

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 774**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2016** **PCT/US2016/039075**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016** **WO16210170**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2016** **E 16815331 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024** **EP 3313991**

54 Título: **Factor IX modificado, y composiciones, métodos y utilizaciones para la transferencia génica a células, órganos y tejidos**

30 Prioridad:

23.06.2015 US 201562183599 P
30.03.2016 US 201662315453 P
18.05.2016 US 201662338315 P
10.06.2016 US 201662348781 P
13.06.2016 US 201662349572 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

73 Titular/es:

THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(100.0%)
3401 Civic Center Boulevard
Philadelphia, PA 19104, US

72 Inventor/es:

HIGH, KATHERINE A. y
ANGUELA, XAVIER

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 989 774 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Factor IX modificado, y composiciones, métodos y utilizaciones para la transferencia génica a células, órganos y tejidos

Introducción

Los trastornos genéticos, causados por la ausencia o un defecto en un gen deseable (pérdida de función) o la expresión de un gen no deseable o defectuoso (ganancia de función) conducen a una variedad de enfermedades. Un ejemplo de un trastorno por pérdida de función genética es la hemofilia, un trastorno hemorrágico hereditario que está causado por una deficiencia en el factor de coagulación VIII (FVIII, hemofilia A) o en el factor IX (FIX, hemofilia B). Un ejemplo de un trastorno de ganancia de función genética es la enfermedad de Huntington, una enfermedad causada por un gen "HTT" patológico (codifica la proteína huntingtina) que codifica una proteína mutada que se acumula dentro de las neuronas y conduce a la destrucción gradual de las mismas, particularmente en los ganglios basales y en el córtex cerebral.

El tratamiento actual para la hemofilia consiste en la administración intravenosa del factor de coagulación recombinante a demanda, en el caso de que ocurra un sangrado, o profilácticamente. Sin embargo, este enfoque terapéutico adolece de varias desventajas, tales como la necesidad de infusiones repetidas, el coste del tratamiento, el riesgo de desarrollar respuestas inmunitarias de factor antiterapéuticas, y el riesgo de sangrados potencialmente mortales. Estas limitaciones han llevado al desarrollo de terapias de tipo génico para la hemofilia. Con este fin, la hemofilia es ideal para la terapia basada en la transferencia génica, ya que 1) la ventana terapéutica es muy amplia, ya que los niveles de tan solo 1 % sobre lo normal ya puede resultar en un cambio en el fenotipo de grave a moderado, y los niveles de 100 % no están asociados a ningún efecto secundario, 2) la expresión específica de tejido del transgén terapéutico no resulta estrictamente necesaria, y 3) existe una experiencia considerable en la medición de los criterios de valoración de la eficacia terapéutica.

Actualmente, los vectores de virus adenoasociados (AAV) son reconocidos como los vectores de transferencia génica de elección, ya que presentan el mejor perfil de seguridad y eficacia para la administración de genes *in vivo*. De los serotipos de AAV aislados hasta el momento, se han utilizado AAV2 y AAV8 con diana en el hígado en seres humanos afectados por hemofilia B grave.

Sumario

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. De esta manera, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un genoma y una cápside, en el que el genoma de dicho vector de rAAV comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos no natural que codifica la proteína factor IX humano, en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica la misma proteína factor IX humano que está codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 10 y es por lo menos 85 % idéntica a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 10, y en el que la cápside de dicho vector de rAAV comprende la proteína VP1 que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 4.

En una forma de realización preferida, dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano es por lo menos 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 10.

En una forma de realización preferida adicional, dicha secuencia de nucleótidos no natural que codifica la proteína factor IX humano presenta un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con la secuencia de tipo salvaje que codifica el factor IX humano.

En una realización preferida adicional, dicho ácido nucleico comprende, además, por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en: repetición terminal invertida (ITR) de virus adenoasociado (AAV), un elemento de control de la expresión ligado operablemente a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano, un relleno ("stuffer") polinucleotídico y un terminador de transcripción.

En una forma de realización preferida adicional, dicho elemento de control de la expresión confiere la expresión en el hígado y comprende un promotor y, opcionalmente, un potenciador.

En una forma de realización preferida adicional, dicho ácido nucleico comprende una ITR del serotipo AAV2, un promotor y un potenciador que confiere la expresión en el hígado ligado funcionalmente a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano, una secuencia de poliadenilación, un terminador de transcripción, y opcionalmente una segunda ITR del AAV2, en el que la ITR de AAV2 está situada en 5' del promotor y del potenciador, o en 3' del terminador de transcripción.

En una forma de realización preferida adicional, dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano está interrumpida por un intrón.

En una forma de realización preferida adicional, dicho ácido nucleico comprende, además, un relleno polinucleotídico. En una forma de realización preferida adicional, dicho promotor es un promotor alfa1-antitripsina (AAT) humano y dicho potenciador es un potenciador HCR-1 o HCR-2 de apolipoproteína E (ApoE).

5 En una forma de realización preferida adicional, dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 15.

En una forma de realización preferida adicional, dicho potenciador comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 14.

10 En una forma de realización preferida adicional, dicha ITR del AAV2 comprende cualquiera de las secuencias de ITR del AAV2 observadas en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 26.

15 En una forma de realización preferida adicional, dicho intrón comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 17.

En una forma de realización preferida adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano y el intrón comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 25.

20 En una forma de realización preferida adicional, el vector de rAAV de la invención comprende, en orden, un potenciador HCR-1 de ApoE, un promotor de AAT, la secuencia de nucleótidos no natural que codifica la proteína factor IX humano, una secuencia de poliadenilación, un ITR del AAV2 en 5' del potenciador o en 3' de la secuencia de poliadenilación, y opcionalmente una segunda ITR del AAV2 en la posición contraria.

25 En una forma de realización preferida adicional, la secuencia de nucleótidos de dicho potenciador HCR-1 de ApoE comprende los nucleótidos 152 a 472 de SEC ID nº: 12, la secuencia de nucleótidos de dicho promotor de AAT comprende los nucleótidos 482 a 878 de SEC ID nº: 12, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano comprende los nucleótidos 908 a 995 y 2434 a 3731 de SEC ID nº: 12, la secuencia de nucleótidos de dicha secuencia de poliadenilación comprende los nucleótidos 3820 a 4047 de SEC ID nº: 12, y la secuencia de nucleótidos de dicho ITR de AAV2 comprende cualquiera de las secuencias de ITR del AAV2 tal como se encuentra en la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 26.

30 En una forma de realización preferida adicional, el vector de AAVR de la invención comprende los nucleótidos 142 a 4096 de SEC ID nº: 12.

35 En determinadas formas de realización todavía más preferidas, dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano está interrumpida por un intrón.

40 En una forma de realización preferida adicional, dicho intrón comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 17.

En una forma de realización preferida adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano y el intrón comprenden la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 25.

45 En una forma de realización preferida adicional, el genoma de dicho vector de rAAV es de cadena sencilla.

En una forma de realización preferida adicional, dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano es por lo menos 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 10.

50 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el vector de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la utilización en el tratamiento de la hemofilia B.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de VP1 Rh74.

La figura 2 representa la secuencia de aminoácidos de VP2 Rh74.

La figura 3 representa la secuencia de aminoácidos de VP3 Rh74.

60 La figura 4 representa la secuencia de aminoácidos de la proteína VP1 variante de cápside 4-1.

La figura 5 representa la secuencia de aminoácidos de la variante de cápside 15-1.

65 La figura 6 representa la secuencia de aminoácidos de la variante de cápside 15-2.

La figura 7 representa la secuencia de aminoácidos de la variante de cápside 15-3/15-5.

La figura 8 representa la secuencia de aminoácidos de la variante de cápside 15-4.

5 La figura 9 representa la secuencia de aminoácidos de la variante de cápside 15-6.

La figura 10 representa la secuencia de ácido nucleico de FIX39.

La figura 11 representa la secuencia de ácido nucleico de FIX19.

10 La figura 12A representa la secuencia del plásmido FIX39.

La figura 12B representa la secuencia del plásmido phFIX39v2.

15 La figura 13 representa el mapa del plásmido FIX39.

La figura 14 representa la secuencia de ácido nucleico del intrón A.

20 La figura 15 representa la secuencia de ácido nucleico de FIX39 + intrón A.

La figura 16 representa la eficiencia de transducción de la variante de cápside AAV-4-1 (SEC ID nº: 4) analizada en un contexto *in vitro*.

25 La figura 17 representa los niveles de hFIX en el plasma de ratones de tipo salvaje tras la inyección intravenosa en la semana 8 de vida de 1×10^{11} o 1×10^{12} gv/kg de AAV-FIX39-Padua (cuadrados/círculos) y de AAV-FIX19-Padua (rombos/hexágonos). Los niveles plasmáticos de FIX humano se sometieron a ensayo mediante ELISA y presentan múltiples mediciones, obtenidas mediante sangrado en serie, en el mismo grupo de animales durante el curso del estudio (n=5 ratones en cada cohorte). Las barras de error denotan el error estándar de la media.

30 La figura 18 representa los niveles circulantes de FIX humano en plasma de ratón 24 horas después de la inyección hidrodinámica en la vena de la cola de 5 µg de plásmido pFIX19-Padua o pFIX39-Padua. P=0,3337.

35 La figura 19 representa un resumen de los datos de cuatro pacientes humanos de hemofilia B a los que se había administrado una sola infusión de un vector portador de la variante de AAV-FIX Padua (FIX39) según la invención, y la actividad (%) de FIX durante los periodos de evaluación siguientes (183, 102, 69 y 50 días, respectivamente).

40 La figura 20A representa los datos de actividad (%) de FIX del primer paciente humano de hemofilia B al que se había administrado la infusión única de vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el periodo de evaluación de 183 días.

45 La figura 20B representa los datos del ensayo de función hepática (enzimas ALT, AST y LDH) del primer paciente humano de hemofilia B al que se había administrado la infusión única de vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el periodo de evaluación de 183 días. Los valores de LDH representados gráficamente (LDH¹) se han dividido por 10 con el fin de mostrarlos junto a los valores de ALT y AST.

50 La figura 21A representa los datos de actividad de FIX (%) del segundo paciente humano de hemofilia B al que se había administrado una sola infusión del vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el periodo de evaluación de 102 días.

55 La figura 21B representa los datos del ensayo de función hepática (enzimas ALT, AST y LDH) del segundo paciente humano de hemofilia B al que se había administrado la infusión única de vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el periodo de evaluación de 102 días. Los valores de LDH representados gráficamente (LDH¹) se han dividido por 10 con el fin de mostrarlos junto a los valores de ALT y AST.

60 La figura 22A representa los datos de actividad (%) de FIX del tercer paciente humano de hemofilia B al que se había administrado la infusión única de vector portador de variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el periodo de evaluación de 69 días.

65 La figura 22B representa los datos del ensayo de función hepática (enzimas ALT, AST y LDH) del tercer paciente humano de hemofilia B al que se había administrado la infusión única de vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el periodo de evaluación de 69 días. Los valores de LDH representados gráficamente (LDH¹) se han dividido por 10 con el fin de mostrarlos junto a los valores de ALT y AST.

La figura 23A representa los datos de actividad de FIX (%) del cuarto paciente humano de hemofilia B al que se había administrado la infusión única de vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el periodo de evaluación de 50 días.

La figura 23B representa los datos de ensayo de la función hepática (enzimas ALT, AST y LDH) del cuarto paciente humano de hemofilia B al que se había administrado la infusión única de vector portador de la variante AAV-FIX Padua (FIX39), durante el periodo de evaluación de 50 días. Los valores de LDH representados gráficamente (LDH¹) se han dividido por 10 con el fin de mostrarlos juntos a los valores de ALT y AST.

La figura 24A representa el perfil de baja inmunogenicidad de AAV-FIX39-Padua en sujetos humanos.

La figura 24B representa un perfil de inmunogenicidad comparativo de AAV-FIX39-Padua y AAV8-FIX19 en sujetos humanos.

Descripción detallada

La invención se basa, por lo menos en parte, en el desarrollo de secuencias de ácido nucleico modificadas codificantes de proteínas, tales como la proteína FIX humana. En diversas formas de realización, un ácido nucleico modificado presenta un número reducido de dinucleótidos CpG (citosina-guanina) en comparación con una secuencia de ácido nucleico de referencia que codifica factor IX, tal como una secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica factor IX humano. Dichos ácidos nucleicos modificados que presentan un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con un ácido nucleico que codifica el factor IX de referencia (por ejemplo, una secuencia natural que codifica factor IX humano) pueden incluirse dentro de vectores de expresión (por ejemplo, genomas de vector) o plásmidos.

La invención incluye, además, composiciones, tales como composiciones que incluyen una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica FIX humano, en la que se entiende que solo dichas composiciones tal como se definen según el segundo aspecto de la invención están cubiertas por la invención reivindicada. En dichas composiciones, un ácido nucleico modificado puede presentar un número reducido de dinucleótidos CpG respecto a una secuencia de referencia, tal como una secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica el factor IX humano. Entre las composiciones se incluyen, además, vectores de expresión (por ejemplo, vectores víricos/genomas de vector) y plásmidos que incluyen dichas secuencias de ácido nucleico modificadas que codifican la proteína FIX humana que presentan un número reducido de dinucleótidos CpG.

Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana puede presentar 1 a 5 menos dinucleótidos CpG que la secuencia natural que codifica el factor IX humano, o puede presentar 5 a 10 menos dinucleótidos CpG que la secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica el factor IX humano, o puede presentar 10 a 15 dinucleótidos CpG menos que la secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica el factor IX humano, o puede presentar 15 a 20 dinucleótidos CpG menos que la secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica el factor IX humano, o puede presentar 20 a 25 dinucleótidos CpG menos que la secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica el factor IX humano, o puede presentar 25 a 30 dinucleótidos CpG menos que la secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica el factor IX humano, o puede presentar 30 a 40 dinucleótidos CpG menos que la secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica el factor IX humano, o puede presentar 40 a 55 dinucleótidos CpG menos que la secuencia natural (de tipo salvaje) que codifica el factor IX humano, o puede carecer por completo de ningún dinucleótido CpG.

Los ácidos nucleicos modificados que codifican el factor IX, tales como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, pueden incluir, además, uno o más elementos en cis adicionales. Entre los elementos en cis representativos se incluyen, aunque sin limitación, elementos de control de la expresión, intrones, ITR, codones de parada, secuencias de poliA, y/o secuencias polinucleotídicas de llenado. Dichos elementos de acción en cis asimismo pueden ser modificados. Por ejemplo, los elementos de acción en cis, tales como los elementos de control de la expresión, intrones, ITR, secuencias poliA y/o secuencias polinucleotídicas de llenado pueden presentar un número reducido de dinucleótidos CpG. Uno o más elementos de acción en cis, tales como elementos de control de la expresión, intrones, ITR, secuencias poliA y/o secuencias polinucleotídicas de llenado, pueden carecer de dinucleótidos CpG. Uno o más elementos de acción en cis, tales como elementos de control de la expresión, intrones, ITR, secuencias de poli-A y/o secuencias polinucleotídicas de llenado pueden presentar 1 a 5 dinucleótidos CpG menos que un elemento de acción en cis de referencia, o pueden presentar 5 a 10 dinucleótidos CpG menos que un elemento de acción en cis de referencia, o pueden presentar 10 a 15 dinucleótidos CpG menos que un elemento de acción en cis de referencia, o pueden presentar 15 a 20 dinucleótidos CpG menos que un elemento de acción en cis de referencia, o pueden presentar 20 a 25 dinucleótidos CpG menos que un elemento de acción en cis de referencia, o pueden presentar 25 a 30 dinucleótidos CpG menos que un elemento de acción en cis de referencia, o pueden presentar 30 a 40 dinucleótidos CpG menos que un elemento de acción en cis de referencia, o pueden presentar 40 a 55 dinucleótidos CpG menos que un elemento de acción en cis de referencia, o pueden carecer de ningún dinucleótido CpG.

En la presente memoria se describen en términos generales, además, vectores víricos que incluyen una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la proteína FIX humana, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, en los que solo dichos vectores víricos están comprendidos en la invención reivindicada según se define en las reivindicaciones adjuntas. En general, un vector puede incluir un vector lentivírico o parvovírico, tal como un vector adenovírico. Una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la proteína FIX humana, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, puede estar comprendida en un vector de virus adenoasociado (AAV).

Entre los vectores de virus adenoasociado (AAV) pueden incluirse cápsides derivadas de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, así como variantes (por ejemplo, variantes de cápside, tales como inserciones, adiciones y sustituciones de aminoácidos) de los mismos. Tal como apreciará el experto ordinario en la materia, las cápsides de AAV pueden incluir una proteína VP1 y dos proteínas más cortas, denominadas VP2 y VP3, que esencialmente son truncados aminoterminales de VP1. Dependiendo de la cápside y otros factores conocidos por el experto ordinario, las tres proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3 se encuentran habitualmente presentes en una cápside en una proporción aproximada de 1:1:10, respectivamente, aunque esta proporción, particularmente de VP3, puede variar significativamente.

Entre las variantes de AAV se incluyen variantes AAV-Rh74, por ejemplo variantes de cápside de AAV de la secuencia de cápside VP1 Rh74 (SEC ID n°: 1, figura 1), incluyendo, aunque sin limitación, las variantes 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 y 15-6 indicadas en la tabla 1. Las secuencias de aminoácidos de VP2 Rh74 y VP3 Rh74 se proporcionan en SEC ID n°: 2 (figura 2) y en SEC ID n°: 3 (figura 3), respectivamente.

Tabla 1. Variantes de cápside de AAV

Variante	Sustituciones de aminoácidos y posiciones indicadas en la cápside de la VP1 Rh74	Identificador de secuencia	Figura
4-1	G195A-L199V-S201P-G202N	SEC ID n°: 4	Figura 4
15-1	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/169/547)R	SEC ID n°: 5	Figura 5
15-2	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R	SEC ID n°: 6	Figura 6
15-3/15-5	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R (variante 15-3) G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R (variante 15-5)	SEC ID n°: 7	Figura 7
15-4	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R	SEC ID n°: 8	Figura 8
15-6	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R	SEC ID n°: 9	Figura 9

La variante 4-1 (SEC ID n°: 4) presenta una sustitución de una alanina, una valina, una prolina y una asparagina en las posiciones de aminoácido 195, 199, 201 y 202, respectivamente, de la VP1 de cápside. La secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 4-1, con los residuos sustituidos a, v, p y n, subrayados y en negrita se muestra en la figura 4 (SEC ID n°: 4). Para la variante 4-1, la secuencia de VP2 consiste en la SEC ID n°: 27, y la secuencia de VP3 consiste en la SEC ID n°: 3, respectivamente.

Las variantes 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 15-5 y 15-6 asimismo presentan una sustitución de alanina, una valina, una prolina y una asparagina en las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 y 202, respectivamente, de la VP1 de cápside. Además, dichas variantes presentan múltiples sustituciones de arginina por lisina en diversas posiciones. La secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-1 (SEC ID n°: 5) se muestra en la figura 5; la secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-2 (SEC ID n°: 6) se muestra en la figura 6; la secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-3/15-5 (SEC ID n°: 7) se muestra en la figura 7; la secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-4 (SEC ID n°: 8) se muestra en la figura 8; la secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-6 (SEC ID n°: 9) se muestra en la figura 9. Entre los ejemplos de cápsides se incluyen, aunque sin limitación, los indicados en la publicación de patente US n° 2015/0023924.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se proporcionan vectores lentivíricos y parvovíricos, tales como vectores AAV y vectores víricos variantes, tales como AAV variantes (por ejemplo, variantes de cápside, tales como 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 y 15-6) que incluyen (encapsidan o empaquetan) genoma de vector que incluye secuencia de ácido nucleico modificada que codifica la proteína FIX humana, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG.

En estudios ejemplificativos, la transferencia/entrega génica mediada por AAV-rh74 produjo niveles de expresión de proteína que eran significativamente superior a los de varios otros serotipos. En particular, el vector de AAV-Rh74 y las variantes de cápside (por ejemplo, 4-1) presentan como diana genes para el suministro en el hígado con eficiencia por lo menos comparable al estándar de oro para la transducción hepática, AAV8, en perros y/o ratones y/o macacos con hemofilia B.

Como se expone en la presente memoria, algunos vectores víricos, tales como los vectores lentivíricos y parvovíricos, incluyendo serotipos y variantes de AAV, proporcionan un medio para el suministro de secuencias polinucleotídicas en células *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, que pueden codificar proteínas de manera que las células expresan las proteínas codificadas. Por ejemplo, un vector de AAV recombinante puede incluir un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína o péptido deseado (por ejemplo, el factor IX). Por lo tanto, el suministro o la administración de vector en un sujeto (por ejemplo, un mamífero) proporciona proteínas y péptidos codificados al sujeto. De esta manera, pueden utilizarse vectores víricos, tales como vectores lentivíricos y parvovíricos, incluyendo serotipos y variantes de AAV, tales como variantes de cápside (por ejemplo, 4-1) para transferir/suministrar polinucleótidos heterólogos para la expresión, y opcionalmente para el tratamiento de una variedad de enfermedades.

Un vector recombinante (por ejemplo, AAV) puede ser un vector parvovírico. Los parvovirus son virus pequeños con un genoma de ADN de cadena sencilla. Los "virus adenoasociados" (AAV) pertenecen a la familia de los parvovirus.

Los parvovirus, incluyendo AAV, son virus útiles como vectores de terapia génica, ya que pueden penetrar en las células e introducir ácido nucleico/material genético de manera que el ácido nucleico/material genético pueda mantenerse establemente en las células. Además, dichos virus pueden introducir ácido nucleico/material genético en sitios específicos, por ejemplo, tal como un sitio específico en el cromosoma 19. Debido a que los AAV no están asociados a enfermedades patológicas en el ser humano, los vectores AAV son capaces de suministrar secuencias polinucleotídicas heterólogas (por ejemplo, proteínas y agentes terapéuticos) en pacientes humanos sin provocar una patogénesis o enfermedad de AAV sustancial.

