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV y un casete de expresión de AAV de polinucleótido encapsidado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido que no es un genoma de AAV de tipo salvaje tal como un transgén que se suministra a una célula de mamífero), se refiere típicamente a una
25 “partícula del vector AAV” o simplemente un “vector AAV”. Por tanto, la producción de la partícula del vector de AAV incluye necesariamente la producción de casete de expresión de AAV, como tal un plásmido está contenido dentro de una partícula del vector de AAV.

El virus adenoasociado (AAV) de origen natural es un parvovirus deficiente en replicación, cuyo genoma de ADN monocatenario tiene una longitud de aproximadamente 4.7 kb, que incluye la
30 repetición terminal invertida (ITR) de 145 nucleótidos. Existen múltiples serotipos de AAV. Se conocen las secuencias de nucleótidos de los genomas de los serotipos de AAV. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del genoma del serotipo 2 de AAV (AAV2) se presenta en Srivastava y

otros, J Virol, 45: 555-564 (1983) según lo corregido por Ruffing y otros, J Gen Virol, 75: 3385-3392 (1994). Como otros ejemplos, el genoma completo de AAV-1 se proporciona en el núm. de registro del GenBank NC_002077; el genoma completo de AAV-3 se proporciona en el núm. de registro del GenBank NC_1829; el genoma completo de AAV-4 se proporciona en el núm. de registro del GenBank NC_001829; el genoma de AAV-5 se proporciona en el núm. de registro del GenBank AF085716; el genoma completo de AAV-6 se proporciona en el número de registro GenBank núm. NC_001862; al menos porciones de genomas de AAV-7 y AAV-8 se proporcionan en los números de registro GenBank AX753246 y AX753249, respectivamente (véase también las patentes de Estados Unidos núm. 7.282.199 y 7.790.449 con relación a AAV-8); el genoma AAV-9 se proporciona en Gao y otros, J. Virol., 78: 6381-6388 (2004); el genoma AAV-10 se proporciona en Mol. Ther., 13(1): 67-76 (2006); y el genoma de AAV-11 se proporciona en Virology, 330(2): 375-383 (2004). La clonación del serotipo rAAVh.74 se describe en Rodino-Klapac., y otros, Journal of translational medicine 5, 45 (2007). Las secuencias de acción Cis que dirigen la replicación del ADN vírico (rep), la encapsidación/empaquetamiento y la integración de cromosomas de células hospedadoras se encuentran dentro de las ITR. Tres promotores de AAV (llamados p5, p19 y p40 para sus ubicaciones en mapas relativas) impulsan la expresión de los dos marcos de lectura abiertos internos de AAV que codifican genes rep y cap. Los dos promotores rep (p5 y p19), junto con el empalme diferencial del único intrón de AAV (por ejemplo, en los nucleótidos de AAV2 2107 y 2227), resultan en la producción de cuatro proteínas rep (rep 78, rep 68, rep 52, y rep 40) a partir del gen rep. Las proteínas rep poseen múltiples propiedades enzimáticas que son en última instancia responsables de replicar el genoma vírico. El gen cap se expresa del promotor p40 y codifica las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. Los empalmes alternativos y los sitios de inicio traduccionales sin consenso son responsables de la producción de las tres proteínas de la cápside relacionadas. En la posición 95 del mapa del genoma del AAV se encuentra un único sitio de poliadenilación de consenso. El ciclo de vida y la genética de los AAV se revisan en Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158: 97-129 (1992).

Los genomas de AAV recombinantes de la descripción comprenden molécula de ácido nucleico de la invención y una o más ITR de AAV que flanquean una molécula de ácido nucleico. El ADN de AAV en los genomas de rAAV puede ser de cualquier serotipo de AAV para el cual pueda derivarse un virus recombinante, incluidos, entre otros, los serotipos de rAAVh.74, rAAVh.10, rAAVh.20, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 y AAV-13. La producción de rAAV pseudotipado se describe en, por ejemplo, WO

01/83692. También se contemplan otros tipos de variantes de rAAV, por ejemplo, rAAV con mutaciones de cápside. Véase, por ejemplo, Marsic y otros, *Molecular Therapy*, 22(11): 1900-1909 (2014). Como se indicó en la sección de Antecedentes anterior, las secuencias de nucleótidos de los genomas de varios serotipos de AAV se conocen en la técnica. En algunas modalidades, para promover la expresión específica del músculo esquelético, se usa AAV1, AAV6, AAV8 o rAAVh.74.

Como se usa en la descripción y las reivindicaciones, la forma singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de estas.

Como se usa en la presente descripción, el término “que comprende” o “comprende” pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos mencionados, pero no excluyen otros. “Que consiste esencialmente en” cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación para el propósito indicado. Por lo tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en la presente descripción no excluiría oligocontaminantes del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina amortiguada con fosfato, conservantes y similares. “Que consiste de” significará excluir más que oligoelementos de otros ingredientes y etapas de método sustanciales para administrar las composiciones de esta invención o etapas de proceso para producir una composición o lograr un resultado previsto. Las modalidades definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

El término “aislado” como se usa en la presente descripción con respecto a los ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente, que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. El término “ácido nucleico aislado” pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que no se producen naturalmente como fragmentos. El término “aislado” también se usa en la presente descripción para referirse a polipéptidos, proteínas y/o células hospedadoras que se aíslan de otras proteínas celulares y se pretende que abarquen tanto polipéptidos purificados como recombinantes. En otras modalidades, el término “aislado” significa separado de constituyentes, celulares y de cualquier otra manera, en los que la célula, tejido, polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de estos, que se asocian normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, una célula aislada es una célula que se separa de tejido o células de fenotipo o genotipo diferentes. Como es evidente para los expertos en la técnica, un

polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de origen no natural de estos, no requiere “aislamiento” para distinguirlo de su homólogo natural.

El término “recombinante” como se usa en la presente descripción con respecto a polipéptidos o polinucleótidos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas formadas por métodos de

laboratorio de recombinación, tales como clonación molecular. Las técnicas de clonación molecular se conocen en la técnica y pueden incluir, entre otras, amplificación por PCR de un polinucleótido, digestión enzimática de un polinucleótido, ligadura de un polinucleótido en un casete de expresión (por ejemplo, casete de expresión en mamíferos), transformación, transfección o transducción de una célula con el polinucleótido, y expresión del polinucleótido para producir el polipéptido. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2012. El término “polinucleótido recombinante” pretende incluir fragmentos de polinucleótidos que codifican proteínas. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante puede incluir un fragmento del polinucleótido que codifica una proteína disferlina humana. Un polinucleótido recombinante puede producirse mediante amplificación por PCR de un fragmento de un polinucleótido que codifica una proteína. Un polipéptido recombinante puede producirse mediante la expresión de uno o más polinucleótidos recombinantes. En una modalidad, el polipéptido “recombinante” se refiere a un polipéptido que está separado o sustancialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus que se produce naturalmente, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o víricos u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados asociados con el polipéptido.

El término “secuencia Rep” o “secuencia codificante Rep” se refiere a las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas no estructurales parvovíricas o AAV que median la replicación vírica y la producción de nuevas partículas víricas. Los genes y proteínas de replicación de parvovirus y AAV se han descrito en, por ejemplo, *FIELDS* y otros, *VIROLOGY*, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4.^a ed., Lippincott-Raven Publishers). No es necesario que las “secuencias codificantes de rep.” codifiquen todas las proteínas parvovíricas o de AAV rep. Por ejemplo, con respecto al AAV, las secuencias codificantes de Rep no necesitan codificar las cuatro proteínas Rep del AAV (Rep78, Rep 68, Rep52 y Rep40), de hecho, se cree que el AAV solo expresa las proteínas Rep68 y Rep40 empalmadas. En modalidades representativas, las secuencias codificantes de Rep codifican al menos aquellas proteínas de replicación que son necesarias para la replicación y el empaquetamiento del genoma vírico o del vector en nuevos viriones. Las secuencias codificantes de Rep generalmente codificarán al menos una proteína Rep grande (es decir, Rep78/68) y una proteína

Rep pequeña (es decir, Rep52/40). En modalidades particulares, las secuencias codificantes de Rep codifican la proteína Rep78 del AAV y las proteínas Rep52 y/o Rep40 del AAV. En otras modalidades, las secuencias codificantes de Rep codifican la proteína Rep68 y las Rep52 y/o Rep40. En una modalidad adicional, las secuencias codificantes de Rep codifican las proteínas Rep68 y Rep52, las proteínas Rep68 y Rep40, las proteínas Rep78 y Rep52, o las proteínas Rep78 y Rep40. En el genoma del AAV natural, las diferentes proteínas Rep son codificadas por un solo gen mediante el uso de dos promotores diferentes y empalmes alternativos. Para los fines de la producción del vector de AAV, sin embargo, las proteínas Rep pueden expresarse en células productoras de un solo gen, o de polinucleótidos distintos, una secuencia para cada proteína Rep que se va a expresar. Por lo tanto, por ejemplo, un gen que codifica Rep puede modificarse genéticamente para inactivar el promotor p5 o p19 de manera que solo se expresan proteínas Rep pequeñas o solo grandes.

Como se usa en la presente descripción, el término “secuencia de cap” o “secuencias codificantes de cap” se refiere a las proteínas estructurales que forman una cápside funcional (es decir, pueden empaquetar ADN e infectar células diana), por ejemplo, cápsides de parvovirus o AAV. En una modalidad, las secuencias codificantes de cap codifican todas las subunidades de la cápside de parvovirus o AAV, pero menos de todas las subunidades de la cápside pueden codificarse siempre que se produzca una cápside funcional. En otra modalidad, las secuencias de cap están presentes en una molécula de ácido nucleico única. La estructura de la cápside de los parvovirus y AAV autónomos se describe en más detalle en BERNARD N. FIELDS y otros, VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4.^a ed., Lippincott-Raven Publishers). Un plásmido rep-cap es un plásmido que codifica los genes Rep y Cap de uno o más AAV.

En algunas modalidades, un vector vírico adenoasociado (AAV) comprende: (a) una primera repetición terminal invertida (ITR); (b) un polinucleótido que codifica un gen o fragmento génico; y (c) una segunda ITR, en donde el polinucleótido está flanqueado por la primera y la segunda ITR. El polinucleótido que codifica un gen a menudo forma complejos con elementos reguladores tales como un promotor, un potenciador, un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), un intrón, un terminador de transcripción y/o una secuencia de señal de cola poliA.

En la presente descripción se describen además vectores víricos adenoasociados (AAV). En algunas modalidades, los vectores de AAV comprenden cualquier gen o fragmento génico.

En algunas modalidades, los polinucleótidos, plásmidos, vectores víricos (por ejemplo, virus o partículas víricas), sistemas de vectores, sistemas de empaquetamiento vírico, células, y composiciones comprenden además una o más secuencias de nucleótidos que comprenden, que

consisten de, o consisten esencialmente en una repetición terminal invertida (ITR), promotor, intrón, marcador de selección, u origen de replicación (ORI).

En algunas modalidades, los polinucleótidos, plásmidos, vectores víricos, sistemas de vectores, sistemas de empaquetamiento vírico, células, y composiciones comprenden además una o más
5 secuencias de nucleótidos adicionales que comprenden una repetición terminal invertida (ITR), marcador de selección, origen de replicación (ORI), región no traducida (UTR), o señal de poliadenilación (poliA).

En la presente se describen además los usos de cualquiera de los polinucleótidos, plásmidos, vectores víricos, sistemas de vectores, sistemas de empaquetamiento vírico, células, y composiciones
10 descritas en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

Repeticiones de terminales invertidas

En algunas modalidades, los polinucleótidos, plásmidos, vectores víricos, sistemas de vectores, sistemas de empaquetamiento viral, células, y composiciones comprenden además una secuencia de
15 nucleótidos que comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una o más repeticiones terminales invertidas (ITR). En algunas modalidades, los polinucleótidos, plásmidos, vectores víricos, sistemas de vectores, sistemas de empaquetamiento viral, células, y composiciones comprenden además dos, tres, cuatro, cinco, o seis o más secuencias de nucleótidos que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en dos, tres, cuatro, cinco, o seis o más ITR. En algunas
20 modalidades, las dos o más ITR son las mismas. En algunas modalidades, las dos o más ITR son diferentes.