Los serotipos (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2 y/o VP3) de AAV y variantes de AAV (por ejemplo, variantes de cápside, tales como 4-1) pueden ser o no diferentes de otros serotipos de AAV, incluyendo, por ejemplo, AAV1-AAV11, Rh74 o Rh10 (por ejemplo, diferente de secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 de cualquiera de los serotipos AAV1-AAV11, Rh74 o Rh10).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "serotipo" es una distinción utilizada para referirse a un AAV que presenta una cápside que es séricamente diferente de otros serotipos de AAV. La diferencia sérica se determina basándose en la falta de reactividad cruzada entre anticuerpos contra un AAV en comparación con otro AAV. Dichas diferencias de reactividad cruzada habitualmente se deben a diferencias en secuencias proteicas/determinantes antigénicos de cápside (por ejemplo, debido a diferencias en la secuencia de VP1, VP2 y/o VP3 entre serotipos de AAV). A pesar de la posibilidad de que las variantes de AAV, incluyendo las variantes de cápside, no sean séricamente diferentes de un AAV de referencia u otro serotipo de AAV, difieren por lo menos en un nucleótido o residuo aminoácido en comparación con el serotipo de referencia u otro serotipo de AAV.

Bajo la definición tradicional, un serotipo significa que el virus de interés ha sido sometido a ensayo frente a suero específico para todos los serotipos existentes y caracterizados para actividad neutralizadora y no se ha encontrado ningún anticuerpo que neutralice el virus de interés. A medida que se identifican más aislados víricos naturales y/o se generan mutantes de cápside, podrían identificarse o no diferencias séricas respecto a cualquiera de los serotipos existentes actualmente. De esta manera, en casos en que el nuevo virus (por ejemplo, AAV) no presenta diferencia sérica, este nuevo virus (por ejemplo, AAV) sería un subgrupo o variante del serotipo correspondiente. En muchos casos, los ensayos séricos para actividad neutralizadora no se han realizado todavía en virus mutantes con modificaciones de la secuencia de cápside para determinar si son de otro serotipo según la definición tradicional de serotipo. De acuerdo con lo anterior, por conveniencia y para evitar repeticiones, el término "serotipo" se refiere en términos amplios tanto a virus séricamente diferentes (por ejemplo, AAV), como a virus (por ejemplo, AAV) que no son séricamente diferentes que pueden encontrarse dentro de un subgrupo o una variante de un serotipo dado.

Entre los plásmidos de vector recombinante (por ejemplo, AAV), genomas de vector (por ejemplo, AAV), así como métodos y utilidades de los mismos, se incluyen cualquier cepa o serotipo vírico. A título de ejemplo no limitativo, un plásmido de vector recombinante (por ejemplo, AAV) o genoma de vector (por ejemplo, AAV) puede estar basado en cualquier genoma de AAV, tal como AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -rh74, -rh10 o AAV-2i8, por ejemplo. Dichos vectores pueden estar basados en la misma cepa o serotipo (o subgrupo o variante), o ser diferentes entre sí. A título de ejemplo no limitativo, un plásmido de vector recombinante (por ejemplo, AAV) o genoma de vector (por ejemplo, AAV) basado en el genoma de un serotipo puede ser idéntico a una o más de las proteínas de cápside que empaquetan el vector. Además, un plásmido vector recombinante (por ejemplo, AAV) o genoma de vector (por ejemplo, AAV) puede estar basado en un genoma de serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2)

diferente de la proteína o proteínas de cápside que empaquetan el vector, en cuyo caso por lo menos una de las tres proteínas de cápside podría ser un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 o variante, tal como una variante AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside, tales como 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 y 15-6), por ejemplo.

Por lo tanto, entre los vectores AAV se incluyen secuencias génicas/proteicas idénticas a las secuencias génicas/proteicas características para un serotipo particular. Tal como se utiliza en la presente memoria, un “vector de AAV relacionado con AAV1” se refiere a una o más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2 y/o VP3) que presenta una identidad de secuencia sustancial respecto a una o más secuencias polinucleótídicas o polipeptídicas que comprende AAV1. Análogamente, un “vector de AAV relacionado con AAV8” se refiere a una o más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2 y/o VP3) que presenta una identidad de secuencia sustancial respecto a uno o más secuencias polinucleótídicas o polipeptídicas que comprenden AAV8. Un “vector de AAV relacionado con AAV-Rh74” se refiere a una o más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2 y/o VP3) que presenta una identidad de secuencia sustancial respecto a una o más secuencias polinucleótídicas o polipeptídicas que comprende AAV-Rh74 (ver, por ejemplo, VP1, VP2 y VP3 de las figuras 1 a 3). Dichos vectores AAV relacionados con otro serotipo, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, por lo tanto, pueden presentar una o más secuencias diferentes de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, aunque pueden mostrar una identidad de secuencia sustancial respecto a uno o más genes y/o proteínas, y/o presentar una o más características funcionales de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 (por ejemplo, tal como tropismo celular/tisular). Entre las variantes de AAV-Rh74 y variantes de AAV relacionadas ejemplificativas no limitativas, tales como AAV-Rh74 o AAV relacionados, tales como secuencias de variantes de AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside, tales como 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 y 15-6) se incluyen VP1, VP2 y/o VP3 indicadas en la presente memoria, por ejemplo, en las figuras 1 a 9.

Un vector de AAV relacionado con un serotipo de referencia puede presentar un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia del mismo que incluya o consista en una secuencia por lo menos 80 % o más (por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, etc.) idéntica a uno o más de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 (por ejemplo, tal como las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV-Rh74 indicadas en las figuras 1 a 9).

Entre los métodos y las utilidades se incluyen secuencias de AAV (polipéptidos y nucleótidos), secuencias de AAV-Rh74 (polipéptidos y nucleótidos) y subsecuencias de las mismas que muestran una identidad de secuencia inferior a 100 % respecto a un serotipo de AAV de referencia, tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, por ejemplo, una secuencia génica o proteína de AAV-Rh74 (por ejemplo, las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 indicadas en las figuras 1 a 9), aunque son diferentes y no idénticas a los genes o proteínas de AAV conocidos, tales como los genes o proteínas, etc. de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8. Un polipéptido de AAV o subsecuencia del mismo puede incluir o consistir en una secuencia por lo menos 80 % o más idéntica, por ejemplo, 85 %, 85 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, etc., es decir, hasta 100 % idéntica a cualquier secuencia de AAV de referencia o subsecuencia de la misma, tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 (por ejemplo, las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 indicadas en las figuras 1 a 9). Una variante de AAV puede presentar una, dos, tres o cuatro de las cuatro sustituciones de aminoácido (por ejemplo, las variantes de cápside 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 y 15-6).

Pueden construirse vectores recombinantes (por ejemplo, AAV), incluyendo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, y secuencias variantes, relacionadas, híbridas y quiméricas, utilizando técnicas recombinantes que son conocidas por el experto en la materia, para incluir una o más secuencias polinucleótídicas heterólogas (transgenes) flanqueadas por una o más secuencias de ITR de AAV funcionales. Dichos vectores pueden presentar uno o más de los genes de AAV de tipo salvaje eliminados total o parcialmente, por ejemplo, un gen *rep* y/o *cap*, aunque retienen por lo menos una secuencia funcional de ITR flanqueante, en caso necesario para el rescate, replicación y empaquetamiento del vector recombinante en una partícula vírica de AAV. Por lo tanto, un genoma de vector de AAV incluiría secuencias requeridas en cis para la replicación y el empaquetamiento (por ejemplo, secuencias de ITR funcionales).

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a todas las formas de ácido nucleico, oligonucleótidos, incluyendo ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Entre los polinucleótidos se incluyen ADN genómico, ADNc y ADN antisentido, y ARNm procesado o no procesado, ARNr, ARNt y ADN o ARN inhibidor (ARNi, por ejemplo, ARN de horquilla corta o pequeña (ARNhc), ARN interfiriente pequeño o corto (ARN(ip)), ARN transprocesamiento o ARN antisentido). Entre los polinucleótidos se incluyen polinucleótidos naturales, sintéticos y deliberadamente modificados o alterados (por ejemplo, que presentan menos dinucleótidos CpG). Los polinucleótidos pueden ser de cadena sencilla, de doble cadena o de triple cadena, lineales o circulares, y pueden presentar cualquier longitud. En la exposición de los

polinucleótidos, una secuencia o estructura de un polinucleótido particular puede describirse en la presente memoria de acuerdo con la convención de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

Un polinucleótido "heterólogo" se refiere a un polinucleótido insertado en un vector (por ejemplo, AAV) para los fines de la transferencia/entrega mediada por vector del polinucleótido en una célula. Los polinucleótidos heterólogos normalmente son diferentes del ácido nucleico de vector (por ejemplo, AAV), es decir, son no naturales con respecto al ácido nucleico vírico (por ejemplo, de AAV). Una vez transferido/entregado en el interior de la célula, puede expresarse (por ejemplo, transcribirse y traducirse, en su caso) el polinucleótido heterólogo, contenido dentro del vector. Alternativamente, un polinucleótido heterólogo transferido/entregado en una célula, contenido dentro del vector, podría no expresarse necesariamente. Aunque el término "heterólogo" no se utiliza siempre en la presente memoria para referirse a polinucleótidos, la referencia a un polinucleótido incluso en ausencia del modificador "heterólogo" pretende incluir los polinucleótidos heterólogos a pesar de la omisión. Un ejemplo de una secuencia heteróloga sería un ácido nucleico que codifica el factor IX, por ejemplo, un ácido nucleico modificado que codifica el factor IX, tal como un ácido nucleico que presente menos dinucleótidos CpG que una secuencia de ácido nucleico de referencia.

Los "polipéptidos", "proteínas" y "péptidos" codificados por las "secuencias polipeptídicas" incluyen secuencias naturales de longitud completa, al igual que con las proteínas naturales, así como subsecuencias funcionales, formas modificadas o variantes de secuencia, con la condición de que la subsecuencia, forma modificada o variante retenga algún grado de funcionalidad de la proteína de longitud completa natural. Dichos polipéptidos, proteínas y péptidos codificados por las secuencias polinucleótidos pueden ser, aunque ellos no necesariamente, idénticas a la proteína endógena que es defectuosa o cuya expresión es insuficiente o deficiente en el mamífero tratado.

Los vectores lentivíricos y parvovíricos, tales como un vector adenovírico y vectores AAV, incluyendo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, y variantes de AAV relacionadas, tales como variantes de AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside, tales como 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 y 15-6) pueden utilizarse para introducir/suministrar polinucleótidos estable o transitoriamente en el interior de células y progenie de las mismas. El término "transgén" se utiliza en la presente memoria para referirse convenientemente a dicho polinucleótido heterólogo que se pretende introducir, o que ha sido introducido, en una célula u organismo. Entre los transgenes se incluyen cualquier polinucleótido, tal como un gen que codifica un polipéptido o proteína (por ejemplo, el factor IX).

Por ejemplo, en una célula que presenta un transgén, el transgén ha sido introducido/transferido mediante "transducción" o "transfección" de la célula con un vector, tal como AAV. Los términos "transducir" y "transfectar" se refieren a la introducción de una molécula, tal como un polinucleótido, en una célula u organismo hospedador.

Una célula en la que se ha introducido el transgén se denomina "célula transducida". De acuerdo con ello, una célula "transducida" (por ejemplo, en un mamífero, tal como una célula, tejido o célula de un órgano), se refiere a un cambio genético en una célula tras la incorporación de una molécula exógena, por ejemplo, un polinucleótido o proteína (por ejemplo, un transgén) en la célula. De esta manera, una célula "transducida" es una célula, o progenie de la misma, en la que se ha introducido una molécula exógena, por ejemplo. Las células o células pueden propagarse y la proteína introducida puede expresarse o transcribirse el ácido nucleico. Para los usos y métodos de terapia génica, la célula transducida puede encontrarse en un sujeto.

El polinucleótido introducido puede estar o no integrado en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor. En el caso de que un polinucleótido introducido resulte integrado en el ácido nucleico (ADN genómico) de la célula u organismo receptor, puede mantenerse establemente en esa célula u organismo y adicionalmente pasarse o heredarse en células u organismos de la progenie de la célula u organismo receptor. Finalmente, el ácido nucleico introducido puede existir en la célula u organismo hospedador receptor de manera solo transitoria.

Entre las células que pueden transducirse se incluye una célula de cualquier tipo de tejido u órgano, de cualquier origen (por ejemplo, mesodermo, ectodermo o endodermo). Entre los ejemplos no limitativos de células se incluyen hígado (por ejemplo, hepatocitos, células endoteliales sinusoidales), páncreas (por ejemplo, células de los islotes beta), pulmón, sistema nervioso central o periférico, tal como el cerebro (por ejemplo, células neurales, gliales o ependimales) o médula espinal, riñón, ojo (por ejemplo, componentes celulares retinianos), bazo, piel, timo, testículos, pulmón, diafragma, corazón (cardíaco), músculo o psoas, o intestino (por ejemplo, endocrinas), tejido adiposo (blanco, marrón o beige), músculo (por ejemplo, fibroblastos), sinoviocitos, condrocitos, osteoclastos, células epiteliales, células endoteliales, células de las glándulas salivales, células nerviosas del oído interno o células hematopoyéticas (por ejemplo, sanguíneas o linfáticas). Entre los ejemplos adicionales se incluyen células madre, tales como células progenitoras pluripotentes o multipotentes que se desarrollan o se diferencian en el hígado (por ejemplo, hepatocitos, células endoteliales sinusoidales), páncreas (por ejemplo, células de los islotes beta), pulmón, sistema nervioso central o periférico, tal como el cerebro (por ejemplo, células neuronales, gliales o ependimales) o médula espinal, riñón, ojo (componentes celulares retinianos), bazo, piel, timo, testículos, pulmón, diafragma, corazón (cardíacas), músculo o psoas, o intestinales (por ejemplo, endocrinas), tejido adiposo (blanco, marrón o beige), músculo (por ejemplo, fibroblastos), sinoviocitos, condrocitos, osteoclastos, células epiteliales,

células endoteliales, células de las glándulas salivales, células nerviosas del oído interno o células hematopoyéticas (por ejemplo, sanguíneas o linfáticas).

Una "molécula terapéutica" puede ser un péptido o proteína que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto de una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un péptido o proteína "terapéutico" codificado por un transgén puede ser uno que confiera un beneficio al sujeto, por ejemplo, la corrección de un defecto genético o la corrección de una deficiencia génica (de expresión o funcional).

Entre los ejemplos no limitativos de polinucleótidos heterólogos que codifican productos génicos (por ejemplo, proteínas terapéuticas) se incluyen aquellos que pueden utilizarse en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, incluyendo, aunque sin limitación, trastornos de la coagulación sanguínea, tales como la hemofilia A, la hemofilia B, la talasemia y la anemia.

Se describen ejemplos no limitativos de secuencias de factor IX no humano de mamífero en Yoshitake et al., 1985, supra; Kurachi et al., 1995, supra; Jallat et al., 1990, supra; Kurachi et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6461-6464; Jaye et al., 1983, Nucl. Acids Res. 11:2325-2335; Anson et al., 1984, EMBO J. 3: 1053-1060; Wu et al., 1990, Gene 86:275-278; Evans et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:10095 (1989), Blood 74:207-212; Pendurthi et al., 1992, Thromb. Res. 65:177-186; Sakar et al., 1990, Genomics 1990, 6:133-143; y Katayama et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4990-4994.

Entre los polinucleótidos, polipéptidos y subsecuencias de los mismos se incluyen formas modificadas y variantes. Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "modificar" y "variante", y variaciones gramaticales de los mismos, se refieren a que un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia de los mismos se desvía respecto a una secuencia de referencia. Por lo tanto, las secuencias modificadas y variantes pueden presentar la misma actividad o función, o una actividad o función mayor o menor que una secuencia de referencia, aunque por lo menos retienen una actividad o función parcial de la secuencia de referencia. En formas de realización particulares, un ácido nucleico modificado codifica factor IX, y ha sido modificado para reducir el número de dinucleótidos CpG en comparación con el ácido nucleico que codifica el factor IX de referencia (por ejemplo, una secuencia de factor IX de tipo salvaje, tal como una secuencia génica de factor IX humano o de otro mamífero).

Entre las variantes asimismo se incluyen variantes de ganancia y pérdida de función. Por ejemplo, secuencias de ADN de factor IX humano de tipo salvaje, en las que las variantes o mutantes proteicos retienen actividad, o son terapéuticamente eficaces, o son comparablemente o incluso más terapéuticamente activos que el factor IX humano invariante. Un ejemplo de una variante de factor IX humano natural, denominada factor IX humano "Padua", presenta una L (leucina) en la posición 338 en lugar de una R (arginina). El FIX Padua posee una mayor actividad catalítica y coagulante que el factor IX humano que carece de la mutación Padua. La modificación del residuo 338 en el factor IX humano de arginina a alanina causa un incremento de la actividad catalítica (Chang et al., J. Biol. Chem., 273:12089-94 (1998)). El colágeno IV puede servir para atrapar el factor IX, lo que significa que al introducirlo en el tejido muscular de un mamífero, parte del factor IX no se encuentra disponible para la participación en la coagulación sanguínea debido a que se encuentra retenido en los espacios intersticiales del tejido muscular. Una mutación en la secuencia del factor IX que resulta en una proteína con unión reducida al colágeno IV (por ejemplo, de pérdida de función) es un mutante útil, por ejemplo, para el tratamiento de la hemofilia. Dicho gen de factor IX mutante puede codificar una proteína FIX humana con el aminoácido alanina en lugar de la lisina en la quinta posición aminoácida desde el inicio de la proteína madura.

Entre las modificaciones se incluyen una o más sustituciones de nucleótidos o aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100, o más nucleótidos o residuos), tal como la sustitución de un CpG por un dinucleótido alternativo en un transgén (por ejemplo, un gen que codifica el factor IX, tal como un gen que codifica FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). Una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácido conservadora en una secuencia de cápside. Una sustitución de aminoácido puede ser una arginina por un residuo de lisina (por ejemplo, una o más sustituciones de arginina por lisina, tal como se indica en cualquiera de 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 y/o 15-6). Entre las modificaciones adicionales se incluyen adiciones (por ejemplo, inserciones o 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100 o más nucleótidos o residuos) y deleciones (por ejemplo, subsecuencias o fragmentos) de una secuencia de referencia. Una secuencia modificada o variante puede retener por lo menos parte de una función o una actividad de la secuencia no modificada. Dichas formas y variantes modificadas pueden presentar una función o actividad igual, menor o mayor, aunque por lo menos una parte, de la función o actividad de una secuencia de referencia, por ejemplo, tal como se describe en la presente memoria.

Una variante puede presentar una o más diferencias o modificaciones no conservadoras o conservadoras de la secuencia de aminoácidos, o ambas. Una "sustitución conservadora" es la sustitución de un aminoácido por un residuo que es biológica, química o estructuralmente similar. La expresión "biológicamente similar" significa que la sustitución no destruye una actividad biológica. La expresión "estructuralmente similar" significa que los aminoácidos presentan cadenas laterales de longitud similar, tales como alanina, glicina y serina, o un tamaño similar. La expresión "similitud química" se refiere a que los residuos presentan la misma carga o que ambos son hidrófilos o hidrófobos. Entre los ejemplos particulares se incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como

isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, serina por treonina, y similares. Entre los ejemplos particulares de sustituciones conservadoras se incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro; la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares. Por ejemplo, entre las sustituciones conservadoras de aminoácidos normalmente se incluyen sustituciones dentro de los grupos siguientes: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina, treonina, lisina y arginina; fenilalanina y tirosina. Una "sustitución conservadora" incluye, además, la utilización de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido.

De acuerdo con lo anterior, las variantes génicas y proteicas (por ejemplo, de polinucleótidos que codifican proteínas indicadas en la presente memoria) pueden retener una o más actividades biológicas (por ejemplo, la función en la coagulación sanguínea, etc.). Las variantes pueden diferir de la secuencia de referencia, tal como polinucleótidos, proteínas o péptidos naturales. Dichas variantes de polinucleótidos, proteínas o polipéptidos incluyen proteínas o polipéptidos que han sido o pueden ser modificados utilizando tecnología de ADN recombinante, de manera que el polinucleótido, proteína o polipéptido posea propiedades alteradas o adicionales.

Al nivel de la secuencia de nucleótidos, un gen variante natural o no natural normalmente será por lo menos aproximadamente 50 % idéntico, más habitualmente aproximadamente 70 % idéntico, todavía más habitualmente aproximadamente 80 % idéntico, respecto al gen de referencia. De esta manera, por ejemplo, un gen FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG podría presentar una identidad de 80 % o superior respecto al gen FIX de tipo salvaje, o una identidad de 80 % a 85 %, 85 % a 90 %, 90 % a 95 % o superior respecto al gen FIX de tipo salvaje, por ejemplo, una identidad de 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o superior respecto al gen FIX de tipo salvaje.

Al nivel de la secuencia de aminoácidos, una proteína variante natural o no natural normalmente será por lo menos aproximadamente 70 % idéntica, más habitualmente aproximadamente 80 % idéntica, todavía más habitualmente presentará una identidad de aproximadamente 90 % o superior respecto a la proteína de referencia, aunque están permitidas regiones sustanciales de no identidad en las regiones no conservadas (por ejemplo, menos de 70 % idénticas, tal como menos de 60 %, 50 % o incluso 40 %). Las secuencias podrían presentar una identidad de por lo menos 60 %, 70 %, 75 % o superior (por ejemplo, una identidad de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior) respecto a una secuencia de referencia.

El término "identidad", "homología" y variaciones gramaticales de los mismos, se refieren a que dos o más entidades referenciadas son iguales, cuando son secuencias "alineadas". De esta manera, a título de ejemplo, en el caso de que dos secuencias polipeptídicas sean idénticas, presentan la misma secuencia de aminoácidos, por lo menos dentro de la región o parte a la que se hace referencia. En el caso de que dos secuencias polinucleótidas sean idénticas, presentan la misma secuencia polinucleotídica, por lo menos dentro de la región o parte a la que se hace referencia. La identidad puede ser en un área (región o dominio) definido de la secuencia. Un "área" o "región" de identidad se refiere a una parte de dos o más entidades referenciadas que es igual en las dos. De esta manera, en el caso de que dos secuencias proteicas o de ácido nucleico sean idénticas en una o más áreas o regiones de secuencia, comparten identidad dentro de esa región. Una secuencia "alineada" se refiere a múltiples secuencias polinucleotídicas o proteicas (de aminoácidos), que con frecuencia contienen correcciones para bases o aminoácidos faltantes o adicionales (huecos) en comparación con una secuencia de referencia.