En algunas modalidades, el polinucleótido recombinante está flanqueado por las dos o más ITR. En algunas modalidades, el gen o fragmento génico está flanqueado por un par de ITR. En algunas modalidades, la [secuencia de casete de expresión] está flanqueada por el par de ITR. En algunas
25 modalidades, las ITR en el primer par de ITR son las mismas. En algunas modalidades, las ITR en el primer par de ITR son diferentes. En algunas modalidades, las ITR en el segundo par de ITR son las mismas. En algunas modalidades, las ITR en el segundo par de ITR son diferentes. En algunas modalidades, las ITR en el primer par de ITR son las mismas que las ITR en el segundo par de ITR. En algunas modalidades, al menos una ITR en el primer par de ITR es la misma que al menos una
30 ITR en el segundo par de ITR. En algunas modalidades, las ITR en el primer par de ITR son diferentes de las ITR en el segundo par de ITR. En algunas modalidades, al menos una ITR en el primer par de ITR es diferente de al menos una ITR en el segundo par de ITR.

En algunas modalidades, la ITR es una ITR vírica. En algunas modalidades, la ITR es una ITR de AAV. En algunas modalidades, la ITR de AAV se selecciona de una ITR de al menos uno de los serotipos de AAV rAAVh.20, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, rAAVh.74, AAV-8, AAV-9, AAV-10, rAAVh.10, AAV-11, AAV-12 y AAV-13. En algunas modalidades, la ITR de AAV es una ITR de AAV2. En algunas modalidades, la ITR de AAV es una ITR de AAV5. Las secuencias de ITR para AAV1-6 pueden encontrarse, por ejemplo, en Grimm y otros, J. Virol.80(1):426-39, 2006, que se incorpora como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el polinucleótido recombinante no comprende una secuencia de AAV que no sea una repetición terminal invertida (ITR).

- 10 En algunas modalidades, el polinucleótido recombinante no comprende una secuencia vírica que no sea una repetición terminal invertida (ITR).

Promotor

- En algunas modalidades, los polinucleótidos, plásmidos, vectores víricos, sistemas de vectores, sistemas de empaquetamiento viral, células, y composiciones comprenden además una secuencia de nucleótidos que comprende, que consiste de, o consiste esencialmente en uno o más promotores. En algunas modalidades, el promotor es un promotor eucariota. Los ejemplos de promotores eucariotas incluyen, entre otros, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1a), un promotor de CAG, un promotor del gen de fosfolicerato cinasa (PGK), un promotor del elemento de respuesta a la tetraciclina (TRE), un promotor nuclear U6 humano (U6) y un promotor de UAS. En algunas modalidades, el promotor es un promotor de mamífero. En algunas modalidades, el promotor es un promotor constitutivo. En algunas modalidades, el promotor es un promotor inducible.

- En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de tejido. Los ejemplos de tejidos incluyen, entre otros, tejido muscular, epitelial, conjuntivo y nervioso. Los ejemplos de promotores específicos de tejidos incluyen, entre otros, promotor B29, promotor CD14, promotor CD43, promotor CD45, promotor CD68, promotor de desmina, promotor de elastasa-1, promotor de endoglina, promotor de fibronectina, promotor de Flt-1, promotor de GFAP, promotor de ICAM-2, promotor de INF- β , promotor de Mb, promotor de NphsI, promotor de OG-2, promotor de SP-B, promotor de SYN1, promotor de WASP, promotor de SV40/bAlb, promotor de SV40/hAlb, promotor de SV40/CD43, promotor de SV40/CD45, y promotor de NSE/RU5'.

En algunas modalidades, el promotor es un promotor recombinante. En algunas modalidades, el promotor recombinante es un promotor recombinante específico del músculo. En algunas

modalidades, el promotor recombinante específico del músculo es un promotor recombinante específico del músculo de la miosina de cadena pesada-creatina cinasa. En otra modalidad, el promotor específico de los músculos comprende un elemento génico de actina esquelética humana, un elemento génico de actina cardíaca, un promotor de desmina, un promotor de alfa-actina esquelética (ASKA), un promotor de troponina I (TNNI2), un elemento de unión al factor de unión a potenciadores específicos de miocitos mef, un promotor de creatina cinasa muscular (MCK), un promotor de MCK truncada (tMCK), un promotor de cadena pesada de miosina (MHC), un promotor de potenciador de cadena pesada de α -miosina/promotor de potenciador de MCK (MHCK7) híbrido, un promotor de C5-12, un elemento potenciador de la creatina quinasa murina, un elemento génico de troponina c esquelética de contracción rápida, un elemento génico de troponina c cardíaca de contracción lenta, un elemento génico de troponina i de contracción lenta, factor nuclear inducible por hipoxia.

Señal de poliadenilación

En algunas modalidades, los polinucleótidos, plásmidos, vectores víricos, sistemas de vectores, sistemas de empaquetamiento viral, células, y composiciones comprenden además una secuencia de nucleótidos que comprende, que consiste de, o consiste esencialmente en una o más señales de poliadenilación (poliA). En algunas modalidades, la señal de poliA es una señal de poliA artificial.

Casetes de expresión y sistemas de empaquetamiento

En la presente se describen además casetes de expresión víricos adenoasociados (AAV). En algunas modalidades, el casete de expresión de AAV comprende: (a) una primera repetición terminal invertida (ITR), en donde la primera ITR comprende cualquiera de las ITR descritas en la presente descripción; (b) cualquier gen o fragmento génico descrito en la presente descripción; y (c) una segunda ITR, en donde la segunda ITR comprende cualquiera de las ITR descritas en la presente descripción, en donde el gen o fragmento génico de (b) se flanquea por la primera y segunda ITR de (a) y (c).

En la presente se describen además plásmidos víricos adenoasociados (AAV). En algunas modalidades, el casete de expresión de AAV comprende: (a) una primera repetición terminal invertida (ITR), en donde la primera ITR comprende cualquiera de las ITR descritas en la presente descripción; (b) cualquier gen o fragmento génico descrito en la presente descripción; y (c) una segunda ITR, en donde la segunda ITR comprende cualquiera de las ITR descritas en la presente descripción, en donde el gen o fragmento génico de (b) se flanquea por la primera y segunda ITR de (a) y (c).

En la presente descripción se describen además sistemas de empaquetamiento vírico adenoasociado (AAV). En algunas modalidades, los sistemas de empaquetamiento de AAV comprenden: (a) cualquiera de los casetes de expresión descritos en la presente descripción; (b) un plásmido cooperador de adenovirus; y (c) un plásmido rep-cap. En algunas modalidades, el plásmido cooperador de adenovirus comprende uno o más genes de un adenovirus. En algunas modalidades, el uno o más genes del adenovirus median la replicación del AAV. En algunas modalidades, el uno o más genes del adenovirus se seleccionan de E4, E2a, y VA. En algunas modalidades, el plásmido rep-cap comprende uno o más polinucleótidos que codifican los genes de rep y cap de virus adenoasociados. En algunas modalidades, el gen rep codifica una o más de las proteínas del ciclo de vida seleccionadas de Rep78, Rep68, Rep62, y Rep40. En algunas modalidades, el gen cap codifica una o más de las proteínas de la cápside seleccionadas de VP1, VP2 y VP3. En algunas modalidades, el casete de expresión comprende una o más ITR. En algunas modalidades, las ITR son ITR de AAV. En algunas modalidades, el serotipo de las ITR de AAV es el mismo que el serotipo de la proteína de la cápside de AAV. En algunas modalidades, el serotipo de las ITR de AAV es diferente del serotipo de la proteína de la cápside de AAV. En algunas modalidades, el serotipo del gen rep de AAV es el mismo que el serotipo de la proteína de la cápside de AAV. En algunas modalidades, el serotipo del gen rep de AAV es diferente del serotipo de la proteína de la cápside de AAV.

En algunas modalidades, los sistemas de empaquetamiento de AAV comprenden: (a) cualquiera de los casetes de expresión descritos en la presente descripción; (b) un plásmido cooperador de adenovirus; y (c) un plásmido rep-cap. En algunas modalidades, el plásmido cooperador de adenovirus comprende uno o más genes de un adenovirus. En algunas modalidades, el uno o más genes del adenovirus median la replicación del AAV. En algunas modalidades, el uno o más genes del adenovirus se seleccionan de E4, E2a, y VA. En algunas modalidades, el plásmido rep-cap comprende uno o más polinucleótidos que codifican los genes de rep y cap de virus adenoasociados. En algunas modalidades, el gen rep codifica una o más de las proteínas del ciclo de vida seleccionadas de Rep78, Rep68, Rep62, y Rep40. En algunas modalidades, el gen cap codifica una o más de las proteínas de la cápside seleccionadas de VP1, VP2 y VP3. En algunas modalidades, el casete de expresión de AAV 3' hDYSF comprende una o más ITR. En algunas modalidades, las ITR son ITR de AAV. En algunas modalidades, el serotipo de las ITR de AAV es el mismo que el serotipo de la proteína de la cápside de AAV. En algunas modalidades, el serotipo de las ITR de AAV es diferente del serotipo de la proteína de la cápside de AAV. En algunas modalidades, el serotipo del gen rep de AAV es el mismo que el serotipo de la proteína de la cápside de AAV. En algunas

modalidades, el serotipo del gen rep de AAV es diferente del serotipo de la proteína de la cápside de AAV.

En algunas modalidades, el sistema de empaquetamiento vírico adenoasociado comprende: (a) cualquiera de los casetes de expresión descritos en la presente descripción; y (b) un plásmido cooperador de adenovirus. En algunas modalidades, el plásmido cooperador de adenovirus comprende uno o más genes de un adenovirus. En algunas modalidades, el uno o más genes del adenovirus median la replicación del AAV. En algunas modalidades, el uno o más genes del adenovirus se seleccionan de E4, E2a, y VA.

En algunas modalidades, el sistema de empaquetamiento vírico adenoasociado comprende: (a) cualquiera de los casetes de expresión descritos en la presente descripción; y (b) un plásmido cooperador de adenovirus. En algunas modalidades, el plásmido cooperador de adenovirus comprende uno o más genes de un adenovirus. En algunas modalidades, el uno o más genes del adenovirus median la replicación del AAV. En algunas modalidades, el uno o más genes del adenovirus se seleccionan de E4, E2a, y VA.

Vectores víricos

En la presente se describen además vectores víricos adenoasociados (AAV) (por ejemplo, virus de AAV o partículas de AAV). En algunas modalidades, los vectores de AAV comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el vector de AAV es un AAV de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, rh.10, rh.20, o rh.74. En algunas modalidades, el vector de AAV es un AAV de un serotipo rh.74.

En la presente se describen además sistemas de vectores víricos adenoasociados (AAV) dobles que comprenden dos o más de los vectores de AAV descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el sistema de vector de AAV doble comprende: (a) un primer vector de AAV, en donde el primer vector de AAV comprende cualquiera del gen o fragmento génico descrito en la presente descripción; y (b) un segundo vector de AAV, en donde el segundo vector de AAV comprende cualquiera de los polinucleótidos 3' hDYSF descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el sistema de vector de AAV doble comprende, consiste en, o consiste esencialmente en: (a) un primer vector de AAV, en donde el primer vector de AAV comprende, consiste en, o consiste esencialmente en cualquiera de los vectores de AAV descritos en la presente descripción; y (b) un segundo vector de AAV.