La identidad puede extenderse a lo largo de toda la longitud o a una parte de la secuencia. La longitud de la secuencia que comparte la identidad de secuencia puede ser de 2, 3, 4, 5 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. polinucleótidos o aminoácidos contiguos. La longitud de la secuencia que comparte identidad puede ser de 21 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, etc. polinucleótidos o aminoácidos contiguos. La longitud de la secuencia que comparte identidad puede ser de 41 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, etc. polinucleótidos o aminoácidos contiguos. La longitud de la secuencia que comparte identidad puede ser de 50 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 50 a 55, 55 a 60, 60 a 65, 65 a 70, 70 a 75, 75 a 80, 80 a 85, 85 a 90, 90 a 95, 95 a 100, 100 a 110, etc. polinucleótidos o aminoácidos contiguos.

Los términos "homólogo" u "homología" se refieren a que dos o más entidades a las que se hace referencia comparten una identidad por lo menos parcial en una región o porción dada. La expresión "áreas, regiones o dominios" de homología o identidad se refiere a que una parte de dos o más entidades a las que se hace referencia comparte homología o es igual en las mismas. De esta manera, en el caso de que dos secuencias sean idénticas en una o más regiones de secuencia, comparten identidad en estas regiones. La expresión "homología sustancial" se refiere a que una molécula está estructural o funcionalmente conservada de manera que presenta o se predice que presenta una estructura o función por lo menos parcial de una o más de las estructuras o funciones (por ejemplo, una función o actividad biológica) de la molécula de referencia, o región o parte relevante/correspondiente de la molécula de referencia con la que comparte homología.

El grado de identidad (homología) entre dos secuencias puede determinarse utilizando un programa informático y/o algoritmo matemático. Dichos algoritmos que calculan el porcentaje de identidad (homología) de secuencias generalmente considera los huecos de secuencia y no correspondencias en toda la región o área de comparación. Por ejemplo, un algoritmo de búsqueda BLAST (por ejemplo, BLAST 2.0) (ver, por ejemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990), disponible públicamente de NCBI) presenta los parámetros de búsqueda de ejemplo siguientes: no correspondencia: -2; hueco abierto: 5; extensión de hueco: 2. Para las comparaciones de secuencias polipeptídicas, normalmente se utiliza un algoritmo BLASTP en combinación con una matriz de puntuaciones, tal como PAM100, PAM250, BLOSUM62 o BLOSUM62. Los programas de comparación de secuencias FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH asimismo se utilizan para cuantificar el grado de identidad (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185 (2000) y Smith et al., J. Mol. Biol. 147:195 (1981)). Asimismo se han desarrollado programas para cuantificar la similitud estructural de las proteínas utilizando el mapeo topológico basado en Delaunay (Bostick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 304:320 (2003)).

Entre los polinucleótidos se incluyen adiciones e inserciones, por ejemplo, uno o más dominios heterólogos. Una adición (por ejemplo, un dominio heterólogo) puede ser una unión covalente o no covalente de cualquier tipo de molécula a una composición. Normalmente, las adiciones e inserciones (por ejemplo, un dominio heterólogo) confieren una función o actividad complementaria o diferente.

Entre las adiciones e inserciones se incluyen secuencias quiméricas y de fusión, que son secuencias polinucleotídicas o proteicas que presentan una o más moléculas no presentes normalmente en una secuencia natural (de tipo salvaje) de referencia unidas covalentemente a la secuencia. El término "fusión" o "quimérico", y variaciones gramaticales del mismo, utilizado en referencia a una molécula se refiere a que una porción o parte de la molécula contiene una entidad diferente diferenciada (heteróloga) de la molécula tal como existe normalmente en la naturaleza. Es decir, por ejemplo, una parte de la fusión o quimera incluye o consiste en una parte que no existe junto ella de manera natural, y que es estructuralmente diferente.

El término "vector" se refiere a un plásmido, virus (por ejemplo, un vector de AAV) u otro vehículo que puede manipularse mediante inserción o incorporación de un polinucleótido. Dichos vectores pueden utilizarse para la manipulación genética (es decir, son "vectores de clonación") para introducir/transferir polinucleótidos al interior de las células, y para transcribir o traducir el polinucleótido insertado en las células. Una secuencia de ácido nucleico de vector generalmente contiene por lo menos un origen de replicación para la propagación en una célula y opcionalmente elementos adicionales, tales como una secuencia polinucleotídica heteróloga, un elemento de control de la expresión (por ejemplo, un promotor o un potenciador), un intrón, una o más ITR, un marcador seleccionable (por ejemplo, de resistencia a antibiótico), y una secuencia de poliadenina (asimismo denominada "de poliadenilación").

Un vector vírico deriva o está basado en uno o más elementos de ácido nucleico que comprenden un genoma vírico. Entre los vectores víricos particulares se incluyen vectores lentivíricos y parvovíricos, tales como vectores de virus adenoasociado (AAV).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "recombinante" como modificador de vector vírico, tal como vectores lentivíricos o parvovíricos (por ejemplo, AAV) recombinantes, así como un modificador de secuencias, tales como polinucleótidos y polipéptidos recombinantes, se refiere a que las composiciones (por ejemplo, AAV o secuencias) han sido manipuladas (es decir, sometidas a ingeniería) de una manera que generalmente no ocurre naturalmente. Un ejemplo particular de un vector recombinante, tal como un vector de AAV sería en el que un polinucleótido que no está presente normalmente en el genoma vírico (por ejemplo, AAV) de tipo salvaje se inserta dentro del genoma vírico. Por ejemplo, un ejemplo de un polinucleótido recombinante sería en el que un polinucleótido (por ejemplo, un gen) heterólogo que codifica una proteína se clona en un vector, con o sin regiones 5', 3' y/o de intrón con las que el gen está asociado normalmente dentro del genoma vírico (por ejemplo, AAV). Aunque el término "recombinante" no siempre se utiliza en la presente memoria en referencia a los vectores, tales como vectores víricos y AAV, así como a secuencias, tales como polinucleótidos y polipéptidos, las formas recombinantes de las secuencias víricas, de AAV, y de secuencias, incluyendo polinucleótidos y polipéptidos, están incluidas expresamente a pesar de cualquiera de dichas omisiones.

Un "vector" vírico recombinante o "vector de AAV" deriva del genoma de tipo salvaje de un virus, tal como un AAV mediante la utilización de métodos moleculares para eliminar el genoma de tipo salvaje del virus (por ejemplo, AAV) y la sustitución por un ácido nucleico no natural, tal como una secuencia polinucleotídica heteróloga (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica el FIX humano, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). Normalmente, para AAV se retiene una o ambas secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma de AAV en el vector de AAV. Un vector vírico "recombinante" (por ejemplo, AAV) se distingue de un genoma vírico (por ejemplo, AAV), ya que la totalidad o una parte del genoma vírico ha sido sustituido por una secuencia no natural con respecto al ácido nucleico genómico vírico (por ejemplo, de AAV), tal como una secuencia polinucleotídica heteróloga (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica FIX humano, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG). Por lo tanto, la incorporación de una secuencia no natural (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica FIX humano,

tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG) define el vector vírico (por ejemplo, AAV) como un vector "recombinante", que en el caso del AAV puede denominarse "vector de rAAV".

Puede empaquetarse una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, lentivirus, parvovirus o AAV) (denominada "partícula" en la presente memoria) para la posterior infección (transducción) de una célula, *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. En el caso de que se encapside o empaquete una secuencia de vector recombinante en una partícula de AAV, la partícula asimismo puede denominarse "rAAV". Entre dichas partículas se incluyen proteínas que encapsidan o empaquetan el genoma del vector. Entre los ejemplos particulares se incluyen proteínas de cubierta vírica, y en el caso del AAV, proteínas de cápside.

Para un plásmido recombinante, un "genoma" de vector se refiere a la parte de la secuencia recombinante de plásmido que finalmente se empaqueta o encapsida para formar una partícula vírica (por ejemplo, de AAV). En los casos en que se utilicen plásmidos recombinantes para construir o producir vectores recombinantes, el genoma del vector no incluye la parte del "plásmido" que no corresponde a la secuencia genómica del vector del plásmido recombinante. Esta parte genómica no del vector en el plásmido recombinante se denomina "esqueleto del plásmido", que resulta importante para la clonación y amplificación del mismo, un proceso que resulta necesario para la propagación y la producción de virus recombinantes, pero que no está empaquetado o encapsidado en partículas víricas (por ejemplo, de AAV).

De esta manera, un "genoma" de vector se refiere a la parte del plásmido vector que está empaquetada o encapsidada por virus (por ejemplo, AAV), y que contiene una secuencia polinucleotídica heteróloga. La parte genómica no de vector del plásmido recombinante es el "esqueleto de plásmido" que resulta importante para la clonación y la amplificación del plásmido, por ejemplo, presenta un marcador seleccionable, tal como kanamicina, pero que no está empaquetada o encapsidada por el virus (por ejemplo, AAV).

Las cantidades de rAAV que encapsidan/empaquetan genomas de vector pueden determinarse, por ejemplo, mediante PCR cuantitativa. Este ensayo mide el número físico de genomas de vector empaquetados, mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real y puede llevarse a cabo en diversas etapas del procedimiento de producción/purificación, por ejemplo, en el vector de AAV en masa y el producto final.

Las secuencias de vector recombinante se manipulan mediante inserción o incorporación de un polinucleótido. Un plásmido vector generalmente contiene por lo menos un origen de replicación para la propagación en una célula y uno o más elementos de control de la expresión.

Entre las secuencias de vector que incluyen vectores AAV pueden incluirse uno o más "elementos de control de la expresión". Normalmente, los elementos de control de la expresión son una o más secuencias de ácido nucleico que incluyen sobre la expresión de un polinucleótido ligado operablemente. Los elementos de control, incluyendo los elementos de control de la expresión, tales como promotores y potenciadores, presentes dentro de un vector se incluyen para facilitar una transcripción correcta del polinucleótido heterólogo y, en su caso, una traducción apropiada (por ejemplo, un promotor, potenciador, señal de procesamiento de intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción dentro del marco del ARNm y codones de parada, etc.). Dichos elementos normalmente actúan en *cis*, a los que se hace referencia como un elemento "de acción en *cis*", aunque asimismo pueden actuar en *trans*.

El control de la expresión puede llevarse a cabo al nivel de transcripción, traducción, procesamiento, estabilidad del mensaje, etc. Normalmente, un elemento de control de la expresión que modula la transcripción se yuxtapone en proximidad al extremo 5' (es decir, "cadena arriba") de un polinucleótido transcrito (por ejemplo, de un ácido nucleico modificado que codifica el factor IX, tal como FIX, con un número reducido de dinucleótidos CpG). Los elementos de control de la expresión asimismo pueden estar ubicados en el extremo 3' (es decir, "cadena abajo") de la secuencia transcrita o dentro del transcrito (por ejemplo, en un intrón). Los elementos de control de la expresión pueden estar ubicados en contigüidad o a una distancia de la secuencia transcrita (por ejemplo, a una distancia de 1 a 10, 10 a 25, 25 a 50, 50 a 100, o 100 a 500 o más nucleótidos respecto del polinucleótido), incluso a distancias considerables. Sin embargo, debido a las limitaciones de longitud del polinucleótido de determinados vectores, tales como los vectores AAV, dichos elementos de control de la expresión normalmente se encuentran a una distancia de entre 1 y 1000 nucleótidos del polinucleótido transcrito.

Funcionalmente, la expresión de polinucleótido heterólogo ligado funcionalmente es por lo menos en parte controlable por el elemento (por ejemplo, un promotor) de manera que el elemento modula la transcripción del polinucleótido y, según el caso, la traducción del transcrito. Un ejemplo específico de un elemento de control de la expresión es un promotor, que habitualmente está ubicado en 5' de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de un elemento de control de la expresión es un potenciador, que puede estar ubicado en 5' o 3' de la secuencia transcrita, o dentro de la secuencia transcrita.

Un "promotor" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que está ubicada en contigüidad a una secuencia polinucleotídica que codifica un producto recombinante. Un promotor normalmente está ligado operablemente a una secuencia contigua, por ejemplo, un

polinucleótido heterólogo (por ejemplo, un ácido nucleico modificado que codifica el factor IX). Un promotor normalmente incrementa la cantidad expresada a partir de un polinucleótido heterólogo en comparación con la cantidad expresada cuando no existe un promotor.

Un "potenciador" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una secuencia que está ubicada en contigüidad al polinucleótido heterólogo. Los elementos potenciadores normalmente están ubicados cadena arriba de un elemento promotor, aunque asimismo funcionan, y pueden estar ubicados, cadena abajo o dentro de una secuencia de ADN (por ejemplo, un polinucleótido heterólogo). Por lo tanto, un elemento potenciador puede estar ubicado 100 pares de bases, 200 pares de bases o 300 o más pares de bases cadena arriba o cadena abajo de un polinucleótido heterólogo. Los elementos potenciadores normalmente incrementan la expresión de un polinucleótido heterólogo hasta un nivel superior a la expresión incrementada que proporciona un elemento promotor.

Entre los elementos de control de la expresión (por ejemplo, los promotores) se incluyen los activos en un tejido o tipo celular particular, denominado en la presente memoria "elementos/promotores de control de la expresión específica de tejido". Los elementos de control de la expresión específicos de tejido normalmente están activos en una célula o tejido específico (por ejemplo, hígado, cerebro, sistema nervioso central, médula espinal, ojo, retina, hueso, músculo, pulmón, páncreas, corazón, célula renal, etc.). Los elementos de control de la expresión normalmente están activos en dichas células, tejidos u órganos debido a que son reconocidos por proteínas activadoras de la transcripción, u otros reguladores de la transcripción, que son únicos de la célula, tejido o tipo de órgano específico.

Entre los ejemplos de promotores activos en el músculo esquelético se incluyen promotores de genes codificantes de la α -actina esquelética, la cadena ligera 2A de la miosina, la distrofina, la creatinasa muscular, así como promotores musculares sintéticos con actividades superiores a las de los promotores naturales (ver, por ejemplo, Li et al., Nat. Biotech. 17:241-245, 1999). Son ejemplos de promotores que son específicos de tejido hepático, el promotor alfa 1-antitripsina humana (hAAT); la albúmina, Miyatake et al., J. Virol. 71:5124-32 (1997); el promotor central del virus de la hepatitis B, Sandig et al., Gene Ther. 3:1002-9 (1996); la alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot et al., Hum. Gene. Ther., 7:1503-14 (1996); óseos (osteocalcina, Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997); sialoproteína ósea, Chen et al., J. Bone Miner. Res. 11:654-64 (1996)), linfocitos (CD2, Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998); cadena pesada de inmunoglobulina; cadena α de receptor de célula T, neuronal (promotor de enolasa específica neuronal (NSE), Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993); gen de cadena ligera de neurofilamento, Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991); el gen *vgf* específico neuronal, Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995), entre otros. Un ejemplo de un potenciador activo en el hígado es HCR-1 y HCR-2 de apolipoproteína E (apoE) (Allan et al., J. Biol. Chem., 272:29113-19 (1997)).

Entre los elementos de control de la expresión se incluyen, además, promotores/potenciadores ubicuos o promiscuos que son capaces de gobernar la expresión de un polinucleótido en muchos tipos celulares diferentes. Entre dichos elementos se incluyen, aunque sin limitación, las secuencias de promotor temprano inmediato/potenciador del citomegalovirus (CMV), secuencias de promotor/potenciador del virus del sarcoma de Rous (VSR) y los demás promotores/potenciadores víricos activos en una variedad de tipos de células de mamífero, o elementos sintéticos que no están presentes en la naturaleza (ver, por ejemplo, Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)), el promotor del SV40, el promotor de la dihidrofolato reductasa, el promotor de la β -actina citoplasmática y el promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK).

Los elementos de control de la expresión pueden conferir, además, la expresión de una manera regulable, es decir, una señal o estímulo incrementa o reduce la expresión del polinucleótido heterólogo ligado operablemente. Un elemento regulable que incrementa la expresión del polinucleótido ligado funcionalmente en respuesta a una señal o estímulo asimismo se denomina "elemento inducible" (es decir, que resulta inducido por una señal). Entre los ejemplos particulares se incluyen un promotor inducible por una hormona (por ejemplo, esteroidea). El elemento regulable que reduce la expresión del polinucleótido ligado operablemente en respuesta a una señal o estímulo se denomina "elemento reprimible" (es decir, la señal reduce la expresión de manera que en el caso de que la señal se elimine o esté ausente, se incrementa la expresión). Normalmente, el nivel de incremento o reducción conferido por dichos elementos es proporcional a la cantidad de señal o estímulo presente; a mayor cantidad de señal o estímulo, mayor es el incremento o reducción de la expresión. Entre los ejemplos particulares se incluyen el promotor metalotionina (MT) de oveja inducible por cinc; el promotor de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por hormona esteroidea; el sistema de promotor de polimerasa T7 (documento WO 98/10088); el sistema reprimible por tetraciclina (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992); el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al., Science 268:1766-1769 (1995); ver asimismo Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 2:512-518 (1998)); el sistema inducible por RU486 (Wang et al., Nat. Biotech. 15:239-243 (1997), y Wang et al., Gene Ther. 4:432-441 (1997)), y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al., J. Clin. Invest. 100:2865-2872 (1997); Rivera et al., Nat. Medicine 2:1028-1032 (1996)). Otros elementos de control regulables que pueden resultar útiles en el presente contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, la temperatura, la fase aguda y el desarrollo.

Entre los elementos de control de la expresión se incluyen, además, el elemento o elementos naturales del polinucleótido heterólogo. Puede utilizarse un elemento de control natural (por ejemplo, un promotor) en el caso de que se desee que la expresión del polinucleótido heterólogo imite la expresión natural. El elemento natural puede utilizarse en el caso de que la expresión del polinucleótido heterólogo esté regulada temporalmente o durante el desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. Asimismo pueden utilizarse otros elementos naturales de control de la expresión, tales como intrones, sitios de poliadenilación o secuencias de Kozak de consenso.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "ligamiento operable" o "ligado operablemente" se refiere a una yuxtaposición física o funcional de los componentes descritos de esta manera que permite que funcionen de su modo pretendido. En el ejemplo de un elemento de control de la expresión en ligamiento operable con un ácido nucleico, la relación es tal que el elemento de control modula la expresión del ácido nucleico. Más específicamente, por ejemplo, dos secuencias de ADN operablemente ligadas implican que los dos ADN están dispuestos (en cis o en trans) en una relación tal que por lo menos una de las secuencias de ADN es capaz de ejercer un efecto fisiológico en la otra secuencia.

De acuerdo con lo anterior, las secuencias de ácidos nucleicos modificadas que codifican proteína FIX humana, y los vectores y plásmidos, incluyendo vectores víricos tales como vectores lentivíricos y parvovíricos, que incluyen los vectores AAV, así como composiciones de los mismos, pueden incluir elementos de ácido nucleico adicionales. Entre estos elementos se incluyen, aunque sin limitación, una o más copias de una secuencia ITR de AAV, un elemento de control de la expresión (por ejemplo, un promotor/potenciador), una señal de terminación de la transcripción o codón de parada, regiones 5' o 3' no traducidas (por ejemplo, secuencias de poliadenilación (poliA)) que flanquean una secuencia polinucleotídica, o un intrón, tal como la totalidad o una parte del intrón I del factor IX humano genómico (SEC ID n°: 13).

Entre los elementos de ácido nucleico se incluyen, además, por ejemplo, secuencias polinucleotídicas de llenado o relleno, por ejemplo para mejorar el empaquetamiento o reducir la presencia de ácido nucleico contaminante, por ejemplo, para reducir el empaquetamiento del esqueleto plasmídico. Los vectores AAV normalmente aceptan inserciones de ADN que presentan un intervalo de tamaño de definido, que es generalmente de entre aproximadamente 4 kb y aproximadamente 5.2 kb, o ligeramente más. De esta manera, para secuencias más cortas, la inclusión de un relleno o elemento de llenado en el fragmento de inserción con el fin de ajustar la longitud en el tamaño normal, o prácticamente el tamaño normal, de la secuencia genómica vírica aceptable para el empaquetamiento del vector de AAV en la partícula vírica. Una secuencia de ácido nucleico de llenado/relleno puede ser un segmento no traducido (no que codifica la proteína) de ácido nucleico. En un vector de AAV, una secuencia polinucleotídica heteróloga puede presentar una longitud inferior a 4.7 kb y la secuencia polinucleotídica de llenado o relleno presenta una longitud que, en combinación (por ejemplo, insertada en un vector) con la secuencia polinucleotídica heteróloga, presenta una longitud total de entre aproximadamente 3.0 y 5.5 kb, o de entre aproximadamente 4.0 y 5.0 kb, o de entre aproximadamente 4.3 y 4.8 kb.

Un intrón asimismo puede funcionar como una secuencia polinucleotídica de llenado o relleno con el fin de conseguir una longitud para el empaquetamiento del vector de AAV en una partícula vírica. Los intrones y fragmentos de intrón (por ejemplo, parte del intrón I de FIX) que funcionan como una secuencia polinucleotídica de llenado o relleno asimismo pueden intensificar la expresión. La inclusión de un elemento intrón puede intensificar la expresión en comparación con la expresión en la ausencia del elemento intrón (Kurachi et al., 1995, *supra*).

La utilización de intrones no está limitada a la inclusión de secuencias de intrón I del factor IX, sino que asimismo puede incluir otros intrones, los cuales pueden estar asociados al mismo gen (por ejemplo, en el que el ácido nucleico codifica factor IX, el intrón deriva de un intrón presente en la secuencia genómica del factor IX) o asociados a un gen completamente diferente u otra secuencia de ADN. De acuerdo con lo anterior, otras regiones no traducidas (no codificantes de proteína) de ácido nucleico, tales como intrones presentes en secuencias genómicas de genes afines (relacionados) (la secuencia polinucleotídica heteróloga codifica la totalidad o una parte de la misma proteína codificada por la secuencia genómica) y genes no afines (no relacionados) (la secuencia polinucleotídica heteróloga codifica una proteína que es diferente de la proteína codificada por la secuencia genómica) asimismo pueden funcionar como secuencias polinucleotídicas de llenado o relleno.