Composiciones

En la presente se describen además composiciones que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. En la presente se describen además composiciones que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente. En la presente se describen además composiciones que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en cualquiera de los plásmidos descritos en la presente. En la presente se describen además composiciones que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en cualquiera de los sistemas de vector de AAV doble descritos en la presente. En la presente se describen además composiciones que comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en cualquiera de los vectores de AAV descritos en la presente.

En la presente se describe además una composición que comprende, consiste, o consiste esencialmente en: (a) un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV), en donde el vector de rAAV comprende, consiste, o consiste esencialmente en cualquiera del gen o fragmento génico descrito en la presente descripción; y (b) un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En la presente se describe además una composición que comprende, consiste, o consiste esencialmente en: (a) un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV), en donde el rAAV comprende, consiste, o consiste esencialmente en cualquiera del gen o fragmento génico descrito en la presente descripción; y (b) un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción comprende además al menos uno de un portador, diluyente, excipiente, o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Los portadores, diluyentes y adyuvantes aceptables no son tóxicos para los receptores y son preferentemente inertes en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen amortiguadores y surfactantes tales como plurónicos. Los ejemplos de portadores aceptables incluyen, entre otros, solución salina amortiguada con fosfato, conservantes y similares. El portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser adecuado para el uso inyectable. Los ejemplos de portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los

casos, la forma debe ser estéril y debe ser líquida en la medida en que exista una facilidad de administración. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra las acciones contaminantes de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de estos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo mediante el uso de agentes que demoran la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polinucleótidos, plásmidos, vectores víricos, o sistemas de vectores dobles descritos en la presente descripción en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización con filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución filtrada previamente.

Métodos para producir vectores de AAV

En la presente se describen métodos para producir un vector vírico adenoasociado (AAV) (por ejemplo, virus o partícula vírica). Los métodos para producir vectores de AAV se conocen en la técnica. Por ejemplo, tales métodos se describen en, por ejemplo, WO 01/83692, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Los principios generales de la producción de AAV se revisan en, por ejemplo, Carter, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-1539; y Muzyczka, 1992, *Curr. Topics in Microbial. and Immunol.* 158:97-129, 1992, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad. Varios enfoques para producir AAV se describen en Ratschin y otros, *Mol. Cell. Biol.* 4:2072, 1984; Hermonat y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466, 1984; Tratschin y otros, *Mol. Cell. Biol.* 5:3251, 1985; McLaughlin y otros, *J. Virol.*,

62:1963, 1988; y Lebkowski y otros, Mol. Cell. Biol., 7:349, 1988; Samulski y otros, J. Virol., 63:3822-3828, 1989; patente de Estados Unidos núm. 5,173,414; WO 95/13365 y la correspondiente patente de Estados Unidos núm. 5,658,776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin y otros, Vaccine 13:1244-1250, 1995; Paul y otros, Human Gene Therapy 4:609-615, 1993, Clark y otros, Gene Therapy 3:1124-1132, 1996; patente de estados Unidos núm. 5,786,211; patente de Estados Unidos núm. 5,871,982; y patente de Estados Unidos. núm. 6,258,595, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el método para producir un vector vírico adenoasociado (AAV) comprende transducir una célula con cualquiera de los sistemas de empaquetamiento de AAV descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la célula es una célula eucariota. En algunas modalidades, la célula es una célula de mamífero. En algunas modalidades, la célula es una célula recombinante que expresa de manera estable los genes de rep y cap de virus adenoasociados. En algunas modalidades, el método comprende además cultivar la célula para producir una población de células transducidas. En algunas modalidades, el método comprende además recolectar el sobrenadante de la población de células transducidas. En algunas modalidades, el método comprende además someter el sobrenadante a una o más etapas de purificación para producir una muestra de vector de AAV purificado, en donde la muestra de vector de AAV está sustancialmente libre de residuos y proteínas celulares. Alternativa o adicionalmente, el método comprende además lisar la población de células transducidas para producir un lisado celular. En algunas modalidades, el método comprende además someter el lisado celular a una o más etapas de purificación para producir una muestra de vector de AAV purificado, en donde la muestra de vector de AAV está sustancialmente libre de restos y proteínas celulares. En algunas modalidades, la pureza de la muestra del vector de AAV purificado es al menos 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % pura. Sin embargo, incluso un AAV purificado puede contener subpoblaciones que tienen variaciones de la cápside, que incluyen modificaciones postraduccionales, o varias cantidades y composiciones de ácidos nucleicos.

Células

En la presente se describen además células que comprenden cualquiera de los plásmidos, casetes de expresión o vectores de AAV descritos en la presente. Las células pueden ser células procariotas o

eucariotas. Los ejemplos no limitantes de células eucariotas incluyen células de mamíferos, por ejemplo, células de hámster, murinas, de rata, caninas, ovinas o humanas.

Cualquiera de las células descritas en la presente descripción pueden ser células de empaquetamiento que producen rAAV infeccioso. En algunas modalidades, las células de empaquetamiento son células cancerígenas que se transforman de manera estable tales como células HeLa, células 293 y células PerC.6 (una línea 293 cognada). En otra modalidad, las células de empaquetamiento son células que no son células cancerosas transformadas, tales como células 293 de pasaje bajo (células renales fetales humanas transformadas con E1 de adenovirus), células MRC-5 (fibroblastos fetales humanos), células WI-38 (fibroblastos fetales humanos), células Vero (células renales de mono) y células FRhL-2 (células pulmonares fetales de recto). Los ejemplos no limitantes de células procariotas comprenden células bacterianas (por ejemplo, *Escherichia coli*) y células arqueas. Las células de la descripción pueden usarse para producir un banco de células, por ejemplo, Accession Cell Banks (ACB) para fines no GMP o Master Cell Bank (MCB) GMP. La alícuota de las células, en una modalidad, se expande de un inóculo original a un volumen mayor antes del cultivo en el biorreactor para la producción.

Valores víricos

Los valores de vectores de AAV que se administrarán en métodos de la invención variarán en dependencia, por ejemplo, del AAV particular, el modo de administración, el objetivo de tratamiento, el individuo, y el/los tipo(s) de célula a los que se dirige, y pueden determinarse mediante métodos estándar en la técnica. Los valores de AAV pueden variar de aproximadamente al menos 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 1×10^{14} o más partículas resistentes a la DNasa (DRP) por ml. Las dosis también pueden expresarse en unidades de genomas virales (vg). Por ejemplo, las dosis de AAV pueden variar de al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 2×10^{12} , aproximadamente 3×10^{12} , aproximadamente 4×10^{12} , aproximadamente 5×10^{12} , aproximadamente 6×10^{12} , aproximadamente 7×10^{12} , aproximadamente 8×10^{12} , aproximadamente 9×10^{12} aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 1×10^{14} genomas víricos.

La dosificación de AAV puede determinarse mediante múltiples métodos, que incluyen, entre otros, ELISA, evaluación de la actividad de la transcriptasa inversa, FACS, ensayos de transducción

mediante método Northern (por ejemplo, Northern semicuantitativo), análisis de transferencia de puntos o PCR (por ejemplo, qPCR). Es bien sabido que las dosis de AAV pueden determinarse midiendo los genomas de vectores de AAV con PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Dichos métodos de qPCR superan la inconsistencia o los resultados arbitrarios de los ensayos de transducción convencionales. En una modalidad de determinación de la dosificación de PCR, el ADN de plásmido se usa como un estándar de calibración. Las formas de los plásmidos pueden afectar los resultados de dosificación de los métodos de qPCR. En una modalidad, el ADN o plásmidos circulares o superenrollados se usan como un estándar de cuantificación.

En algunas modalidades, las dosis pueden expresarse en las unidades de vg/kg, en función de un ADN o plásmido superenrollado como el estándar de cuantificación. Por ejemplo, las dosificaciones de AAV son aproximadamente 1×10^6 - 1×10^{16} vg/kg, aproximadamente 1×10^8 - 1×10^{15} vg/kg, o aproximadamente 1×10^{10} - 1×10^{14} vg/kg, en función de un ADN o plásmido superenrollado como el estándar de cuantificación. En otra modalidad, las dosis son de aproximadamente al menos 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 2×10^{12} , aproximadamente 4×10^{12} , aproximadamente 6×10^{12} , aproximadamente 8×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} , aproximadamente 2×10^{13} , aproximadamente 2.4×10^{13} , aproximadamente 3×10^{13} , aproximadamente 4×10^{13} , aproximadamente 5×10^{13} , aproximadamente 6×10^{13} , aproximadamente 7×10^{13} , aproximadamente 8×10^{13} , aproximadamente 9×10^{13} , aproximadamente 1×10^{14} , aproximadamente 1×10^{15} , o al menos aproximadamente 1×10^{16} vg/kg. En una modalidad, la dosificación es al menos 2×10^{12} , 4×10^{12} , 6×10^{12} , 8×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 2.4×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , u 8×10^{13} vg/kg, en función de un ADN superenrollado o plásmido como el estándar de cuantificación.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden administrar al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 2×10^{12} , aproximadamente 3×10^{12} , aproximadamente 4×10^{12} , aproximadamente 5×10^{12} , aproximadamente 6×10^{12} , aproximadamente 7×10^{12} , aproximadamente 8×10^{12} , aproximadamente 9×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} vg en un volumen total de 1.5 ml por inyección. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden administrar una dosis diaria total de al menos aproximadamente 1×10^6 ; aproximadamente 1×10^7 ; aproximadamente 1×10^8 ; aproximadamente 1×10^9 ; aproximadamente 1×10^{10} ; aproximadamente

1x10¹¹; aproximadamente 1x10¹²; aproximadamente 2x10¹²; aproximadamente 3x10¹²; aproximadamente 4x10¹²; aproximadamente 5x10¹²; aproximadamente 6x10¹²; aproximadamente 7x10¹²; aproximadamente 8x10¹²; aproximadamente 9x10¹²; aproximadamente 1x10¹³; aproximadamente 2x10¹³; aproximadamente 5x10¹³; aproximadamente 7x10¹³; aproximadamente 1x10¹⁴ vg. Un método ilustrativo para determinar el valor del genoma del vector encapsidado usa PCR cuantitativa, tal como los métodos descritos en Pozsgai y otros, Mol. Ther. 25(4): 855-869, 2017, que se incorpora como referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

10 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que se entiende frecuentemente por un experto en la técnica al que pertenece esta tecnología.

La presente tecnología descrita ilustrativamente en la presente descripción puede practicarse adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos específicamente en la presente descripción. Por lo tanto, por ejemplo, los términos “que comprende”, “que incluye,” “que contiene,” *etc.* se leerán de manera expansiva y sin limitación. Adicionalmente, los términos y expresiones empleados en la presente descripción se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de estas, pero se reconoce que varias modificaciones son posibles dentro del alcance de la presente tecnología reivindicada.

Por lo tanto, debe entenderse que los materiales, métodos, y ejemplos proporcionados aquí son representativos de aspectos preferidos, son ilustrativos, y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la presente tecnología.

25 La presente tecnología se ha descrito de manera amplia y genérica en la presente descripción. Cada una de las especies más estrechas y agrupaciones subgenéricas que caen dentro de la descripción genérica también forman parte de la presente tecnología. Esto incluye la descripción genérica de la presente tecnología con una condición o limitación negativa que elimina cualquier objeto del género, independientemente de si el material escindido se menciona específicamente en la presente descripción.

30 Además, cuando las características o aspectos de la presente tecnología se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la presente tecnología también se

describe de esta manera en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en la presente descripción se incorporan expresamente como referencia en su totalidad, en la misma medida que si cada una se incorporara individualmente como referencia. En caso de conflicto,

Otros aspectos se exponen dentro de las siguientes reivindicaciones.

Ejemplo 1: Transfección de células adherentes HEK293

Dejar que las células recién descongeladas se recuperen en el cultivo durante tres o más pasajes después de descongelarse antes de la transfección. Hacer pasajes de cultivos celulares cada 3 o 4 días. La viabilidad celular del cultivo celular no debe superar 5.5×10^6 células/ml. Cuatro días antes de la transfección, sembrar los matraces T-175 a 7,000 a 14,000 células/cm² en DMEM completo a 35 ml.