Una "parte del intrón I" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una región del intrón I que presenta una longitud de nucleótidos de entre aproximadamente 0.1 kb y aproximadamente 1.7 kb, en la que la región intensifica la expresión del factor IX, normalmente en aproximadamente 1.5 veces o más en un molde de vector plasmídico o vírico en comparación con la expresión de FIX en la ausencia de una parte de intrón I. Una parte más específica es una parte de 1.3 kb del intrón I. Un ejemplo no limitativo de una secuencia del intrón I del factor IX es el intrón A, una quimera compuesta de la parte 5' y la parte 3' del primer intrón de FIX tal como se indica en la SEC ID n°: 13.

Los elementos de control de la expresión, las ITR, las secuencias de poliA y las secuencias polinucleotídicas de llenado o relleno, pueden variar en longitud. Un elemento de control de la expresión, ITR, poliA o una secuencia polinucleotídica de llenado o relleno puede ser una secuencia de aproximadamente 1 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a

40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 75, 75 a 100, 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 400, 400 a 500, 500 a 750, 750 a 1,000, 1,000 a 1,500, 1,500 a 2,000 o 2,000 a 2,5000 nucleótidos de longitud.

5 Un vector de AAV puede comprender una cápside de AAV que comprende la proteína VP1 variante de cápside 4-1 (SEC ID nº: 4) y un genoma para la expresión de un gen heterólogo en una célula de mamífero transducida.

10 La cápside de dicho vector puede comprender, además, las proteínas VP2 y VP3 de la variante de cápside 4-1 (SEC ID nº: 27 y SEC ID nº: 3, respectivamente). Las proteínas VP1 y VP2 pueden encontrarse en una relación estequiométrica de aproximadamente 1:1 (o alguna otra relación, y la proteína VP3 puede encontrarse en una relación respecto a VP1 o VP2, o ambas VP1 y VP2, de aproximadamente 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1 o alguna otra relación.

15 Un genoma de un vector de AAV, incluyendo, aunque sin limitación, uno que presente una cápside que comprende las proteínas variantes de cápside 4-1 (VP1, VP2 y VP3) puede comprender una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica la proteína factor IX (FIX) humana. La proteína FI puede ser de tipo salvaje, contener una mutación por sustitución u otra mutación que altere la actividad de la proteína. La mutación puede incrementar la actividad catalítica de FIX y/o la actividad de la proteína como procoagulante. Según la invención, la proteína FIX es la proteína FIX Padua, con una sustitución de Arg por Ala en el aminoácido correspondiente a la posición 338 de la proteína FIX. El gen que codifica FIX humana (incluyendo FIX Padua) puede estar optimizado para los
20 codones, por ejemplo mediante la reducción o incluso eliminación de los dinucleótidos CpG. Asimismo son posibles otros tipos de optimización de los codones.

25 El genoma del vector de AAV puede comprender, además, repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2 ubicadas en los extremos izquierdo y derecho (es decir, los extremos 5' y 3', respectivamente) del genoma. Una ITR izquierda puede comprender o consistir en los nucleótidos 1 a 141 de la SEC ID nº: 12 (dada a conocer en la presente memoria como SEC ID nº: 13) y una ITR derecha puede comprender o consistir en los nucleótidos 4097 a 4204 de la SEC ID nº: 12 (dada a conocer en la presente memoria como SEC ID nº: 20). Cada ITR puede estar separada de otros elementos en el genoma del vector por una secuencia de ácido nucleico de longitud variable.

30 El genoma del vector de AAV puede comprender, además, un elemento de control de la expresión, incluyendo un promotor, y opcionalmente un potenciador. El genoma del vector de AAV puede comprender tanto un promotor como un potenciador, que pueden ser constitutivos, inducibles o específicos de tejido. El promotor, o el potenciador, o ambos, pueden ser específicos de tejido. Tanto el potenciador como el promotor pueden ser activos en hepatocitos, en comparación con otros tipos celulares determinados. El potenciador puede ser la totalidad o una
35 parte del potenciador HCR-1 de ApoE humano, y el promotor puede ser la totalidad o una parte del promotor de antitripsina alfa-1 (AAT) humano. El genoma del vector de AAV puede incluir un potenciador HCR-1 de ApoE humano que comprende o consiste en los nucleótidos 152 a 472 de la SEC ID nº: 12 (dada a conocer en la presente memoria como SEC ID nº: 14) y puede incluir un promotor de AAT humano que comprende o consiste en los nucleótidos 482 a 878 de la SEC ID nº: 12 (dada a conocer en la presente memoria como SEC ID nº: 15). El
40 potenciador HCR-1 de ApoE puede estar ubicado en 5' de un promotor de AAT, y las secuencias pueden ser contiguos o estar separadas por otra secuencia de nucleótidos. El potenciador y el promotor pueden estar ubicados en 5' de una secuencia de ácido nucleico que codifica el factor IX, y pueden estar unidos contiguamente al primer exón de un gen de factor IX, o pueden estar separados del mismo por una secuencia 5' no traducida (UTR) procedente de un gen de factor IX humano, o alguna otra secuencia que sirve de espaciador. Una secuencia 5'
45 UTR puede comprender o consistir en los nucleótidos 879 a 907 de la SEC ID nº: 12.

50 El gen que codifica FIX, que incluye la proteína FIX Padua natural, puede incluir uno o más intrones presentes en la secuencia genómica del factor IX humano. Pueden excluirse todos los intrones, un ejemplo de los cuales se da a conocer como la secuencia de ácido nucleico de SEC ID nº: 10 y que se denomina en la presente memoria secuencia que codifica "FIX39". En caso de estar presente, un intrón puede comportarse como una secuencia de relleno o llenado tal como se indica en la presente memoria. El gen entero puede estar optimizado para los codones a fin de reducir o eliminar los dinucleótidos CpG.

55 Un gen que codifica el factor IX humano utilizado en un vector de AAV puede comprender o consistir en los nucleótidos 908 a 3731 de la SEC ID nº: 12, que codifica la proteína FIX Padua y ha sido optimizada para los codones a fin de eliminar dinucleótidos CpG. Esta secuencia incluye un exón 1 (nucleótidos 908 a 995 de la SEC ID nº: 12), un primer intrón (en ocasiones conocido como intrón I, nucleótidos 996 a 2433 de la SEC ID nº: 12) y los exones 2 a 8 (nucleótidos 2434 a 3731 de la SEC ID nº: 12).

60 Al gen que codifica el factor IX puede seguir en su extremo 3' una secuencia 3' UTR de un gen de factor IX humano (tal como, aunque sin limitación, los nucleótidos 3732 a 3779 de la SEC ID nº: 12 y/o por una secuencia poliadenilato (poliA) de un gen de factor IX, u otro gen. La secuencia poliA puede ser del gen de la hormona de crecimiento bovino (bGH) y puede comprender o consistir en los nucleótidos 3820 a 4047 de la SEC ID nº: 12. Una
65 3' UTR puede estar variablemente espaciada respecto de la secuencia poliA por una secuencia interpuesta de nucleótidos.

Los elementos indicados anteriormente pueden combinarse en un genoma de vector de AAV. Un vector de AAV puede presentar un genoma que comprende, en orden 5' a 3', una ITR izquierda del AAV, el potenciador HCR-1 de ApoE (o una parte del mismo), el promotor hAAT (o una parte del mismo), una parte de la 5'UTR del factor IX humano, ácido nucleico que codifica el factor IX Padua humano (incluyendo opcionalmente uno o más intrones, tales como el intrón I), una parte del 3' UTR del factor IX humano, una secuencia poliA de bGH (o una parte de la misma) y a la derecha, una ITR del AAV2. Una ITR del AAV2 izquierdo puede presentar la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 13, un potenciador HCR-1 de ApoE puede presentar la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 14; un promotor hAAT puede presentar la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 15; un 5' UTR puede presentar la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 16; un gen que codifica FIX Padua (incluyendo el intrón I) puede codificar la proteína FIX codificada por la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 10; la 3' UTR puede presentar la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 18, una región poliA puede presentar la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 19, y una ITR del AAV2 derecha puede presentar la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº: 20.

El genoma del vector de AAV puede comprender o consistir en los nucleótidos 1 a 4204 de la SEC ID nº: 12 o una secuencia que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma. La cápside puede comprender la variante de proteína de cápside VP1 4-1 (SEC ID nº: 4) y las proteínas de cápside VP2 y VP2 correspondientes. En un vector de AAV particular, denominado en la presente memoria "AAV-FIX39-Padua", el vector puede incluir una cápside formada de las proteínas variantes de cápside 4-1 (VP1, VP2 y VP3) y un genoma de cadena sencilla que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente a los nucleótidos 1 a 4204 de SEC ID nº: 12.

La expresión "cápsides vacías" de AAV tal como se utiliza en la presente memoria no contienen un genoma de vector (por ello el término "vacío"), en contraste con "cápsides que contienen genoma", que contienen un genoma de vector de AAV. Las cápsides vacías son partículas de tipo vírico en el aspecto de que reaccionan con uno o más anticuerpos que reaccionan con el virus intacto (el vector de AAV que contiene genoma).

Las cápsides vacías pueden estar incluidas en las preparaciones de vector de AAV. Si se desea, pueden añadirse cápsides vacías de AAV a las preparaciones de vector de AAV, o administrarse por separado al sujeto de acuerdo con lo descrito en la presente memoria, aunque en métodos no reivindicados. Se entiende generalmente que cualesquiera referencias a métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía en la presente descripción deben interpretarse como referencias a composiciones farmacéuticas de la presente invención para la utilización en dichos métodos.

Aunque sin respaldo teórico, se cree que las cápsides vacías de AAV se unen o reaccionan con anticuerpos contra los vectores AAV, funcionando de esta manera como un señuelo para reducir la inactivación del vector de AAV. Dicho señuelo actúa absorbiendo los anticuerpos dirigidos contra el vector de AAV, incrementando o mejorando de esta manera la transducción del transgén del vector de AAV en las células (introducción del transgén) y, a su vez, incrementando la expresión celular del transcrito y/o proteína codificada.

Pueden generarse y purificarse cápsides vacías con una calidad y determinarse sus cantidades. Por ejemplo, puede medirse el título de cápsides vacías mediante espectrofotometría a partir de la densidad óptica a una longitud de onda de 280 nm (basado en Sommer et al., Mol. Ther., enero de 2003; 7(1):122-8).

Los AAV vacíos o cápsides vacías en ocasiones se encuentran naturalmente en las preparaciones de vector de AAV. Dichas mezclas naturales pueden utilizarse según la invención, o si se desea, manipularse para incrementar o reducir la cantidad de cápside y/o vector vacío. Por ejemplo, la cantidad de cápside vacía opcionalmente puede ajustarse a una cantidad que se esperaría reducirse el efecto inhibitorio de los anticuerpos que reaccionan con un vector de AAV que está destinado a ser utilizado para la transducción génica mediada por vector en el sujeto. La utilización de cápsides vacías se describen la publicación de patente US nº 2014/0336245.

Pueden formularse cápsides vacías de AAV con vectores AAV y/o administrarse a un sujeto. Las cápsides vacías de AAV pueden formarse con una cantidad igual o inferior de vector (por ejemplo, una relación de vectores AAV a cápsides vacías de AAV de entre aproximadamente 1,5 y 100 veces, o una relación de vectores AAV a cápsides vacías de AAV de aproximadamente 1:1). Pueden formularse vectores AAV con un exceso de cápsides vacías de AAV (por ejemplo, una relación de cápsides vacías de AAV a vectores AAV superior a 1, por ejemplo, una relación de cápsides vacías de AAV a vectores AAV de entre 1,5 y 100 veces). Opcionalmente, los sujetos con un título de anticuerpos neutralizantes (AN) de AAV bajo a negativo pueden recibir cantidades menores de cápsides vacías (relación de cápsides vacías de AAV a vectores AAV de entre 1 y 10 veces, relación entre cápsides vacías de AAV a vectores AAV de entre 2 y 6 veces, o una relación de cápsides vacías de AAV a vectores AAV de aproximadamente 4 a 5 veces).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden vectores AAV, incluyendo los que comprenden proteínas variantes de cápside 4-1 (VP1, VP2 y VP3) pueden comprender un exceso de cápsides vacías superior a la concentración de vectores AAV (es decir, aquellos que contienen un genoma de vector) en la composición. La relación de cápsides vacías a vectores AAV puede ser de aproximadamente 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4,

4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10 a 1, o alguna otra relación.

- 5 Las cápsides vacías pueden comprender las mismas proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3 que están presentes en los vectores AAV. Las cápsides vacías pueden comprender proteínas VP1, VP2 y VP3 que presentan una secuencia de aminoácidos diferente de la encontrada en los vectores AAV. Normalmente, aunque no necesariamente, si las proteínas de cápside de las cápsides vacías y las cápsides de los vectores AAV no presentan una secuencia idéntica, serán del mismo serotipo.

10 Una composición puede comprender un vector de AAV descrita en la presente memoria como AAV-FIX39-Padua (o uno que presenta la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al mismo) y opcionalmente un exceso de cápsides vacías que comprenden las mismas proteínas de cápside, en las que la relación de cápsides vacías a vector de AAV es de aproximadamente 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10 a 1, o alguna otra relación. La relación en la composición de AAV-FIX39-Padua a cápsides vacías puede ser de aproximadamente 1:5. Las composiciones que comprende AAV-FIX39-Padua y cápsides vacías pueden administrarse a un sujeto humano que presenta hemofilia B, incluyendo hemofilia B grave, moderada o leve.

25 Un "gene marcador seleccionable" se refiere a un gen que, al expresarse, confiere un fenotipo seleccionable, tal como resistencia a antibiótico (por ejemplo, a kanamicina), a la célula transducida. Un gen "informador" es uno que proporciona una señal detectable. Un ejemplo no limitativo de un gen informador es el gen de la luciferasa.

30 Puede prepararse ácido nucleico, polinucleótidos, vectores de expresión (por ejemplo, genomas de vector), plásmidos, incluyendo formas modificadas, utilizando diversas técnicas estándares de clonación, de ADN recombinante, mediante la expresión celular o técnicas de traducción *in vitro* y de síntesis química. La pureza de los polinucleótidos puede determinarse mediante secuenciación, electroforesis en gel y similares. Por ejemplo, pueden aislarse ácidos nucleicos utilizando técnicas de hibridación o el cribado informático de bases de datos. Entre dichas técnicas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas: (1) la hibridación de bibliotecas de ADN genómico o de ADNc con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogas, (2) el cribado de anticuerpos para detectar polipéptidos que presentan características estructuras compartidas, por ejemplo, utilizando una biblioteca de expresión, (3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico o ADNc utilizando cebadores capaces de hibridarse a una secuencia de ácido nucleico de interés, (4) búsquedas informáticas de bases de datos de secuencias para secuencias relacionadas, y (5) cribado diferencial de una biblioteca sustractiva de ácidos nucleicos.

40 El término "aislado" al utilizarlo como un modificador de una composición, se refiere a que las composiciones se preparan manualmente o se separan, por completo o por lo menos en parte, de su medio *in vivo* natural. Generalmente, las composiciones aisladas están sustancialmente libres de uno o más materiales con las que están normalmente asociadas en la naturaleza, por ejemplo, uno o más de proteína, ácido nucleico, lípido, carbohidrato y membrana celular. El término "aislado" no excluye las combinaciones producidas manualmente, por ejemplo, una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, de rAAV) o una partícula vírica que empaqueta o encapsida un genoma de vector y una formulación farmacéutica. El término "aislado" tampoco excluye formas físicas alternativas de las composiciones, tales como híbridos/quimeras, multímeros/oligómeros, modificaciones (por ejemplo, fosforilación, glucosilación o lipidación) o formas convertidas en derivados, o formas expresadas en células hospedadoras producidas manualmente.

50 Los métodos y las utilidades descritos en la presente memoria, aunque no comprendidos en la invención reivindicada, proporcionan un medio para suministrar (transducir) polinucleótidos heterólogos (transgenes) en el interior de células hospedadoras, incluyendo células proliferantes y/o no proliferantes. Las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genomas de vector, partículas víricas recombinantes, métodos, usos y formulaciones farmacéuticas de la invención resultan adicionalmente útiles en un método de suministro, administración o provisión de un ácido nucleico o proteína a un sujeto que lo necesita, a modo de método de tratamiento. De esta manera, se transcribe el ácido nucleico y puede producirse la proteína *in vivo* en un sujeto. El sujeto puede beneficiarse o requerir el ácido nucleico o proteína debido a que el sujeto presenta una deficiencia en el ácido nucleico o proteína, o debido a que la producción del ácido nucleico o proteína en el sujeto puede proporcionar algún efecto terapéutico, a modo de un método de tratamiento o alternativo.

65 En general, las secuencias de vector lentivírico o parvovírico recombinante (por ejemplo, AAV), genomas de vector, partículas víricas recombinantes, métodos y utilidades pueden utilizarse para suministrar cualquier polinucleótido heterólogo (transgén) con un efecto biológico para tratar o aliviar uno o más síntomas asociados a cualquier trastorno relacionado con una expresión génica insuficiente o no deseable. Las secuencias de vector

lentivírico o parvovírico (por ejemplo, AAV) recombinante, genomas de vector, partículas víricas recombinantes, métodos y utilidades pueden utilizarse para proporcionar terapia para diversos estados de enfermedad.

Los ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, rAAV), genomas de vector y partículas víricas recombinantes, métodos y utilidades permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. En general, los estados de enfermedad se encuentran comprendidos en dos clases: estados de deficiencia, habitualmente de enzimas, que generalmente se heredan de una manera recesiva, y estados de desequilibrio, que por lo menos implican en ocasiones proteínas reguladoras o estructurales, que se heredan de forma dominante. Para las enfermedades de estado de deficiencia, podría utilizarse la transferencia génica para llevar un gen normal al interior de los tejidos afectados para la terapia de sustitución, así como para crear modelos animales de la enfermedad utilizando mutaciones antisentido. Para los estados de enfermedad por desequilibrio, podría utilizarse la transferencia génica para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que a continuación podría utilizarse en esfuerzos para contrarrestar el estado de enfermedad. Asimismo resulta posible la utilización de la integración específica de sitio de secuencias de ácidos nucleicos para corregir defectos.

Entre los ejemplos ilustrativos de estados de enfermedad se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, trastornos de la coagulación sanguínea, tales como la hemofilia A, la hemofilia B, la talasemia y la anemia.

Entre los métodos de tratamiento y las utilidades descritos en la presente memoria, aunque no reivindicados, se incluyen ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, rAAV), genomas de vector y partículas víricas recombinantes. Los métodos y las utilidades de la invención son ampliamente aplicables a proporcionar, o a incrementar o estimular, la expresión o función génica, por ejemplo, la adición o sustitución génica. Generalmente debe entenderse que cualesquiera referencias a métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía en la presente descripción deben interpretarse como referencias a composiciones farmacéuticas de la presente invención para la utilización en dichos métodos.

Un método o una utilización puede incluir: (a) proporcionar un ácido nucleico modificado que codifica el factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, tal como en un vector o un genoma de vector, en el que la secuencia de ácido nucleico modificada está operablemente ligada a un elemento de control de la expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia, y (b) administrar una cantidad del ácido nucleico modificado al mamífero de manera que se exprese el factor IX en el mamífero.

Un método o una utilización puede incluir la entrega o transferencia de un ácido nucleico modificado codificante de la secuencia del factor IX, tal como FIX, con un número reducido de dinucleótidos CpG, en un mamífero o una célula de un mamífero, mediante la administración de una partícula vírica (por ejemplo, AAV) o una pluralidad de partículas víricas (por ejemplo, AAV) (por ejemplo, tales como variantes de cápside (por ejemplo, 4-1)) que comprenden un genoma de vector, en las que el genoma de vector que comprende el ácido nucleico modificado que codifica el factor IX, tal como FIX, con un número reducido de dinucleótidos CpG (y opcionalmente una ITR, intrón, poliA, una secuencia polinucleotídica de llenado/relleno) a un mamífero o en una célula de un mamífero, suministrando o transfiriendo de esta manera el ácido nucleico modificado que codifica el factor IX en el mamífero o célula del mamífero.

En dichos métodos y utilidades dados a conocer en la presente memoria, aunque no reivindicados, la expresión del ácido nucleico puede proporcionar un beneficio terapéutico al mamífero (por ejemplo, un ser humano). La expresión del factor IX puede proporcionar un beneficio terapéutico al mamífero (por ejemplo, ser humano), tal como un mamífero que presenta hemofilia B. Puede incluirse una secuencia polinucleotídica de llenado/relleno en la secuencia de vector de manera que la longitud combinada con el ácido nucleico modificado que codifica el factor IX, tal como FIX con un número reducido de dinucleótidos CpG, presente una longitud total de entre aproximadamente 3.0 Kb y 5.5 Kb, o de entre aproximadamente 4.0 Kb y 5.0 Kb, o de entre aproximadamente 4.3 Kb y 4.8 Kb.

Entre los métodos y utilidades descritos en la presente memoria, aunque no reivindicados, se incluyen métodos de tratamiento, que resultan en cualquier efecto terapéutico o beneficioso. Dichos métodos y utilidades pueden ser la inhibición, disminución o reducción de uno o más síntomas adversos (por ejemplo, físicos), trastornos, afecciones, enfermedades o complicaciones causadas o asociadas a la enfermedad. Para un trastorno hemorrágico, tal como la hemofilia, el efecto terapéutico o beneficio incluye, aunque sin limitación, menor formación de hematomas, menor tiempo de coagulación sanguínea, menor número de episodios de sangrado (duración, gravedad y frecuencia). Por ejemplo, menor duración, gravedad o frecuencia de los episodios hemorrágicos de articulaciones o cerebrales. Para un trastorno hemorrágico tal como la hemofilia, un efecto terapéutico o beneficioso asimismo incluye, aunque de manera no limitativa, dosis reducidas de proteína factor de coagulación suplementario (por ejemplo, proteína factor IX) o eliminación de la administración de una proteína factor de coagulación suplementaria (por ejemplo, proteína factor IX).