El día de la transfección, preparar el medio DMEM sin suero agregando GlutaMAX 100X a una concentración 1X (5 ml) y 450 g/l de glucosa hasta alcanzar un total de 6 g/l (1.66 ml). Preparar los complejos de transfección utilizando un medio DMEM sin suero precalentado como diluyente. Preparar la mezcla de polietilenimina (PEI) en un tubo cónico de 50 ml para cada condición e incubar durante 5 minutos. Preparar la mezcla de ADN en un tubo cónico de 50 ml para cada condición. Agregar la mezcla de PEI a la mezcla de ADN y mezclar bien. Después de diez minutos, pipetear la mezcla en matraces de 3.5 ml para cada matraz. Devolver el matraz al agitador de la incubadora. De dos a 18 horas después de la transfección, agregar aditivos (Tabla I) a los matraces. El día después de la transfección, aspirar el medio y reemplazarlo con 35 ml de medio precalentado sin suero que contenga aditivos. Cuatro días después de la transfección, agregar 10 % v/v de amortiguador de lisis nuevo (500 mM de Tris-HCl con pH 8.0, 20 mM de MgCl₂ y 1 % de TWEEN-20) a los matraces e incubar a 37 °C durante dos horas. Centrifugar el lisado 300 x g a temperatura ambiente durante diez minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo cónico y filtrar utilizando un filtro de 0.45 µm. Hacer dos alícuotas de 200 µl y cuatro alícuotas de 1.5 ml de cada matraz y almacenar a -80 °C.

Tabla 1. Aditivos analizados para detectar la capacidad de mejorar la producción de AAV.

#	Clase	Enfoque	Sistema de producción	Valor/proteína	Efecto Agregación	Valores bibliográficos	Tiempo (h)
1	Osmolalidad	Cloruro de sodio	AAV	+		60 mM (109.5 en total)	4
2		Cloruro de calcio	Adenovirus	+	+	500 uM	2
3		Acetato de litio	VLP	+		20 mM	-3
4	Productos orgánicos volátiles	Alcohol etílico	Adenovirus	+		100 mM	4
5		DMSO	VLP/adenovirus		mezclado	1.00 - 1.25 %	4
6	Agentes redox	Citrato férrico	Proteína	+		12 mg/L	24
7	Quelante	EGTA	AAV		-	2 mM	-1
8	Epigenética	Butirato de sodio	Múltiple	+		1.0 - 4.0 mM	18
9		Acido valproico	Proteína	+		3.36 mM	4
10	Aminas	N-acetil-L-cisteína	Adenovirus	+		2.5 mM	4
11		Etanolamina	Proteína	+		4 mg/L	24
12		Cafeína	Lentivirus/AAV		mezclado	4 mM	18
13		Triptona N1	AAV	+		0.50 %	18
14	Anticoagulantes	Antiaagrupamiento A	Múltiple		-	0.1 - 1.0 %	-24
15	Desconocido	Potenciador CTS LV-	Lentivirus/AAV	+		2% v/v	2

Se identifican cuatro aditivos de cultivo celular como potenciadores de la producción de rAAV (Figura 1A). El alcohol etílico, el DMSO, el ácido valproico y la triptona N1 se analizan adicionalmente en diversas concentraciones para determinar una cantidad óptima aproximada de cada aditivo (Figura 1B). Dado que la triptona N1 es una mezcla de compuestos, no está bien definida en un grado que sería necesario para la producción de grado farmacéutico, y por lo tanto se excluyó de la consideración adicional.

A continuación, se evalúa la capacidad de los aditivos seleccionados de sinergizarse entre sí. Una combinación de DMSO en dosis baja y ácido valproico en dosis baja pareció proporcionar la mejor potenciación de la producción de rAAV (Figura 2).

Ejemplo 2. Refinamiento de las condiciones para los aditivos de cultivo celular.

Aunque se identifican aditivos de cultivo celular y se identifica una concentración aproximada de cada uno, todavía existen muchas variables. Una de estas variables es el momento de agregar cada aditivo.

Las transfecciones se realizan como en el Ejemplo 1, pero los aditivos se proporcionan al cultivo celular ya sea 1 hora antes de la transfección o una, dos, cuatro u ocho horas después de la transfección. Una combinación de DMSO y ácido valproico agregada una o dos horas después de la transfección proporciona la mejor potenciación de la producción de rAAV (Figura 3A).

La densidad de las células que se van a transfectar también se evalúa en células HEK 293 adherentes para determinar si fueron tan eficaces. Estas células dependen del anclaje y requieren el uso de suero para crecer. Las células se siembran 96 horas antes de la transfección a dos densidades diferentes (Proceso B y Proceso C) y transfectan con construcciones de rAAV que contienen genes ANO5 WT o mdistrofina en el casete de expresión. Después de la transfección con estos dos transgenes, las células se tratan con ddH₂O o 1.6 mM de VPA/1.6 % de DMSO dos horas después de la transfección.

A las 96 horas, las células se lisan químicamente y se aclaran antes del análisis para determinar el valor de VG mediante qPCR. Tanto para ANO5 WT como para la microdistrofina, los dos aditivos dan como resultado un aumento de cinco veces en el valor de VG/cm² (Figura 3B). Además, las células de siembra a una densidad más baja (Proceso C) mejoran la producción de AAV, ya que el control del Proceso B estaba por debajo del límite de detección del ensayo.

Para perfeccionar los resultados de los estudios piloto, se lleva a cabo un estudio de diseño de experimentos (DoE) factorial completa. La metodología del DoE se ha usado para optimizar la producción de una amplia gama de productos biológicos, incluido el AAV. El beneficio del DoE es que es un enfoque sistemático investigar varias variables en un producto o proceso a la vez y predecir las condiciones óptimas para una producción máxima. Cuanto mayor sea la cantidad de ejecuciones para un diseño determinado, mayor será la potencia estadística, lo que aumentará la capacidad de distinguir la señal del ruido. El sistema de microbiorreactor Ambr 15 de 48 vías (Sartorius) es adecuado para realizar estudios de DoE y, por lo tanto, las limitaciones de este estudio están diseñadas en torno a él.