Por lo tanto, un efecto terapéutico o beneficioso del tratamiento es cualquier mejora o beneficio objetivo o subjetivo, medible o detectable, proporcionado a un sujeto particular. Un efecto terapéutico o beneficioso puede ser, aunque no es necesariamente, la anulación completa de la totalidad o cualquiera de los síntomas adversos, trastornos,

enfermedades o complicaciones de una enfermedad particular, causados o asociados a una enfermedad, o una inhibición, disminución, reducción, supresión, prevención, límite o control del empeoramiento o progresión de uno o más síntomas adversos, trastornos, enfermedades o complicaciones causadas o asociadas a la enfermedad, durante un periodo corto o prolongado (horas, días, semanas, meses, etc.).

Pueden administrarse composiciones, tales como ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, rAAV), genomas de vector y partículas víricas recombinantes, incluyendo genomas de vector, en una cantidad suficiente o eficaz a un sujeto que lo necesita. Una "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" se refiere a la cantidad que proporciona, en dosis individuales o múltiples, sola o en combinación con otra u otras composiciones (agentes terapéuticos, tales como un fármaco), tratamientos, protocolos o agentes de régimen terapéutico, una respuesta detectable de cualquier duración de tiempo (a largo o corto plazo), un resultado esperado o deseado o un beneficio para el sujeto de cualquier grado medible o detectable o durante cualquier duración de tiempo (por ejemplo, durante minutos, horas, días, meses, años, o la curación).

El experto en la materia puede determinar si la administración de una sola dosis de rAAV/vector resulta suficiente o si deben administrarse múltiples dosis de rAAV/vector. Por ejemplo, si los niveles de FIX se reducen a menos de un nivel predeterminado (por ejemplo, menos del mínimo que proporciona un beneficio terapéutico), el experto en la materia podrá determinar si resulta apropiado administrar dosis adicionales de rAAV/vector.

La dosis para conseguir un efecto terapéutico, por ejemplo, la dosis en genomas de vector/por kilogramo de peso corporal (gv/kg), variará según varios factores, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos: la vía de administración, el nivel de expresión de polinucleótido heterólogo requerido para conseguir un efecto terapéutico, la enfermedad específica bajo tratamiento, cualquier respuesta inmunitaria del hospedador al vector vírico, la respuesta inmunitaria del hospedador al polinucleótido o producto de expresión (proteína) heterólogo, y la estabilidad de la proteína expresada. El experto en la materia podrá determinar un intervalo de dosis de genoma de rAAV/vector para el tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad o trastorno particular, basándose en los factores anteriormente mencionados, así como otros factores. Generalmente, las dosis estarán comprendidas entre por lo menos 1×10^8 , o más, por ejemplo 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} o 1×10^{14} o más, genoma de vector por kilogramo (gv/kg) de peso del sujeto, para conseguir un efecto terapéutico.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV, incluyendo, por ejemplo, AAV-FIX39-Padua, o una que presente la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, puede ser una que sea suficiente, administrada a un sujeto, por ejemplo un ser humano, con hemofilia B u otra deficiencia de actividad de factor IX, para convertir la hemofilia B grave en hemofilia B moderada o leve, o incluso dar como resultado un estado aparentemente libre de enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que resulte suficiente para permitir que un sujeto humano con hemofilia B evite por completo la terapia de reemplazo de factor IX, o para reducir la frecuencia con la que se administra el reemplazo de FIX para mantener una hemostasis adecuada. Tal como apreciará el experto en la materia, la terapia de reemplazo de factor es el estándar de cuidado actual para la hemofilia B, aunque requiere inyecciones frecuentes de factor IX humano producido recombinantemente para compensar la incapacidad del paciente de producir niveles suficientes de factor de coagulación funcional.

Está generalmente aceptado que la hemofilia B grave se caracteriza por hemorragias frecuentes (por ejemplo, por lo menos una o dos veces a la semana), con frecuencia espontáneas (sin traumatismo previo), en los músculos o articulaciones del sujeto. Se asocia a hemofilia B grave una actividad de FIX inferior a 1 % de la observada en seres humanos sanos. Está generalmente aceptado que los sujetos humanos con hemofilia B moderada sangran menos frecuentemente que los que presentan hemofilia B grave, por ejemplo, aproximadamente una vez al mes, aunque sangrará durante más tiempo de lo normal después de cirugía, un traumatismo o trabajo odontológico. Está generalmente aceptado que los sujetos humanos con enfermedad moderada no sangran con frecuencia de manera espontánea. Se asocia a hemofilia B moderada una actividad de FIX de entre 1 % y 5 % de la normal. Generalmente, los sujetos humanos con hemofilia B leve sangran en exceso, si sangran, solo como consecuencia de cirugía o traumatismo mayor. Generalmente, la hemofilia leve se asocia a 6 % a 40 % de la actividad normal de FIX. Generalmente, los individuos considerados sanos, sin síntomas de hemofilia B, presentan un intervalo de entre aproximadamente 50 % y 150 % de la actividad normal de FIX. Puede encontrarse información adicional en Fijnvandraat et al., *Diagnosis and management of hemophilia*. Br. Med. J., 344:36-40 (2012).

La actividad del factor IX puede medirse de una diversidad de maneras conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, un ensayo no limitativo de ejemplo es el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) en una etapa para determinar la actividad de coagulación de FIX en una muestra de plasma obtenida de un sujeto. La actividad de FIX con frecuencia se expresa en unidades internacionales (UI), en las que 1 UI se define como la actividad de coagulación de FIX presente en 1 ml de plasma agrupado procedente de donantes normales. Aplicando esta convención, la hemofilia B grave se asocia a niveles de FIX inferiores a 0.01 UI/ml, la enfermedad moderada se asocia a niveles de FIX de 0.02 a 0.05 UI/ml, la enfermedad moderada se asocia a niveles de FIX de 0.06 a 0.40 UI/ml y la ausencia de enfermedad se asocia a niveles de FIX de 0.50 a 1.50 UI/ml.

Tal como apreciará el experto en la materia, una variante de factor IX, tal como la variante natural FIX Padua, que presenta una actividad catalítica más alta que la de FIX humano de tipo salvaje, puede producir un nivel dado de actividad de FIX (por ejemplo, 1 UI/ml) a una concentración más baja de proteína activa que FIX "no Padua".

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV, incluyendo, por ejemplo, AAV-FIX39-Padua, o uno que presente la misma cápside y una secuencia de genoma por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, puede ser una que resulte suficiente, administrada en el sujeto, por ejemplo un ser humano con hemofilia B grave, moderada o leve, para alcanzar una actividad de FIX en plasma que sea aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 % o 50 %, o superior, de la actividad de FIX normal. Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser una que consiga una actividad de FIX de 1 % o superior en un sujeto que de otro modo carecería de dicha actividad, por ejemplo, una actividad de FIX en el sujeto entre 1.5 % y 10 %, entre 10 % y 15 %, entre 15 % y 20 %, entre 20 % y 25 %, entre 25 % y 30 % o superior.

Con respecto al tratamiento de un sujeto con hemofilia B, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV incluyendo, por ejemplo, AAV-FIX39-Padua, o uno que presente la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 98 % o 99 % idéntica a la misma, puede presentar por lo menos 1×10^{10} genomas de vector (gv) por kilogramo (gv/kg) de peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{10} y 1×10^{11} gv/kg de peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{11} y 1×10^{12} gv/kg (p. ej., entre aproximadamente 1×10^{11} y 2×10^{11} gv/kg o entre aproximadamente 2×10^{11} y 3×10^{11} gv/kg o entre aproximadamente 3×10^{11} y 4×10^{11} gv/kg o entre aproximadamente 4×10^{11} y 5×10^{11} gv/kg o entre aproximadamente 5×10^{11} y 6×10^{11} gv/kg o entre aproximadamente 6×10^{11} y 7×10^{11} gv/kg o entre aproximadamente 7×10^{11} y 8×10^{11} gv/kg o entre aproximadamente 8×10^{11} y 9×10^{11} gv/kg o entre aproximadamente 9×10^{11} y 1×10^{12} gv/kg) del peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{12} y 1×10^{13} gv/kg del peso del sujeto para conseguir un efecto terapéutico deseado. Las dosis adicionales pueden estar comprendidas en un intervalo de entre aproximadamente 5×10^{10} y 1×10^{10} genomas de vector (gv) por kilogramo (gv/kg) de peso del sujeto o en un intervalo de entre aproximadamente 1×10^{10} y 5×10^{11} gv/kg de peso del sujeto, o en un intervalo de entre aproximadamente 5×10^{11} y 1×10^{12} gv/kg de peso del sujeto, o en un intervalo de aproximadamente 1×10^{12} y 5×10^{13} gv/kg de peso del sujeto, y conseguir un efecto terapéutico deseado. Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser de aproximadamente 2.0×10^{11} gv/kg, 2.1×10^{11} gv/kg, 2.2×10^{11} gv/kg, 2.3×10^{11} gv/kg, 2.4×10^{11} gv/kg, 2.5×10^{11} gv/kg, 2.6×10^{11} gv/kg, 2.7×10^{11} gv/kg, 2.8×10^{11} gv/kg, 2.9×10^{11} gv/kg, 3.0×10^{11} gv/kg, 3.1×10^{11} gv/kg, 3.2×10^{11} gv/kg, 3.3×10^{11} gv/kg, 3.4×10^{11} gv/kg, 3.5×10^{11} gv/kg, 3.6×10^{11} gv/kg, 3.7×10^{11} gv/kg, 3.8×10^{11} gv/kg, 3.9×10^{11} gv/kg, 4.0×10^{11} gv/kg, 4.1×10^{11} gv/kg, 4.2×10^{11} gv/kg, 4.3×10^{11} gv/kg, 4.4×10^{11} gv/kg, 4.5×10^{11} gv/kg, 4.6×10^{11} gv/kg, 4.7×10^{11} gv/kg, 4.8×10^{11} gv/kg, 4.9×10^{11} gv/kg, 5.0×10^{11} gv/kg, 5.1×10^{11} gv/kg, 5.2×10^{11} gv/kg, 5.3×10^{11} gv/kg, 5.4×10^{11} gv/kg, 5.5×10^{11} gv/kg, 5.6×10^{11} gv/kg, 5.7×10^{11} gv/kg, 5.8×10^{11} gv/kg, 5.9×10^{11} gv/kg, 6.0×10^{11} gv/kg, 6.1×10^{11} gv/kg, 6.2×10^{11} gv/kg, 6.3×10^{11} gv/kg, 6.4×10^{11} gv/kg, 6.5×10^{11} gv/kg, 6.6×10^{11} gv/kg, 6.7×10^{11} gv/kg, 6.8×10^{11} gv/kg, 6.9×10^{11} gv/kg, 7.0×10^{11} gv/kg, 7.1×10^{11} gv/kg, 7.2×10^{11} gv/kg, 7.3×10^{11} gv/kg, 7.4×10^{11} gv/kg, 7.5×10^{11} gv/kg, 7.6×10^{11} gv/kg, 7.7×10^{11} gv/kg, 7.8×10^{11} gv/kg, 7.9×10^{11} gv/kg o 8.0×10^{11} gv/kg, o alguna otra dosis. Un vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que presente la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, y puede administrarse en el sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable por sí solo o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 o alguna otra relación.

Las dosis de una "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" para el tratamiento (por ejemplo, para aliviar o para proporcionar un beneficio o mejora terapéutico) normalmente resultan eficaces para proporcionar una respuesta a uno, múltiples o todos los síntomas adversos, consecuencias o complicaciones de la enfermedad, uno o más síntomas adversos, trastornos, enfermedades, patologías o complicaciones, por ejemplo, causados o asociados a la enfermedad, en un grado medible, aunque la disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación o control de la progresión o agravamiento de la enfermedad es un resultado satisfactorio.

Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente pueden, aunque no necesariamente, proporcionarse en una única administración; puede requerir múltiples administraciones y puede, aunque no necesariamente, administrarse sola o en combinación con otra composición (por ejemplo, agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico. Por ejemplo, la cantidad puede incrementarse proporcionalmente según indique la necesidad del sujeto, tipo, estado o gravedad de la enfermedad tratada, o los efectos secundarios (si existen) del tratamiento. Además, la cantidad eficaz o la cantidad suficiente podría no resultar eficaz o suficiente si se proporciona en una dosis única o en múltiples dosis sin una segunda composición (por ejemplo, otro fármaco o agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico, ya que pueden incluirse dosis adicionales, cantidades o una duración superiores a dichas dosis, o composiciones adicionales (por ejemplo, fármacos o agentes), tratamientos, protocolos o regímenes terapéuticos, con el fin de que se considere eficaz o suficiente en un sujeto dado. Las cantidades consideradas eficaces asimismo incluyen cantidades que resultan en la reducción del uso de otro tratamiento, régimen o protocolo terapéutico, tal como la administración de proteína factor de coagulación recombinante para el tratamiento de un trastorno hemorrágico (por ejemplo, hemofilia A o B).

La cantidad eficaz o la cantidad suficiente no es necesariamente eficaz en todos y cada uno de los sujetos tratados, ni en una mayoría de sujetos tratados en un grupo o población dado. Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente se refiere a la eficacia o suficiencia en un sujeto particular, no a un grupo o a la población general. Normalmente en dichos métodos algunos sujetos mostrarán una mayor respuesta, o menos respuesta o ninguna en absoluto al método o uso de tratamiento proporcionado.

El término "aliviar" se refiere a una mejora detectable o medible en la enfermedad o síntoma de un sujeto, o en una respuesta celular subyacente. Una mejora detectable o medible incluye una disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación o un control subjetivo u objetivo en la ocurrencia, frecuencia, gravedad, progresión o duración de la enfermedad, o de una complicación causada o asociada a la enfermedad, o una mejora de un síntoma o de una causa subyacente o de una consecuencia de la enfermedad, o la reversión de la enfermedad.

De esta manera, un resultado de tratamiento satisfactorio puede llevar a un "efecto terapéutico" o "beneficio" de disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación, control o prevención de la ocurrencia, frecuencia, gravedad, progresión o duración de una enfermedad, o uno o más síntomas adversos o causas o consecuencias subyacentes de la enfermedad en un sujeto. Por lo tanto, los métodos y utilizaciones de tratamiento que afectan a una o más causas subyacentes de la enfermedad o síntomas adversos se considera que son beneficiosos. Una disminución o reducción del agravamiento, tal como la estabilización de la enfermedad, o de un síntoma adverso de la misma, asimismo es un resultado de tratamiento satisfactorio.

Por lo tanto, un beneficio o mejora terapéutico no es necesariamente la eliminación completa de la enfermedad, o cualquiera, la mayoría o la totalidad de los síntomas adversos, complicaciones, consecuencias o causas subyacentes asociada a la enfermedad. De esta manera, se consigue un punto final satisfactorio en el caso de que se produzca una mejora gradual en la enfermedad del sujeto, o una disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación, control o prevención parcial en la ocurrencia, frecuencia, gravedad, progresión o duración, o la inhibición o reversión de la enfermedad (por ejemplo, la estabilización de uno o más síntomas o complicaciones), durante un periodo de tiempo corto o largo (horas, días, semanas, meses, etc.) La eficacia de un método o uso, tal como un tratamiento que proporciona un beneficio terapéutico potencial o mejora de una enfermedad, puede determinarse mediante diversos métodos, tales como el tiempo de formación de coágulo sanguíneo, etc.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que resulte suficiente, al administrarla en un sujeto humano con hemofilia B, para resultar en una actividad de FIX superior a un nivel determinado durante un periodo de tiempo prolongado. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX de 1 % de la normal en sujetos humanos con hemofilia B durante un periodo sostenido de por lo menos 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 1,5 años, 2 años, 2,5 años, 3 años, 3,5 años, 4 años, 4,5 años, 5 años, 5,5 años, 6 años, 6,5 años, 7 años, 7,5 años, 8 años, 8,5 años, 9 años, 9,5 años, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX de por lo menos 5 % de la norma durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o durante por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX de por lo menos 10 % de la norma durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o de por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX de por lo menos 15 % de la norma durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o durante por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una cantidad de FIX de por lo menos 20 % de la norma durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o durante por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX de por lo menos 25 % de lo normal durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o durante por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX de por lo menos 30 % de la norma durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o durante por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX de por lo menos 35 % de lo normal durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o durante por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una cantidad de FIX de por lo menos 40 % de la normal durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o durante por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. Una dosis eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX de por lo menos 45 % de lo normal durante un periodo sostenido de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 meses, o durante por lo menos 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 años o más. El vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua o un vector de AAV que presente la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, y puede administrarse en el sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 o alguna otra relación.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que resulte suficiente, administrada en el sujeto humano con hemofilia B grave o moderada, para resultar en una actividad de FIX que sea por lo menos 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, o 45 % de la normal durante un periodo sostenido de por lo menos 6 meses. La dosis de AAV-FIX39-Padua o de un vector de AAV que presenta la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, puede ser de aproximadamente $5,0 \times 10^{11}$ gv/kg, que puede administrarse en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 o alguna otra relación.

Puede observarse que en algunos sujetos humanos que han recibido una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV, incluyendo, por ejemplo, AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que presenta la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, la actividad de FIX atribuible al vector cae a lo largo de un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, meses o años) hasta un nivel que ya no se considera suficiente (por ejemplo, en el que el sujeto manifiesta síntomas y/o una característica de la actividad de FIX de la hemofilia B moderada o grave). En tales circunstancias, el sujeto puede recibir nuevamente una dosis del mismo tipo de vector de AAV como en el tratamiento inicial. Si el sujeto ha desarrollado una reacción inmunitaria al vector inicial, el paciente puede recibir una dosis de un vector de AAV diseñado para expresar FIX en las células diana pero que presente una cápside un serotipo diferente o variante que resulte menos inmunorreactivo que el primer vector de AAV.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que resulte suficiente, administrada en un sujeto humano con hemofilia B, para reducir o incluso eliminar la necesidad del sujeto de terapia de reemplazo de factor IX humano recombinante para mantener una hemostasis adecuada. De esta manera, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que pueda reducir la frecuencia con la que un sujeto humano medio que presenta hemofilia B moderada o grave necesita terapia de reemplazo de FIX para mantener una hemostasis adecuada en aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %. Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que pueda reducir la dosis de factor IX humano recombinante que necesita un sujeto humano medio que presenta hemofilia B moderada o grave para mantener una hemostasis adecuada en aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %. El vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua o un vector de AAV que presente la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, que puede administrarse al sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 o alguna otra relación.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que resulte suficiente, administrada en el sujeto humano con hemofilia B grave, para reducir o incluso eliminar el sangrado espontáneo en las articulaciones. De esta manera, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que pueda reducir la frecuencia de sangrado espontáneo en las articulaciones de un sujeto humano con hemofilia B grave en aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %, respecto al sujeto humano no tratado medio con hemofilia B grave. El sangrado en las articulaciones puede detectarse utilizando pruebas de imagen de resonancia magnética o ultrasonografía de las articulaciones, u otras técnicas que resultarán evidentes para el experto en la materia. El vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua o un vector de AAV que presente la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, y puede administrarse al sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o en alguna otra relación.

Los esfuerzos anteriores para desarrollar vectores AAV para tratar la hemofilia no han tenido éxito, por lo menos en parte, se cree, debido a una respuesta inmunitaria robusta contra la cápside de AAV en los ensayos clínicos anteriores (ver, por ejemplo, Nathwani et al., NEJM 2011;365(25):2357-2365; y Manno et al., Nat. Med. 2006;12(3):342-347). Un ensayo clínico en curso ha demostrado que los vectores AAV pueden producir un nivel elevado de actividad de FIX en sujetos humanos con hemofilia B grave, a la vez que resultan en respuestas inmunitarias nulas o mínimas hasta 6 meses después de la administración de los vectores AAV (ejemplo 5). De esta manera, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector VA puede ser una que, al administrarla en el sujeto con hemofilia B grave o moderada, da como resultado una actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasis, produciendo simultáneamente una respuesta inmunitaria nula o mínima durante un periodo de tiempo significativo. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria innata, una respuesta inmunitaria humoral o una respuesta inmunitaria celular, o incluso los tres tipos de respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede ser contra la cápside, el genoma de vector y/o la proteína factor IX producido a partir de las células transducidas.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasis en el sujeto con hemofilia B, produciendo simultáneamente una respuesta inmunitaria

humoral (es decir, de anticuerpos) nula o mínima contra la cápside, el genoma y/o la proteína factor IX producida a partir de las células transducidas. La respuesta de anticuerpos a un virus o partícula de tipo vírico, tal como vectores AAV, puede determinarse mediante la medición del título de anticuerpos en el suero o plasma del sujeto utilizando técnicas que resultarán evidentes para el experto en el campo de la inmunología. El título de anticuerpos contra cualquier componente de un vector de AAV, tal como las proteínas de cápside, o un producto génico codificado por el genoma del vector y producido en las células transducidas, tal como el factor IX Padura (u otra variante de FIX), puede medirse utilizando dichas técnicas. Los títulos de anticuerpos normalmente se expresan como una relación que indica la dilución antes de que sea detectable ninguna señal de anticuerpo en el ensayo particular que se utiliza para detectar la presencia del anticuerpo. Pueden utilizarse diferentes factores de dilución, por ejemplo, 2 veces, 5 veces, 10 veces o algún otro factor de dilución. Puede utilizarse cualquier ensayo adecuado para la presencia de un anticuerpo, por ejemplo, y sin limitación, ELISA, FACS, o un ensayo de gen informador, tal como se describe en el documento nº WO 2015/006743. Asimismo es posible la utilización de otros ensayos de acuerdo con el conocimiento del experto en la materia. Pueden medirse los títulos de anticuerpo en diferentes tiempos después de la administración inicial del vector de AAV.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede dar como resultado por lo menos 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o más actividad de FIX en sujetos con hemofilia B, a la vez que producen un título de anticuerpos contra la cápside, el genoma y/o la proteína factor IX (tal como FIX Padua) producido a partir de células transducidas que es no superior a 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 o mayor, determinado tras 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, o un periodo más prolongado después de la administración a los sujetos del vector de AAV. Un vector de AAV puede dar como resultado una actividad de FIX de por lo menos 20 % en un sujeto con hemofilia B grave, induciendo simultáneamente un título de anticuerpos contra la cápside y/o el factor IX producido por las células transducidas que no es superior a 1:2, 1:3 o 1:4, ambos 6 meses después de la administración del vector de AAV. El vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua o un vector de AAV que presenta la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, y puede administrarse al sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o en alguna otra relación.

Tal como se ha señalado anteriormente, los ensayos anteriores que utilizan la terapia génica mediada por AAV para la hemofilia B han inducido una respuesta inmunitaria autolimitada que ha evitado que la terapia resulte eficaz durante un periodo de tiempo significativo sin necesidad de dosis altas de esteroides para causar la inmunosupresión. Un factor importante aparentemente es una respuesta inmunitaria celular que elimina las células hepáticas que han sido transducidas con los vectores AAV a estudio. Este efecto era detectable tanto por la elevación de los enzimas hepáticos, que sugieren daño hepático, como por la presencia de células T específicas de cápside en los sujetos.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede dar como resultado una actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasis en un sujeto con hemofilia B, a la vez que produce una respuesta inmunitaria celular nula o mínima contra la cápside y/o la proteína factor IX producido a partir de células transducidas. Puede determinarse la respuesta inmunitaria celular de por lo menos dos maneras: el ensayo para la actividad de células T específicas para proteínas de cápside o factor IX, y el ensayo para la presencia de niveles elevados de enzimas hepáticos que indican daño en los hepatocitos.

La respuesta inmunitaria celular puede determinarse mediante el ensayo para actividad de células T específica para proteínas de cápside y/o la proteína factor IX producida por las células hepáticas transducidas. Son conocidas en la materia diferentes ensayos para la respuesta de células T. Puede determinarse una respuesta de células T mediante la recolección de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) de un sujeto que ha sido tratado previamente con un vector de AAV para el tratamiento de la hemofilia B. A continuación, se incuban las células con péptidos derivados de la proteína de cápside VP1 utilizada en el vector, y/o la proteína factor IX, tal como FIX Padura, producida por las células hepáticas transducidas. Las células T que reconocen específicamente la proteína de cápside o la proteína factor IX resultarán estimuladas para liberar citocinas, tales como interferón gamma u otra citocina, que a continuación puede ser detectada y cuantificada utilizando el ensayo ELISPOT, u otro ensayo que resultará evidente para el experto en la materia (ver, por ejemplo, Manno et al., Nat. Med. 2006;12(3):342-347). Puede realizarse un seguimiento de la respuesta de células T antes y en diferentes tiempos después de que el sujeto haya recibido una dosis de un vector de AAV para el tratamiento de la hemofilia B, por ejemplo, semanalmente, mensualmente o algún otro intervalo. De esta manera, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX a adecuada para mantener la hemostasis en el sujeto con hemofilia B (por ejemplo, una actividad de FIX de por lo menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o superior), a la vez que causa una respuesta de células T medida utilizando ELISPOT que no es superior a 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 o más unidades formadoras de mancha por 1 millón de PBMC sometidas a ensayo al medirlas semanalmente, mensualmente o en algún otro intervalo después de la administración del vector de AAV, o tras 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años

o algún tiempo diferente después de la administración del vector de AAV. El ensayo ELISPOT puede estar diseñado para detectar la producción de interferón gamma (o alguna otra citocina) estimulada por péptidos de la proteína de cápside del vector de AAV o de la proteína factor IX (incluyendo FIX Padua, o una variante diferente) producidos por las células hepáticas transducidas. El vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua o un vector de AAV que presenta la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, y puede administrarse al sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o en alguna otra relación.

Como sustituto de la respuesta inmunitaria celular contra los hepatocitos transducidos, puede someterse a ensayo para la presencia de una cantidad de enzimas hepáticas mayor a la normal, utilizando métodos estándares. Aunque sin respaldo teórico, se cree que las células T específicas para determinados vectores AAV, tales como los utilizados en ensayos clínicos anteriores, pueden atacar y eliminar los hepatocitos transducidos, que liberan transitoriamente enzimas hepáticas a la circulación. Entre los enzimas hepáticos de ejemplos se incluyen la alanina aminotransferasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST) y la lactato deshidrogenasa (LDH), aunque asimismo puede realizarse un seguimiento de otros enzimas indicativos de daño hepático. Un nivel normal de dichos enzimas en la circulación se define típicamente como un intervalo que presenta un nivel superior sobre el que el nivel enzimático se considera elevado, y por lo tanto indicativo de daño hepático. Un intervalo normal depende en parte de los patrones utilizados por el laboratorio clínico que lleva a cabo el ensayo. Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede resultar en una actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasis en un sujeto con hemofilia B (por ejemplo, una actividad de FIX de por lo menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o superior), causando simultáneamente un nivel circulante elevado de enzimas hepáticas, tal como de ALT, AST o LDH, que no es superior a 0 %, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1500%, 2000% del valor del límite superior de la normalidad (LSN) de sus intervalos respectivos, de media, o al nivel máximo medido en múltiples muestras extraídas del mismo sujeto bajo tratamiento en diferentes tiempos (por ejemplo, a intervalos semanales o mensuales) tras la administración del vector de AAV. El vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que presente la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, y puede administrarse en el sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o alguna otra relación.

En ensayos clínicos anteriores utilizando vectores AAV para tratar la hemofilia B, los investigadores han necesitado coadministrar un fármaco inmunosupresor, tal como un esteroide, para evitar que los sujetos que reciben el tratamiento monten una respuesta inmunitaria que eliminaría las células transducidas que producen la proteína factor IX. Debido a la respuesta inmunitaria atenuada que se ha observado en sujetos sometidos a tratamiento experimental con determinados vectores AAV, sin embargo, la coadministración de fármacos inmunosupresores podría no ser necesaria. De esta manera, una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede ser una que resulte suficiente para mantener una hemostasis adecuada en el sujeto con hemofilia B grave o moderada, sin necesidad de la coadministración (antes, simultáneamente o después) de un fármaco inmunosupresor (tal como un esteroide, u otro inmunosupresor). Sin embargo, debido a que la respuesta inmunitaria no es predecible en todos los sujetos, los métodos en la presente memoria de tratamiento de la hemofilia B incluyen vectores AAV que se coadministran con un fármaco inmunosupresor. La coadministración de un fármaco inmunosupresor puede ocurrir antes, simultáneamente o después de la administración de los vectores AAV al sujeto que presenta hemofilia B. Puede administrarse un fármaco inmunosupresor al sujeto durante un periodo de días, semanas o meses después de recibir la administración de un vector de AAV para el tratamiento de la hemofilia B. Entre los fármacos inmunosupresores de ejemplo se incluyen esteroides (por ejemplo, aunque sin limitación, prednisona o prednisolona) e inmunosupresores no esteroideos, tales como ciclosporina, rapamicina y otros. Las dosis de fármaco y el curso temporal de tratamiento que resultan necesarios para producir una inmunosupresión suficiente dependerán de factores únicos a cada sujeto sometido a tratamiento, aunque la determinación de la dosis y el tiempo de tratamiento se encuentran comprendidos dentro de los conocimientos del experto ordinario en la materia. Podría requerirse la administración de un inmunosupresor en más de una ocasión.

Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV puede resultar en una elevación consistente de la actividad de FIX al administrarla a una población de sujetos humanos con hemofilia B grave o moderada. La consistencia puede determinarse mediante el cálculo de la variabilidad de la respuesta en una población de sujetos humanos utilizando métodos estadísticos tales como la media y la desviación estándar (DE), u otra técnica estadística evidente para el experto en la materia. Una dosis terapéuticamente eficaz de un vector de AAV, administrada a una población de sujetos humanos con hemofilia B grave o moderada puede resultar, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 21 meses o 21 meses después de la administración, en una actividad de FIX media de 1 % a 5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 2.5 % a 7.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 5 % a 10 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 7.5 % a 12.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 10 % a 15 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 12.5 % a 17.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 15 % a 20 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de

FIX media de 17.5 % a 22.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 20 % a 25 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 22.5 % a 27.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 25 % a 30 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 27.5 % a 32.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 30 % a 35 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 32.5 % a 37.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 35 % a 40 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 37.5 % a 42.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 40 % a 45 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 42.5 % a 47.5 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1; una actividad de FIX media de 45 % a 50 % con una DE inferior a 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1. El vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que presente la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, y puede administrarse al sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 o alguna otra relación.

Los métodos y las utilizaciones descritos en la presente memoria pueden combinarse con cualquier compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen o protocolo terapéutico que presente una actividad o efecto terapéutico deseado, beneficioso, aditivo, sinérgico o complementario. Entre las composiciones y tratamientos de combinación de ejemplo se incluyen segundos activos, tales como compuestos biológicos (proteínas), agentes y fármacos. Dichos compuestos biológicos (proteínas), agentes, fármacos, tratamientos y terapias pueden administrarse o llevarse a cabo antes, de manera sustancialmente simultánea o después de cualquier método o uso de la invención, por ejemplo, un método terapéutico de tratamiento de un sujeto para una enfermedad de la coagulación sanguínea.

El compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen o protocolo terapéutico puede administrarse en forma de una composición de combinación, o administrarse por separado, tal como el suministro o la administración concurrentemente o en serie, o secuencialmente (antes o después), de un ácido nucleico, vector, vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genoma de vector o partícula vírica recombinante. Por lo tanto, la invención proporciona combinaciones en las que un método o uso de la invención se encuentra en una combinación con cualquier compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, procedimiento, remedio o composición, indicado o conocido por el experto en la materia. El compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, procedimiento, remedio o composición puede administrarse o llevarse a cabo antes, de manera sustancialmente simultánea o después de la administración de un ácido nucleico, vector, vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genoma de vector o partícula vírica recombinante de la invención, en un sujeto.

Una composición de combinación puede incluir uno o más agentes inmunosupresores. Un método puede incluir la administración o entrega de uno o más agentes inmunosupresores en el mamífero. La composición de combinación puede incluir partículas de AAV-FIX y uno o más agentes inmunosupresores. Un método puede incluir la administración o entrega de partículas de AAV-FIX en un mamífero y la administración de un agente inmunosupresor al mamífero. El experto en la materia puede determinar la necesidad o tiempos apropiados de dicha composición de combinación con uno o más agentes inmunosupresores y la administración del agente inmunosupresor al mamífero.

Entre los métodos y utilizaciones se incluyen, además, entre otras cosas, métodos y utilizaciones que resultan en una necesidad o uso reducido de otro compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, procedimiento o remedio. Por ejemplo, para una enfermedad de la coagulación sanguínea, un método o una utilización presenta un beneficio terapéutico si en un sujeto dado se consigue una dosis menos frecuente o reducida o la eliminación de la administración de una proteína de factor de coagulación recombinante para suplementar el factor de coagulación endógeno deficiente o defectuoso (anormal o mutante) en el sujeto. De esta manera, se describen métodos y utilizaciones de reducción de la necesidad o uso de otro tratamiento o terapia.

La invención resulta útil en animales, incluyendo el ser humano, y en aplicaciones médicas veterinarias. Por lo tanto, entre los sujetos adecuados se incluyen mamíferos, tales como seres humanos, así como mamíferos no humanos. El término "sujeto" se refiere a un animal, normalmente un mamífero, tal como seres humanos, primates no humanos (simios, gibones, gorilas, chimpancés, orangutanes y macacos), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (aves de corral, tales como pollos y patos; caballos, vacas, cabras, ovejas y cerdos) y animales experimentales (ratón, rata, conejo y cobaya). Entre los sujetos humanos se incluyen sujetos fetales, neonatales, infantiles, juveniles y adultos. Entre los sujetos se incluyen modelos de enfermedad animal, por ejemplo, ratones y otros modelos animales de enfermedades de la coagulación sanguínea y otros conocidos por el experto en la materia.

Entre los sujetos apropiados para el tratamiento se incluyen aquellos que presentan o están en riesgo de producir una cantidad insuficiente o que presentan una deficiencia en un producto génico (proteína) funcional, o que producen un producto génico (proteína) aberrante, parcialmente funcional o no funcional, que puede conducir a

una enfermedad. Los sujetos apropiados para el tratamiento según la invención incluyen, además, aquellos que presentan o están en riesgo de producir un producto génico (proteína) aberrante o defectuoso (mutante) que conduce a una enfermedad, de manera que la reducción de las cantidades, expresión o función del producto génico (proteína) aberrante o defectuoso (mutante) conduciría al tratamiento de la enfermedad, o reduciría uno o más síntomas o aliviaría la enfermedad. Por lo tanto, entre los sujetos diana se incluyen sujetos que presentan una producción de factor de coagulación sanguínea aberrante, insuficiente o ausente, tal como los hemofílicos (por ejemplo, de hemofilia B).

Entre los sujetos apropiados para el tratamiento según la invención se incluyen, además, los tratados anteriormente o actualmente con proteína suplementaria (por ejemplo, factor de coagulación sanguínea recombinante, tal como FIX, para tratar la hemofilia). Entre los sujetos apropiados para el tratamiento según la invención se incluyen, además, aquellos que no han desarrollado una respuesta inmunitaria sustancial o detectable contra la proteína FIX, o cantidades de anticuerpos inhibidores contra la proteína FIX que interferirían o bloquearían la terapia génica basada en FIX.

Los sujetos pediátricos humanos que se ha determinado que presentan hemofilia B (por ejemplo, mediante genotipado) pero que todavía no han manifestado ninguno de los síntomas de la hemofilia B, pueden ser tratados profilácticamente con un vector de AAV para prevenir que ocurra cualquiera de dichos síntomas en absoluto o para prevenir que sean tan graves como serían en ausencia de tratamiento. Los sujetos humanos tratados profilácticamente de esta manera pueden ser de por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses de edad, o más, cuando se administra un vector de AAV para producir y mantener una actividad de FIX adecuada para mantener la hemostasis, y de esta manera, prevenir o reducir la gravedad de uno o más síntomas de hemofilia B. El vector de AAV puede ser AAV-FIX39-Padua, o un vector de AAV que presenta la misma cápside y una secuencia genómica por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma, y puede administrarse al sujeto en una composición farmacéuticamente aceptable, por sí sola o con cápsides vacías del mismo tipo de cápside en una relación de vacías a vector de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 o alguna otra relación.

La administración o el suministro *in vivo* en un sujeto puede llevarse a cabo antes del desarrollo de un síntoma adverso, afección, complicación, etc. causado o asociado a la enfermedad. Por ejemplo, puede utilizarse un cribado (por ejemplo, genético) para identificar dichos sujetos como candidatos para composiciones, métodos y utilizaciones de la invención. Por lo tanto, dichos sujetos incluyen los cribados como positivos para una cantidad insuficiente o una deficiencia en un producto génico (proteína) funcional, o que producen un producto génico (proteína) aberrante, parcialmente funcional o no funcional.

Entre los métodos y utilizaciones descritos en la presente memoria se incluyen el suministro y la administración sistémica, regional o local, o por cualquier vía, por ejemplo, mediante inyección o infusión. Dichos suministro y administración incluye la vía parenteral, por ejemplo, intravascular, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o transmucosa. Entre las vías de administración y suministro ejemplificativas se incluyen las vías intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intraarterial, subcutánea, intrapleurales, la intubación, intrapulmonar, intracavitaria, iontoforética, intraórgano e intralinfática.

Alternativa o adicionalmente, el vector de AAV puede suministrarse en el hígado mediante la vena porta. Puede utilizarse un catéter introducido en la arteria femoral para suministrar vectores AAV al hígado mediante la arteria hepática. Asimismo pueden utilizarse medios no quirúrgicos, tales como la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) para suministrar vectores AAV directamente al hígado, evitando de esta manera el torrente sanguíneo y los anticuerpos neutralizantes de AAV. Asimismo pueden utilizarse otros sistemas ductales, tales como los conductos de la glándula submandibular, como portales para el suministro de vectores AAV en un sujeto que desarrolla o posee anticuerpos antiAAV preexistentes.

Las dosis pueden variar y dependen del tipo, inicio, progresión, gravedad, frecuencia, duración o probabilidad de la enfermedad que es el objetivo del tratamiento, el resultado clínico deseado, los tratamientos previos o simultáneos, el estado general de salud, la edad, género, raza o competencia inmunitaria del sujeto, y otros factores que apreciará el experto en la materia. La cantidad, número, frecuencia o duración de las dosis se incrementará o reducirá proporcionalmente, según indique cualesquiera efectos secundarios adversos, complicaciones u otros factores de riesgo del tratamiento o terapia, y el estado del sujeto. El experto en la materia apreciará los factores que pueden incluir en la dosis y tiempos requeridos para proporcionar una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico.

Los métodos y utilizaciones de la invención tal como se dan a conocer en la presente memoria pueden ponerse en práctica 1 a 2, 2 a 4, 4 a 12, 12 a 24 o 24 a 72 horas después de identificar que el sujeto presenta la enfermedad diana del tratamiento, que presenta uno o más síntomas de la enfermedad o que se ha cribado e identificado como positivo tal como se indica en la presente memoria, aunque el sujeto no presente uno o más síntomas de la enfermedad. Evidentemente pueden ponerse en práctica métodos y utilizaciones de la invención 1 a 7, 7 a 14, 14 a 21, 21 a 48 o más días, meses o años después de identificar que el sujeto presenta la enfermedad diana del

tratamiento, que presenta uno o más síntomas de la enfermedad o que se ha cribado y se ha identificado como positivo tal como se indica en la presente memoria.

5 Pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, rAAV), genomas de vector y partículas víricas recombinantes y otras composiciones, agentes, fármacos y compuestos biológicos (proteínas). Dichas composiciones farmacéuticas resultan útiles para, entre otras cosas, la administración y el suministro en el sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “farmacéuticamente aceptable” y “fisiológicamente aceptable” significan una formulación biológicamente aceptable, gaseosa, líquida o sólida, o una mezcla de la misma, que resulta adecuada para una o más vías de administración, o el suministro o contacto *in vivo*. Una composición “farmacéuticamente aceptable” o “fisiológicamente aceptable” es un material que no resulta biológicamente o de otro modo no deseable, por ejemplo, el material puede administrarse en el sujeto sin causar
15 efectos biológicos no deseables sustanciales. De esta manera, puede utilizarse dicha composición farmacéutica, por ejemplo para administrar un vector vírico o partícula vírica en un sujeto.

Entre dichas composiciones se incluyen solventes (acuosos o no acuosos), soluciones (acuosas o no acuosas), emulsiones (por ejemplo, de aceite en agua o de agua en aceite), suspensiones, jarabes, elixires, medios de dispersión y suspensión, recubrimientos, agentes isotónicos y de promoción o retardo de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica o el contacto o suministro *in vivo*. Entre los solventes, soluciones y suspensiones acuosos y no acuosos pueden incluirse agentes de suspensión y agentes espesantes. Entre dichos portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen comprimidos (recubiertos o no recubiertos), cápsulas (duras o blandas), microperlas, polvos, gránulos y cristales. Asimismo pueden incorporarse compuestos activos
25 suplementarios (por ejemplo, conservantes, o agentes antibacterianos, antivíricos y antifúngicos) en las composiciones.

Pueden formularse composiciones farmacéuticas para que sean compatibles con una vía de administración o suministro particular, tal como se indica en la presente memoria o conocida por el experto en la materia. De esta
30 manera, entre las composiciones farmacéuticas se incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por diversas vías.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas y no acuosas del compuesto activo, cuyas preparaciones habitualmente son estériles y pueden ser isotónicas con la sangre del receptor deseado. Entre los ejemplos ilustrativos no limitativos se incluyen agua, solución salina, dextrosa, fructosa, etanol, y aceites animales, vegetales o sintéticos.
35

Pueden añadirse cosolventes y adyuvantes a la formulación. Los ejemplos no limitativos de cosolventes contienen grupos hidroxilo u otros grupos polares, por ejemplo, alcoholes, tales como alcohol isopropílico; glicoles, tales como propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, éter de glicol, glicerol; alcoholes de polioxietileno y ésteres de polioxietilén-ácido graso. Entre los adyuvantes se incluyen, por ejemplo, tensioactivos, tales como, lecitina de soja y ácido oleico; ésteres de sorbitán, tales como trioleato de sorbitán, y polivinilpirrolidona.
40

Las composiciones y sistemas de suministro farmacéuticos apropiados para las composiciones, métodos y utilizaciones descritos en la presente memoria son conocidos en la materia (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003), 20a edición, Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), 18a edición, Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12a edición, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel y Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001), 11a edición, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, y Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., páginas 253 a 315).
45
50

Una “forma de dosis unitaria” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas que resultan adecuadas como dosis unitarias para el sujeto que va a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada opcionalmente en asociación con un portador farmacéutico (excipiente, diluyente, vehículo o agente de relleno) que, al administrarlo en una o más dosis, se calcula para producir un efecto deseado (por ejemplo, un efecto profiláctico o terapéutico). Las formas de dosis unitaria pueden encontrarse dentro de, por ejemplo, ampollas y viales, que pueden incluir una composición líquida, o una composición en un estado secado por congelación o liofilizado; puede añadirse un portador líquido estéril, por ejemplo, antes de la administración o suministro *in vivo*. Las formas de dosis unitaria individuales pueden incluirse en kits o recipientes multidosis. Las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, rAAV), genomas de vector, partículas víricas recombinantes y composiciones farmacéuticas de los mismos, pueden empaquetarse en una forma de dosis unitaria individual o múltiple para facilitar la administración y la uniformidad de las dosis.
55
60

Asimismo están descritos, aunque no comprendidos en la invención reivindicada, kits con material de empaquetamiento y uno o más componentes en el mismo. Un kit normalmente incluye una etiqueta o impreso en
65

el paquete que incluye una descripción de los componentes o instrucciones para la utilización *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, de los componentes en el mismo. Un kit puede contener una colección de dichos componentes, por ejemplo, un ácido nucleico, vector recombinante, vector vírico (por ejemplo, AAV), genoma de vector o partícula vírica, y opcionalmente un segundo activo, tal como otro compuesto, agente, fármaco o composición.

Un kit se refiere a una estructura física que aloja uno o más componentes del kit. El material de empaquetamiento puede mantener los componentes en estado estéril, y puede estar realizado en un material utilizado comúnmente para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, viales, tubos, etc.).