Se usa un diseño factorial completo de 3 x 3 x 3 con un mínimo de 27 ejecuciones totales; sin embargo, para aumentar la potencia estadística, se agregan dos repeticiones en los cuatro bordes y en el centro del cubo para un total de 45 ejecuciones. Los tres niveles de cada variable de entrada son los siguientes: etanol: 0 mM, 50 mM, 100 mM; ácido valproico: 0 mM, 1.25 mM, 2.50 mM; y DMSO: 0 %, 1 %, 2 %. Las muestras se obtienen 96 horas después de la transfección y se envían para la qPCR. Se genera un modelo de regresión polinomial en JMP en función de los valores de D4 mediante el uso de términos de superficie de la mezcla lineal, de interacción y de respuesta. En general, el ajuste de los datos en el modelo reducido es bueno con un valor de r^2 de 0.75, lo que indica que el modelo explica el 75 % de la variación en los datos. Press r^2 también demuestra que el 50 % de la variabilidad en el modelo podría explicarse eliminando un punto de datos. Se usa un algoritmo de conveniencia en el perfilador de predicción para optimizar la respuesta, que es el valor D4. Los ajustes óptimos para el valor máximo previsto son alcohol etílico a 0 mM, ácido valproico a $1.59 \text{ mM} \pm 0.3 \text{ mM}$ y DMSO a $1.57 \% \pm 0.4 \%$ (Figura 4A). El valor previsto es $4.40\text{E}+11$ vg/ml con un intervalo de confianza del 95 % de $3.8\text{E}+11$ a $5.0\text{E}+11$ vg/ml. La relación prevista de las concentraciones variables de DMSO y ácido valproico se presenta gráficamente en la Figura 4B.

Ejemplo 3. Traducción a otras células, cápsides y construcciones de AAV.

A continuación, los aditivos se evalúan para trabajar en varias otras estirpes celulares, serotipos de AAV y genes de interés. Tanto las células CTS VPC como Expi293 son estirpes celulares

comerciales de Thermo Fisher Scientific. Las células CTS VPC y Expi293 derivan de la misma estirpe celular HEK 293F en suspensión parental y son subclones estrechamente relacionados. Las células Expi293 se evalúan contra CTS VPC en matraces de agitación de 125 ml con 100 mM de etanol, 2 mM de VPA, 2 % de DMSO y 1.6 mM de VPA/1.6 % de DMSO. Las células Expi293 se

5 realizaron de manera similar a las CTS VPC en todas las condiciones (Figura 5A). Como agentes únicos, tanto el VPA como el DMSO muestran valores significativamente más altos después de 96 horas en comparación con el control, y juntos tienen un efecto sinérgico en el aumento de la producción de AAV. Si bien no es estadísticamente significativo, el etanol también tiene un efecto modesto en el aumento del valor de VG en células Expi293.

10 Para descartar cualquier efecto específico de la cápside de los aditivos de cultivo celular, las CTS VPC se transfectan con un plásmido que tiene un casete de transferencia que contiene el transgén ANO5 WT y plásmidos que contienen AAV1 o AAV9. En general, la producción de AAV1.ANO5 WT es menor que la del rAAVh74.ANO5 WT. Sin embargo, la presencia de 1.6 mM de VPA/1.6 % de DMSO aumentó la producción de AAV aproximadamente dos veces (Figura 5B). Estos dos

15 aditivos tienen un efecto más drástico sobre el AAV9.ANO5 WT, lo que aumenta el valor de VG aproximadamente ocho veces. En el caso de AAV1 y AAV9 en este experimento, el ácido valproico no tuvo un impacto significativo en el rendimiento general. De hecho, el 1.6 % de DMSO es tan eficaz como el 1.6 mM de VPA/1.6 % de DMSO.

Además, el efecto de los aditivos de cultivo celular se evalúa en la producción de AAV en CTS VPC

20 utilizando diferentes transgenes que contienen ITR. El tamaño y la estructura de diferentes transgenes pueden tener un impacto significativo en la producción de AAV. Se eligen algunos transgenes diferentes para las pruebas, parte de un enfoque de vector doble (*DYSF 5'*), un vector autocomplementario (*NT3*) o uno específico para la edición de genes (*saCas9*). En todos los casos, 1.6 mM de VPA/1.6 % mejoró el rendimiento del vector en un rango de 2 a 4 veces (Figura 5C). Al

25 igual que los hallazgos con diferentes serotipos, parece que el VPA de 1.6 mM solo no es tan eficaz para mejorar la producción de AAV con estos transgenes. Aunque a diferencia de la prueba de la cápside, la combinación de VPA/DMSO mediante el uso de *NT3* y *saCas9* tuvo un efecto sinérgico, ya que el valor logrado mediante el uso de ambos es mucho mayor que el DMSO solo.

En resumen, tres aditivos de cultivo celular que mejoran la producción de AAV se caracterizan en

30 un sistema de transfección triple HEK 293. Estos aditivos son eficaces en varias estirpes celulares diferentes, serotipos de AAV y genes de interés. No está claro si el VPA y el DMSO aumentan la cantidad total de cápsides producidas o simplemente contribuyen a un mayor porcentaje de vectores

totalmente encapsidados. Se necesitarán más estudios para determinar la potencia, la infectividad y la estabilidad de los vectores de AAV producidos en presencia de aditivos de cultivo celular. Independientemente de esto, se logra un promedio de un aumento de cinco veces del valor de VG durante la producción utilizando dosis bajas de VPA y DMSO. Estos datos mejorarán los procesos
5 aguas arriba para ser más eficientes, produciendo cantidades mayores de medicamento utilizando menos material inicial. Esto, a su vez, reducirá el costo de la producción de AAV y mejorará el acceso de los pacientes a las genoterapias.

10

15

20

25

30