Las etiquetas o impresos pueden incluir información de uno o más componentes en ellos, cantidades de dosis, farmacología clínica del principio o principios activos, incluyendo el mecanismo de acción, la farmacocinética y la farmacodinámica. Las etiquetas o impresos pueden incluir información que identifica el fabricante, los números de lote, el centro y fecha de fabricación, y fechas de caducidad. Las etiquetas o impresos pueden incluir información que identifica información del fabricante, números de lote, y centro y fecha del fabricante. Las etiquetas o impresos pueden incluir información sobre la enfermedad para la que puede utilizarse un componente del kit. Las etiquetas o impresos pueden incluir instrucciones para el médico clínico o sujeto para la utilización de uno o más de los componentes del kit en un método, uso o protocolo de tratamiento o régimen terapéutico. Las instrucciones pueden incluir cantidades de dosis, frecuencia o duración, e instrucciones para la puesta en práctica de cualquiera de los métodos, usos, protocolos de tratamiento, o regímenes profilácticos o terapéuticos descritos en la presente memoria.

Las etiquetas o impresos pueden incluir información sobre cualquier beneficio que pueda proporcionar un componente, tal como un beneficio profiláctico o terapéutico. Las etiquetas o impresos pueden incluir información sobre posibles efectos secundarios adversos, complicaciones o reacciones, tales como advertencias al sujeto o médico clínico con respecto a situaciones en las que no resultaría apropiado utilizar una composición particular. Los efectos secundarios adversos o complicaciones asimismo podrían ocurrir cuando el sujeto ha tomado, tomará o está tomando actualmente otro u otros medicamentos que podrían ser incompatibles con la composición, o el sujeto se ha sometido, se someterá o está actualmente bajo otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico que podría ser incompatible con la composición y, por lo tanto, las instrucciones podrían incluir información sobre dichas incompatibilidades.

Las etiquetas o impresos incluyen "material impreso", por ejemplo, papel o cartón, o por separado o fijado a un componente, un kit o material de empaquetamiento (por ejemplo, una caja), o unido a una ampolla, tubo o vial que contiene un componente del kit. Las etiquetas o impresos pueden incluir adicionalmente un medio legible por ordenador, tal como una etiqueta con la impresión de un código de barras, un disco, disco óptico, tal como CD- o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, cinta magnética o un medio de almacenamiento eléctrico, tal como RAM y ROM o híbridos de los mismos, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico, medios FLASH o tarjetas de tipo memoria.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científico utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, en la práctica o ensayo de la presente invención, en la presente memoria se describen métodos y materiales adecuados.

En caso de conflicto, prevalece la memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un" o "una" y "el" o "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un ácido nucleico" incluye una pluralidad de dichos ácidos nucleicos, la referencia a "un vector" incluye una pluralidad de dichos vectores, y la referencia a "un virus" o "partícula" incluye una pluralidad de dichos viriones/partículas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen números enteros comprendidos dentro de dichos intervalos y fracciones de los valores o los números enteros comprendidos en los intervalos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, a título ilustrativo, la referencia a 80 % o más de identidad, incluye 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % etc., así como 81.1 %, 81.2 %, 81.3 %, 81.4 %, 81.5 %, etc., 82.1 %, 82.2 %, 82.3 %, 82.4 %, 82.5 %, etc.

La referencia a un número entero con más de (superior a) o menos de incluye cualquier número mayor o menor que el número de referencia, respectivamente. De esta manera, por ejemplo, la referencia a menos que 100, incluye 99, 98, 97, etc. bajando hasta el número uno (1), y menos de 10, incluye 9, 8, 7, etc. bajando hasta el número 1 (1).

Tal como se utiliza en la presente memoria, todos los valores o intervalos numéricos incluyen fracciones de los valores y número enteros dentro de dichos intervalos y fracciones de los números enteros dentro de dichos intervalos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, a título ilustrativo, la referencia a un intervalo numérico, tal como 1 a 10, incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, así como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, etc. La referencia a un intervalo de 1 a 50, por lo tanto, incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. Hasta e incluyendo 50, así como 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, etc., 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, etc.

La referencia a una serie de intervalos incluye intervalos que combinan los valores de los límites de diferentes intervalos dentro de la serie. De esta manera, para ilustrar la referencia a una serie de intervalos, por ejemplo, 1 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 75, 75 a 100, 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 400, 400 a 500, 500 a 750, 750 a 1,000, 1,000 a 1,500, 1,500 a 2,000, 2,000 a 2,500, 2,500 a 3,000, 3,000 a 3,500, 3,500 a 4,000, 4,000 a 4,500, 4,500 a 5,000, 5,000 a 6,000, 6,000 a 7,000, 7,000 a 8,000, o 8,000 a 9,000, incluye los intervalos de 10 a 50, 50 a 100, 100 a 1,000, 1,000 a 3,000, 2,000 a 4,000, etc.

De acuerdo con lo anterior, los ejemplos siguientes pretenden ilustrar de manera no limitativa el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Diseño/preparación de vectores.

Se diseñó un nuevo ácido nucleico de factor IX que codifica una proteína factor IX humano de elevada actividad específica que presenta la variante 338L Padua (Simioni P. et al., N. Eng. J. Med. 2009, 361:1671) ("FIX 39-Padua", SEC ID nº: 10, figura 10). FIX39-Padua carece por completo de dinucleótidos CpG en la secuencia que codifica FIX y secuencias intrónicas. Para el ensayo comparativo, se preparó FIX29 (Mingozzi et al., Sci. Transl. Med. 2013) y se modificó para incluir FIX Padua, para descartar cualquier posible efecto de confusión resultante de FIX Padua ("FIX 19-Padua", SEC ID nº: 11, figura 11).

Se sintetizó un plásmido ("pAAV-ApoE_hAAT-FIX39"; 11125 pb, SEC ID nº: 12, figura 12A) e incluía el casete de expresión FIX39-Padua y los elementos indicados en la tabla 2. Se muestra un mapa de pAAV-ApoE_hAAT-FIX39 en la figura 13.

Tabla 2. pAAV-ApoE_hAAT-FIX39

ITR 5' de AAV2	SEC ID nº: 13
Intensificador (región de control hepática)	SEC ID nº: 14
Promotor hAAT	SEC ID nº: 15
5' UTR	SEC ID nº: 16
CDS de FIX39-Padua	SEC ID nº: 10 (figura 10)
Intrón A	SEC ID nº: 17 (figura 14)
3' UTR	SEC ID nº: 18
poliA	SEC ID nº: 19
ITR 3' de AAV2	SEC ID nº: 20
Stuffer lambda	SEC ID nº: 21
Origen de replicación F1	SEC ID nº: 22
Resistencia a kanamicina	SEC ID nº: 23
Origen de replicación pUC	SEC ID nº: 24

La secuencia de la secuencia que codifica (CDS) FIX39-Padua e intrón A se indica en SEC ID nº: 25 (figura 15). Asimismo se sintetizó un plásmido que incluía la CDS de FIX19-Padua y los mismos elementos reguladores, las mismas repeticiones terminales invertidas (ITR) adenoasociadas y el mismo promotor ApoE/hAAT específico de hígado que pAAV-ApoE_hAAT-FIX39.

El vector de AAV que presenta la variante de cápside 4-1 (SEC ID nº: 4) se preparó para los transgenes FIX39-Padua ("AAV-FIX39-Padua") y FIX19-Padua ("AAV-FIX19-Padua") utilizando un triple procedimiento de transfección seguido de la doble centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (Ayuso E.M. et al., Gene Ther. 2010, 17:503). Los vectores se titularon mediante PCR cuantitativa utilizando un plásmido linealizado como el patrón. Para el estudio descrito en el ejemplo 3, se diluyó el vector en PBS, sorbitol al 5 %, F68 al 0,001 % a un volumen final de 200 µl por ratón, para la inyección en la vena de la cola.

Ejemplo 2. Transducción *in vitro* de AAV variante 4-1.

Se transdujeron hepatocitos primarios de origen en macaco *Cynomolgus* y humano con la variante de cápside 4-1 (SEC ID nº: 4) que expresaba luciferasa a cuatro multiplicidades diferentes de infección (MDI) comprendidas entre 500 y 62,500 genomas de vector por célula. Setenta y dos horas después de la transducción se analizó la expresión de la luciferasa. Tal como se muestra en la figura 16, la relación de hepatocitos humanos transducidos a hepatocitos de primate no humano está comprendida entre 0.8 y 1.5, dependiendo de la MDI utilizada. Estos

datos generados *in vitro* aparentemente son consistentes con observaciones anteriores *in vivo* al comparar la expresión del factor IX de coagulación en macacos *Cynomolgus* y sujetos humanos.

Ejemplo 3. Estudio de la potencia.

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la potencia de AAV-FIX39-Padua frente a AAV-FIX29-Padua en ratones. En grupos de 5 ratones se inyectaron a las 8-10 semanas de edad 1×10^{11} o 1×10^{12} gv/kg de AAV-FIX39-Padua y AAV-FIX19-Padua. Tras la administración de vector, se recolectó la sangre mediante sangrado retroorbital utilizando tubos capilares heparinizados; se aisló el plasma mediante centrifugación a 9000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se almacenaron congelados a -80 °C hasta el ensayo.

Se utilizó el plasma recolectado para evaluar la expresión del transgén hFIX. Se midieron los niveles de FIX humano en el plasma utilizando un kit ELISA (Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Canadá).

Se midieron los niveles de actividad de FIX humano mediante ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Se llevó a cabo el ensayo de TTPa mediante la mezcla del plasma de muestra en una relación en volumen de 1:1:1 con plasma deficiente en FIX humano (George King Biomedical, Inc.) y un reactivo de TTPa (Trinity Biotech), seguido de un periodo de incubación de 180 s a 37 °C. Se inició la coagulación mediante la adición de cloruro cálcico 25 mM. Se midió el tiempo hasta la formación de coágulo utilizando un instrumento de coagulación STart 4 (Diagnostica Stago). Se generó una curva patrón con plasma normal agrupado de George King partiendo de una dilución 1:5 en TBS, pH 7.4 (48 µl + 192 µl) seguido de diluciones 1:2 en serie (120 µl + 120 µl). Se utilizó la curva patrón humana para calcular la actividad de cada muestra en la semana 17 después de la administración de vector; asimismo se midió la actividad en dos ratones no tratados. Se calculó la media de la actividad de FIX en los ratones no tratados y después se restó de las muestras tratadas para calcular la actividad adicional (es decir, humana) debido a la proteína FIX Padua.

Tal como se muestra en la figura 17, AAV-FIX39-Padua y AAV-FIX19-Padua aparentemente expresan niveles sustancialmente equivalentes de FIX.

Diecisiete semanas después de la administración de vector, se midió la actividad de FIX humano en aquellos ratones tratados con una dosis de vector de 1×10^{12} gv/kg. La relación de actividad a antígeno estaba comprendida entre 5.2 y 7.5. Con un valor medio de 6.4 para tanto el grupo de FIX19-Padua como para el grupo de FIX39-Padua (tabla 3).

Tabla 3. Valores de actividad de FIX humano.

ID de animal	Antígeno (% del nivel normal)	Actividad (% del nivel normal)	Relación
01 – FIX19	53.9	352.7	6.5
02 – FIX19	95.6	631.8	6.6
03 – FIX19	120.6	882.3	7.3
04 – FIX19	132.9	797.1	6.0
05 – FIX19	105.2	599.7	5.7
06 – FIX39	163.1	1092.8	6.7
07 – FIX39	108.2	670.3	6.2
08 – FIX39	121.1	781.2	6.4
09 – FIX39	152.3	1147.8	7.5
10 – FIX39	134.1	702.1	5.2

Media			
	Antígeno (% del nivel normal)	Actividad (% del nivel normal)	Relación
AAV-FIX19-Padua	101.7	652.7	6.4
AAV-FIX39-Padua	135.8	878.8	6.4

Aunque estos resultados sugieren que la potencia de ambos casetes de expresión es sustancialmente similar, asimismo se analizaron los dos constructos en el contexto de la inyección en la vena de la cola hidrodinámica del plásmido. La justificación de la evaluación de los niveles de FIX derivados de la administración *in vivo* de ADN desnudo era comparar ambos casetes de expresión sin la interferencia potencial de diferencias en la titulación de AAV, la fabricación del vector, etc.

Tal como se muestra en la figura 18, ambos casetes de expresión desnudos eran igualmente potentes en el control de la expresión de FIX, confirmando los datos obtenidos en el contexto de AAV. Estos resultados indican que los casetes de expresión FIX19-Padua y FIX39-Padua presentan una potencia similar.

Ejemplo 4. Terapia génica con AAV-FIX39-Padua.

Se está llevando a cabo un estudio clínico para determinar la seguridad y la cinética de una única infusión IV de AAV-FIX39-Padua. Se ha mostrado que la variante de cápside 4-1 de AAV en estudios preclínicos presenta una buena seguridad y eficacia, la capacidad de conseguir niveles de actividad de FIX sostenidos de ~35 % en NHP a razón de 1×10^{12} gv/kg tras tres meses de infusión de vector, y los anticuerpos (Ac) neutralizantes de reacción cruzada contra la variante de cápside 4-1 de AAV son aproximadamente 10 % menos prevalentes que para AAV8. Se proporciona el diseño del estudio en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño de estudio clínico de AAV-FIX39-Padua.

Seguridad y tolerabilidad de AAVFIX39-Padua	Clínicamente significativo en constantes vitales, valores de laboratorio y evaluaciones clínicas (incluyendo el número de sangrados y calidad de vida (CdV)) respecto al nivel basal
Cinética de AAVFIX39-Padua	Niveles de actividad de transgén de FIX y niveles de antígeno máximos y
Estado estable	
Dosis	Las cohortes de dosis inicial, intermedia y máxima incluyen, cada una, 2 a 5 sujetos
Diseño	Escalado de dosis, no aleatorizado, de etiqueta abierta
Países participantes	EE. UU. Y potencialmente Europa, Japón y Canadá
Tamaño de muestra	Hasta 15 sujetos
Elegibilidad	Edades elegibles para el estudio: 18 o más años
	Géneros elegibles para el estudio: varones
	Aceptación de voluntarios sanos: no
Criterios de inclusión	Capaz de proporcionar consentimiento informado y cumplimiento de los requisitos del estudio
	Varones ≥ 18 años con diagnóstico confirmado de hemofilia B (≤ 2 UI/dl o ≤ 2 % de factor IX endógeno)
	Recepción ≥ 50 días de exposición a productos de factor IX
	Mínimo de una media de 4 acontecimientos de sangrado al año que requiere tratamiento episódico de infusiones de factor IX o infusiones profilácticas de factor IX
	No existe inhibidor de factor IX medible según evaluación por el laboratorio central y sin antecedentes de inhibidores de proteína factor IX
	Acepta utilizar medidas anticonceptivas de barrera fiables hasta que 3 muestras consecutivas sean negativas para secuencias de vector
Criterios de exclusión	Pruebas de hepatitis B o C activa
	Actualmente bajo terapia antivírica para hepatitis B o C
	Presentan enfermedad hepática subyacente significativa
	Presenta pruebas séricas* de VIH-1 o VIH-2 con recuentos de CDR $\leq 200/\text{mm}^3$ (* sujetos que son VIH+ y estables con recuento de CDR $> 200/\text{mm}^3$ y carga vírica indetectable son elegibles para la inclusión)
	Presentan niveles de anticuerpos detectables reactivos con la cápside de AAV de variante 4-1 (SEC ID nº: 4)
	Participación en un ensayo de transferencia génica en las últimas 52 semanas o un fármaco en fase de investigación en las últimas 12 semanas
	Evaluación de incapacidad o no disposición a cumplir con el estudio
Visita de cribado	Evaluación de la elegibilidad
	Título de NAb de AAV es el fallo de selección principal (altamente recomendado remitir sujetos al protocolo de titulación de NAb de AAV de CHOP para la selección telefónica)
Visita del día 0	Recuperación gradual de producto de FIX, seguido de infusión de vector
Visitas de seguimiento (~17 visitas)	Evaluaciones de seguridad y cinéticas
Visita de finalización de estudio (en la semana 52)	Evaluación final de la seguridad

Ejemplo 5. Resultados clínicos.

Se administró una única infusión IV de vector de AAV-FIX39-Padua en cuatro sujetos con hemofilia B. Los primeros dos sujetos, de edades 23 y 18, respectivamente, no presentaban antecedentes previos de enfermedad hepática, mientras que el tercero, de 47 años, presentaba antecedentes de infección por VHC, aunque esta había remitido espontáneamente. La totalidad de los cuatro sujetos fue examinada para anticuerpos neutralizantes contra la nueva cápside de AAV y se encontró que eran negativos.

Los sujetos recibieron la infusión intravenosa de 5×10^{11} gv/kg de vector de AAV-FIX39-Padua durante un periodo de ~1 hora. El total de vector de AAV-FIX39-Padua administrado a cada sujeto se muestra en las figuras 20 a 23, que había sido combinado con la cantidad indicada de cápsides vacías de AAV.

Las figuras 19 a 23 muestran los resultados del estudio, con el vector de AAV-FIX39-Padua administrado el día 0. Los resultados muestran una producción incrementada de factor IX en la totalidad de los cuatro sujetos, tal como refleja la actividad incrementada de FIX durante todo el periodo de evaluación del estudio.

El incremento inicial de la actividad de FIX entre el día 0 y aproximadamente el día 3 se debe a la administración de 100 UI/kg de Alprolix™ o BeneFIX™, que son proteína de fusión FIX-Fc recombinante que presenta una semivida aproximada de aproximadamente 82 horas. La actividad de factor IX atribuible al vector de AAV-FIX39-Padua se inicia en aproximadamente los días 6 a 8 tras la infusión de vector de AAV.

Tal como se resume en la figura 19 y se muestra para cada sujeto individual en las figuras 20, 21A, 22A y 23A, la actividad del factor IX se incrementa gradualmente y es aparentemente estable durante la totalidad de los periodos de evaluación de 183, 102, 69 y 50 para la totalidad de los cuatro sujetos. Estos datos indican que una única infusión de 5×10^{11} gv/kg de vector de AAV-FIX39-Padua resulta en una producción y actividad de factor IX suficiente y sostenida para proporcionar a los pacientes de hemofilia B una actividad de coagulación sanguínea significativa y beneficiosa, proporcionando hemostasis.

Tal como se muestra en las figuras 19, 20A, 21A, 22A y 23A, los niveles de actividad de factor IX eran de 28 %, 41 %, 26 % y 33 % del nivel normal, para los sujetos 1 a 4, respectivamente, 183, 102, 69 y 50 días después de la infusión. El sujeto nº 3 se trató con un producto de semivida extendida para una sospecha de sangrado en el tobillo 2 días después de la infusión de vector; aparte de ello, no se produjeron infusiones de factor ni sangrados durante el periodo de evaluación.

No se administraron agentes inmunosupresores (esteroides) en ninguno de los sujetos. Además, en general no se produjeron elevaciones sostenidas de las transaminasas por encima del límite superior de la normalidad, indicando que no se habían producido efectos adversos del tratamiento (figuras 20B, 21B, 22B y 23).

Se utilizaron ensayos ELISPOT para realizar un seguimiento de las respuestas de células T a AAV y a FIX en la totalidad de los cuatro sujetos, y mostraron respuestas muy bajas o nulas. Cabe destacar que el curso temporal de elevación de los niveles de factor IX hasta un nivel de meseta ha sido notablemente consistente hasta el momento (figura 19). Unas fluctuaciones modestas de los niveles de antígeno condujeron a desplazamientos más grandes de los niveles de actividad, dado el incremento de 8 veces de la actividad específica de la variante Padua de factor IX.

Los datos publicados (Nathwani et al., N. Engl. J. Med. 371(21):1994-2004 (2014)) han mostrado la expresión a largo plazo del factor IX en varones con hemofilia B infundido con un vector de AAV8 que expresa el factor IX de tipo salvaje. Sin embargo, los niveles de expresión eran bajos (comprendidos entre 1.4 % y 2.2 % del nivel normal a la dosis más baja (2×10^{11} genomas de vector [gv]/kg de peso corporal) y 2.9 % a 7.2 % a la dosis más alta (2×10^{12} gv/kg). Además, 4/6 sujetos infundidos a la dosis más alta requirieron un curso de inmunosupresor (prednisolona) para reducir la elevación de transaminasas asociada a la dosis más alta (pero no observada a las dosis más bajas, de 2×10^{11} o 6×10^{11} gv/kg). Los datos de un estudio de historia natural de pacientes con hemofilia sugieren que los niveles circulantes de ~12 % de FIX resultan necesarios para reducir el número anual de sangrados articulares espontáneos a cero (den Uijl et al., Haemophilia 17(1):41-4 (2011)).

Estos son los primeros resultados clínicos que utilizan una nueva cápside de AAV de bioingeniería que expresa un transgén de elevada actividad específica de factor IX. Los niveles de actividad de factor IX observados en los sujetos 1 a 4, de 28 %, 41 %, 26 % y 33 % del nivel normal son niveles de factor IX circulante sustancialmente mayores que los observados en estudios anteriores, basándose en datos publicados, y exceden los niveles de factor IX circulante necesarios para reducir el número anual de sangrados articulares espontáneos a cero.

Además, se consiguieron niveles sustanciales de actividad de factor IX en el presente estudio sin uso de factor IX recombinante desde la infusión de vector y sin utilizar agentes inmunosupresores (esteroides). Estos resultados muestran que el desarrollo de un factor AAV-FIX que puede dirigir un nivel elevado de expresión de factor de coagulación a dosis bajas de administración de vector de AAV, por lo que no se requiere inmunosupresión (una

meta importante para la terapia génica centrada en el hígado). Los niveles de actividad de factor IX observados en el presente estudio se mantuvieron durante la totalidad del periodo de estudio.

Ejemplo 6. Inmunogenicidad reducida del vector de AAV-FIX39-Padua.

Para el actual estudio de fase I/II, se realizó un seguimiento de cuatro sujetos que habían recibido 5×10^{11} gv/kg de AAV-FIX39-Padua para las potenciales respuestas inmunitarias contra el vector de AAV utilizando un ensayo validado de Immunospot ligado a enzima (ELISPOT) de interferón-gamma (IFN- γ). Se sometieron a ensayo PBMC purificadas aisladas de extracciones de sangre intermedias mediante el ensayo ELISPOT de interferón gamma. Se incubó cada uno de seis conjuntos de péptidos de cápside de AAV, que contenían 24-25 péptidos, con 2×10^5 células por triplicado. Se detectaron las respuestas de células T utilizando un anticuerpo biotinilado contra IFN- γ , seguido del revelado colorimétrico y se expresa en unidades formadoras de mancha (UFM) por millón de células. El conjunto respondedor máximo en cada punto temporal se muestra en UFM/millón de células. El valor de corte utilizado históricamente para positividad era >50 UFM y control de medio de 3 veces (línea azul). Los sujetos 840-003-001, 840-001-002, 840-001-004 y 840-001-005 (representados en negro) se siguieron hasta las semanas 26, 14, 11 y 8, respectivamente. Los resultados de ELISPOT de un ensayo anterior en el que dos sujetos, CP-16 y P17, habían recibido 1×10^{12} gv/kg del vector de AAV8-FIX9 y un sujeto había recibido 2×10^{12} gv/kg de AAV8-FIX19, se muestran en rojo.

Utilizando el valor históricamente aceptado de >50 UFM y 3 veces el control de fondo (medio) como criterio para la respuesta positiva de células T, se observó una respuesta de muy reducida a nula en los tres sujetos hasta las 26 semanas después de la infusión (figura 24A). Esto contrasta marcadamente con un estudio previamente no publicado por el grupo de los presentes inventores utilizando un vector de AAV8 optimizado para los codones para suministrar el casete de transgén de FIX en los 3 sujetos, en los que se observaron respuestas de células T IFN- γ robustas ya en el punto temporal de la semana 2 (figura 24B). Otros estudios publicados anteriormente que han utilizado AAV-2 (Manno et al., 2006, Nat. Med.) y vectores autocomplementarios de AAV-8 (Nathwani et al., 2011, NEJM) asimismo han mostrado evidencia de respuestas tempranas de células T a la cápside de AAV. Cabe destacar que no se han observado en este ensayo respuestas contra el producto del transgén.

Se ha planteado la hipótesis de que la activación de una respuesta inmunitaria mediada por células T contra hepatocitos transducidos que presentan los epítomos de células T de cápside de AAV podrían desempeñar un papel en sujetos que muestran una expresión del transgén de corta duración que eventualmente se reduce a cero. Por lo tanto, el perfil de inmunogenicidad reducida del vector de AAV-FIX39-Padua representa una mejora prometedora hacia la eficacia global.

REIVINDICACIONES

1. Vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un genoma y una cápside, en el que el genoma de dicho vector de rAAV comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos no natural que codifica la proteína factor IX humano, en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica la misma proteína factor IX humano que es codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 10 y es por lo menos 85 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 10, y en el que la cápside de dicho vector de rAAV comprende una proteína VP1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4.
2. Vector de rAAV según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano es por lo menos 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 10.
3. Vector de rAAV según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha secuencia de nucleótidos no natural que codifica la proteína factor IX humano presenta un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con la secuencia de tipo salvaje que codifica el factor IX humano.
4. Vector de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ácido nucleico comprende además por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en: una repetición terminal invertida (ITR) de virus adenoasociado (AAV), un elemento de control de expresión ligado funcionalmente a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano, un relleno polinucleotídico y un terminador de transcripción.
5. Vector de rAAV según la reivindicación 4, en el que dicho elemento de control de expresión confiere la expresión en el hígado y comprende un promotor y opcionalmente un potenciador.
6. Vector de rAAV según la reivindicación 4 o 5, en el que dicho ácido nucleico comprende una ITR del serotipo AAV2, un promotor y un potenciador que confiere expresión en el hígado ligado funcionalmente a dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano, una secuencia de poliadenilación, un terminador de transcripción y opcionalmente una segunda ITR de AAV2, en el que la ITR de AAV2 está situada en 5' del promotor y potenciador, o en 3' del terminador de transcripción.
7. Vector de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano está interrumpida por un intrón.
8. Vector de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho ácido nucleico comprende además un relleno polinucleotídico.
9. Vector de rAAV según la reivindicación 5 o 6, en el que dicho promotor es un promotor de antitripsina alfa1 humana (AAT) y dicho potenciador es un potenciador HCR-1 o HCR-2 de apolipoproteína E (ApoE).
10. Vector de rAAV según la reivindicación 5, 6 o 9, en el que dicho promotor comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 15.
11. Vector de rAAV según la reivindicación 5, 6, 9 o 10, en el que dicho potenciador comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 14.
12. Vector de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que dicha ITR de AAV2 comprende cualquiera de las secuencias de ITR de AAV2 como se encuentra en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 26.
13. Vector de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que dicho intrón comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 17.
14. Vector de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano y el intrón comprenden la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 25.
15. Vector de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende en orden un potenciador HCR-1 de ApoE, un promotor de AAT, la secuencia de nucleótidos no natural que codifica la proteína factor IX humano, una secuencia de poliadenilación, una ITR de AAV2 situada en 5' del potenciador o en 3' de la secuencia de poliadenilación, y opcionalmente una segunda ITR de AAV2 en la posición opuesta.
16. Vector de rAAV según la reivindicación 15, en el que la secuencia de nucleótidos de dicho potenciador HCR-1 de ApoE comprende los nucleótidos 152 a 472 de SEC ID nº: 12, la secuencia de nucleótidos de dicho promotor de AAT comprende los nucleótidos 482 a 878 de SEC ID nº: 12, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano comprende los nucleótidos 908 a 995 y 2434 a 3731 de SEC ID nº: 12, la secuencia de nucleótidos de dicha secuencia de poliadenilación comprende los nucleótidos 3820 a 4047 de SEC ID nº: 12, y la secuencia

de nucleótidos de dicha ITR de AAV2 comprende cualquiera de las secuencias de ITR de AAV2 como se encuentra en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 26.

5 17. Vector de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende los nucleótidos 142 a 4096 de SEC ID nº: 12.

18. Vector de rAAV según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y 16, en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano está interrumpida por un intrón.

10 19. Vector de rAAV según la reivindicación 18, en el que dicho intrón comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº: 17.

20. Vector de rAAV según la reivindicación 18, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano y el intrón comprenden la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 25.

15 21. Vector de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el genoma de dicho vector de rAAV es monocatenario.

20 22. Vector de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína factor IX humano es por lo menos 90 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 10.

23. Composición farmacéutica que comprende el vector de rAAV según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la utilización en el tratamiento de la hemofilia B.

25

Secuencia de aminoácidos de Rh74 VP1 (SEC ID n.º 1)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEFV
 NAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFOAKKRVLEPLGL
 VESPVKTAPGKKRPVEPSQSPDSSTGIGKKGOQPAKKRLNFGOTGDSSESVPDPOPIGEPPAGPSGLGS
 GTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSG
 GSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTI
 ANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQ
 MLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLSQAGPNN
 MSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSONNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPVGVAMATHKDDEERFFP
 SSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLOQQNAAPIVGAVNSQALP
 GMVWQNRDVYLOGPIWAKIPHDTGDNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFIT
 QYSTCQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Figura 1.

Aminoácidos de Rh74 VP2 (SEC ID n.º 2):

TAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQOPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEPPAGPSGLGSGTMAA
 GGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTND
 NTYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWORLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLT
 STIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
 NNFEFSYNFEDVPPHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQA
 KNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVL
 MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVW
 QNRDVYLOGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTG
 QVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Aminoácidos de Rh74 VP3 (SEC ID n.º 3):

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGS
TNDNTYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIAN
NLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQML
RTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLFSQAGPNNMS
AQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPGVAMATHKDDDEERFFPSS
GVLMTGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPG
MVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQ
YSTGQVSVEIEWELQENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Figura 3

Secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 4-1 (SEC ID n.º 4)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNNGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
61 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
121 AKKRVLLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSQSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFCOTGDS
181 ESVPDPQPIGEPPA**APSGVGPNT**MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
241 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQ
301 RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFED
421 VPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNW
481 LPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPGVAMATHKDDDEERFFPSS
541 GVLMTGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS
601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADP
661 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE
721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

Secuencia de aminoácidos de cápside de VP2 variante 4-1 (SEC ID n.º 27)

TAPGKKRPVEPSQSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPPIGEPPA**APSGVGPNT**
MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTS
GGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEG
TKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCL
EYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLF
SQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPGVAMAT
HKDDDEERFFPSSGVLMTGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAP
IVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADP
TTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSERPI
GTRYLTRNL

Secuencia de aminoácidos de cápside de VP3 variante 4-1 (SEC ID n.º 3)

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTS
GGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEG
TKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCL
EYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLF
SQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPGVAMAT
HKDDDEERFFPSSGVLMTGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAP
IVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADP
TTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSERPI
GTRYLTRNL

Figura 4

Secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-1 (SEC ID n.º 5)

```

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAGPKPKANQQRQDNNGRLVLPGYRYLGPFGNLD
61 KGEPVNAADAAALEHGRAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSQSPDSSTGIGKKGOQPARKRLNFGQTGDS
181 ESVPDPQPIGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQ
301 RLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFED
421 VPFHSSYAHQSOLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLFSQAGPNNMSAQAKNW
481 LPGPCYRQQRVSTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNNGRDSLVPNGVAMATHRDDEERFFPSS
541 GVLMFGRQGAGRDNDYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYGVVADNLQQQN AAPIVGAVNS
601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHDTGDNFHPSPLMGGFGLKHPPPOILIKNTIPVADP
661 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE
721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL
    
```

Figura 5

Secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-2 (SEC ID n.º 6)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQRQD NGRGLVLPGY RYLGPFNGLD
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAVDQQLQAGDNPYLRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
 121 AKKRVL EPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSQSPDSSTGI GKRGQQPARK RLNFGQTGDS
 181 ESVDTPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGD RV
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ
 301 RLINNNWGF RPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYNFED
 421 VPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGT QQLFSQAGP NNMSAQAKNW
 481 LPGPCYRQORVSTILSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL V NPGVAMATHR DDEERFFPSS
 541 GVL MFGKQCAGRDNDVYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPH TDGNFHPSPLMGGF GLKHPPPOIL IKNTPVPADP
 661 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPE IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

Figura 6

Secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-3/15-5 (SEC ID n.º 7)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWDLKPGAPKPKANQQRQD NCRGLVLPGY RYLGPFNGLD
 61 KGEPVNAADAAALEHGRAYDQQLQAGDNPYLRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
 121 AKKR VLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSQSPDSSTGI GKRGQQPAKK RLNFGQTGDS
 181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGD RV
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ
 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYNFED
 421 VPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGT QQLFSQAGP NNMSAQAKNW
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSONNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL V NPGVAMATHR DDEERFFPSS
 541 GVLMEGRQAGRDNDYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGF GLKHPPPOIL IKNTVPADP
 661 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPE IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

Figura 7

Secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 de variante 15-4 (SEC ID n.º 8)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAP KPKANQORQD NGRGLVLPGY RYLGPFNGLD
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAYDQQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFO
 121 AKKR VLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKRGQQPAKK RLNFGQTGDS
 181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDFNRF HCHFSPRDWQ
 301 RLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNE GTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NPEFSYNFED
 421 VPFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSR TQSTGGTAGT QQLFSQAGP NNMSAQAKNW
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHR DDEERFFPSS
 541 GVL MFGKQGAGRDNDYSSVMLTSEEEIRT TNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPADP
 661 PTTFNQARLASFITQYSTGQVSVEIEWELQ KENSKRWNPE IQYTSNYYS TNVDFAVNTE
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

Figura 8

Secuencia de aminoácidos de cápside de VP1 variante 15-6 (SEC ID n.º 9)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQORQDNGRGLVLPY RYLGPFNGLD
61 KGEPVNAADAAALEHDRAVDQQLQAGDNPYLRYNHADAEEFQERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEFSPQSPDSSTGIGKKGQOPAKK RLNFGQTGDS
181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRF HCHFSPRDWQ
301 RLNNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLTSTIQVFTDSE YQLPYVLGSA
361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN NFEFSYNFED
421 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGP NNMSAQAKNW
481 LPGPCYRQQRVSTTLSONNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHR DDEERFFPSS
541 GVLMEGRQAGRDNDYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYGVVADNLQQN AAPIVGAVNS
601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQIL IKNTPVPADP
661 PTFNQARLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKS TNVDFAVNTE
721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

Figura 9

Secuencia de ácido nucleico de FIX39 (SEC ID n.º 10)

ATGCAGAGGGTGAACATGATCATGGCTGAGAGCCCTGGCCTGATCACCATCTGCCTGCTGGGCTA
CCTGCTGTCTGCTGAATGTACAGTTTTCTTGATCATGAAAATGCCAACAAAATTCTGAATAGACC
AAAGAGGTATAACTCTGGCAAGCTTGAAGAGTTTGTACAGGGGAATCTGGAGAGAGAGTGTATGG
AAGAGAAGTGCAGCTTTGAGGAAGCCAGAGAAGTGTGTTGAAAATACAGAGAGAACAACCTGAATT
TTGGAAGCAGTATGTGGATGGTGTATCAATGTGAGAGCAATCCCTGCTTGAATGGGGGGAGCTGTA
AAGATGATATCAACAGCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAGGGGAAAAACTGTGAGCTTG
ATGTGACCTGTAATATCAAGAATGGCAGGTGTGAGCAATTTGCAAGAATTCTGCTGATAACAAA
GTGGTCTGTAGCTGCACTGAGGGATATAGGCTGGCTGAAAACCAGAAGAGCTGTGAACCTGCAGT
GCCTTTCCCTGTGGGAGAGTGTCTGTGAGCCAAACCAGCAAGCTGACTAGGGCTGAAGCAGTCTT
TCCTGATGTAGATTATGTGAATAGCACTGAGGCTGAGACAATCCTTGACAATATCACTCAGAGCAC
ACAGAGCTTCAATGACTTCACCAGGGTGGTAGGAGGGGAGGATGCCAAGCCTGGCCAGTTCCCT
GGCAGGTAGTGCTCAATGGAAAAGTGGATGCCFTTTGTGGAGGTTCAATTGTAAATGAGAAGTGG
ATTGTGACTGCAGCCCACTGTGTGGAACTGGAGTCAAGATTACTGTGGTGGCTGGAGAGCACAA
TATTGACGAACTGAGCACACTGAGCAGAAGAGGAATGTGATCAGGATTATCCCCCACCACAAC
ACAATGCTGCTATCAACAAGTACAACCATGACATTGCCCTCCTGGAACCTGGATGAACCCCTGGTCT
TGAACAGCTATGTGACACCCATCTGTATTGCTGATAAAGAGTACACCAACATCTTCTTGAAATTC
GGTCTGGATATGTGCTCTGGCTGGGGCAGGGTGTTCATAAAGGCAGGTCTGCCCTGGTATTGCAGT
ATTTGAGGGTGCCTCTGGTGGATAGAGCAACCTGCTTGTGAGCACCAAGTTTACAATCTACAACA
ATATGTTCTGTGCAGGGTTCCATGAAGTGGTAGAGACAGCTGCCAGGGAGATTCTGGGGGTCCC
CATGTGACTGAGGTGGAGGGAACCAAGCTTCTGACTGGGATTATCAGCTGGGGTGAGGAGTGTGC
TATGAAGGGAAAGTATGGGATCTACACAAAAGTATCCAGATATGTGAACTGGATTAAGGAGAAAA
CCAAGCTGACTTGA

Figura 10

Secuencia de ácido nucleico de FIX19 (SEC ID n.º 11)

ATGCAAGCGGTGAACATGATCATGGCCGAGAGCCCTGGCCTGATTACCATCTGCCTGTTAGGATAT
CTACTCAGTGCTGAATGTACAGTFTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATCCTGAACCGGCCC
AAGCGGTACAACTCAGGCAAGCTGGAAGAGTTTCGTGCAGGGCAACCTGGAACGGGAGTGCATGG
AAGAGAAGTGCAGCTTCGAGGAAGCCCGGGAGGTGTTTCGAGAACACCGAGCGGACCAACCGAGTT
CTGGAAGCAGTACGTGGACGGCGACCAAGTGCAGTCAAACCCCTGCCTGAACGGCGGCAGCTGCA
AGGACGATATCAACAGCTACGAGTGCTGGTGCCCTTCGGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGCTG
GACGTGACCTGCAACATCAAGAACGCCCGCTGCGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAA
GGTGGTGTGCTCATGCACTGAGGGCTACCGGCTGGCCGAGAAECAGAAGAGCTGCGAGCCCGCCG
TGCCCTTCCCCTGCGGCAGAGTGTCCTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCAGGGCCGAGGCCGTG
TTCCCTGACGTGGACTACGTGAACTCAACCGAGGCCGAGACAATCCTGGACAACATCACCCAGAG
CACCCAGTCCCTCAACGACTTCACCCGGGTGGTGGGCGGCGAGGACGCCAAGCCCGGCCAGTTCC
CTTGGCAGGTGGTGTCTGAACGGCAAGGTGGACGCCCTTCTGCGCGGGCTCAATCGTGAACGAGAAG
TGGATCGTGACAGCCGCCCACTGCGTGGAGACAGGCGTGAAGATCACCGTGGTGGCCGGCGAACA
CAATATCCAGGAAACCGAGCACACCGAGCAGAAACGGAAACCTGATCCGGATTATCCCCACCACA
ACTACAACGCCGCCATCAACAAGTACAACCAAGATATCGCCCTGCTGGAACCTGGACGAGCCTCTG
GTGCTGAATTCATACGTGACCCCATCTGTATCGCCGACAAAGAGTACACCAACATCTTTCTGAAG
TTCCGCAGCGGCTACGTGTCCGGCTGGGGCAGGGTGTTCCACAAGGGCCGAGCGCCCTGGTGCT
GCAGTACCTGCGGGTGCCCTGGTGGACAGAGCCACCTGCCCTGCGGTCAACCAAGTTTACCATCTA
CAACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGCGGCAGGGACAGCTGCCAGGGCGACAGCGGCG
GACCCACCTGACCGAGGTGGAGGGCACCAGCTTTCTGACCGGCATCATCTCATGGGGCGAGGAA
TGGCCCATGAAGGGCAAGTACGGAATCTACACTAAGGTGTCAAGATACGTGAACCTGGATCAAAGA
GAAAACCAAGCTGACCTGA

Figura 11

pAAV-ApoE hAAT-FIX39 (SEC ID n.º 12)

LOCUS FIX39 11125 pb ADN UNA circular
 DEFINICIÓN AKA FIX39 Step 4.
 ACCESO urn:local...e-3um3omk
 VERSIÓN urn:local...e-3um3omk
 PALABRAS CLAVE
 ORGANISMO FUENTE

CARACTERÍSTICAS Ubicación/Calificadores
 repeat_region 1..141
 /Imported from=Pla
 sMapper
 /Transferred From="LAAV-2 ITR"
 /Transferred Similarity="100.00%"
 /modified by="User"
 /label="AAV2 ITR"
 potenciador 152..472
 /created by="User"
 /modified by="User"
 /Transferred From="ApoE HCR-1"
 /Transferred Similarity="100.00%"
 /label="ApoE HCR-1"
 promotor 482..878
 /vntifkey=21
 /ApEinfo_fwdcolor="#ffff80"
 /ApEinfo_revcolor="#6080ff"
 /Transferred From="hAAT Promoter"
 /Transferred Similarity="100.00%"
 /modified by="User"
 /label="hAAT Promoter"
 5'UTR 879..907
 /created by="User"
 /label="FIX 5'UTR"
 CDS order(908..995,2434..3731)
 /created by="User"
 /Transferred From="hFIX CDS"
 /Transferred Similarity="79.22%"
 /modified by="User"
 /label="hFIX CDS"
 intrón 996..2433
 /created by="User"
 /Transferred From="hFIX Intron"
 /Transferred Similarity="100.00%"
 /modified by="User"
 /label="hFIX Intron"
 3'UTR 3732..3779
 /created by="User"
 /label="hF9 3' UTR"
 Terminador 3820..4047
 /Imported from=Pla
 sMapper
 /Transferred From="bGH_PA term"
 /Transferred Similarity="100.00%"
 /label="bGH_PA term"
 repeat_region complement(4097..4284)
 /modified by="User"
 /label="AAV2 ITR"
 misc_feature 4219..8579
 /modified by="User"
 /label="Lambda Stuffer"
 Gen complement(8491..8580)
 /Imported from=Pla
 sMapper
 /Transferred From="cosN"
 /Transferred Similarity="100.00%"
 /label="cosN"
 rep_origin 8680..8986
 /modified by="User"
 /label="F1 Ori"

Figura 12A


```

misc._marker      9284..10096
                   /modified_by="User"
                   /label="Kan R"
rep_origin         complement(10453..11120)
                   /modified_by="User"
                   /label="pUC Ori"

ORIGIN
1   cctgcaggca gctgcgcgct cgttcgctca ctgaggccgc ccgggcaaaag cccgggcgtc
61  gggcgacctt tggctgcgcc gcttcagtg ggcagcgagc ggcagagag ggagtgccca
121 actccatcac taggggttcc tggcgctag taggtccaga ggcacacagg agttctctgg
181 ctcaccctgc ccccttccaa cccctcagtt cccatccctc agcagctgtt tgtgtgctgc
241 ctctgaagtc caccctgaac aaacttcagc ctactccatgt ccccaaaatg ggcaaacatt
301 gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccttgccctg tgcctctgga gctggggcag
361 aggtcagaga cctctctggg cccatgcacc ctccaacatc cactcgacc cttggaattt
421 cggctggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt agtgtgagag gggtagccgg
481 ggatccttgt aocagtggaa cagccactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct
541 aagtggtact ctccacagaga ctgtctgact caccgcaacc cctccacott ggacacagga
601 cgtctgtggt tctgagccag gtacaaatgac tcccttcggg aagtgcagtg gaagctgtac
661 ggatcccgag caaagcgtcc gggcagcgta ggcggggcag tcagatccca gccagtggac
721 ttgacccctg tttgctcttc cgtatccctg ggtgaccttg gttaatatcc accagcagcc
781 tcccccggtt cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg cctgtctctc
841 tccagcttcag gacccacacac tgacctggga cagtgaatac cactttccca atctgtctag
901 aaagggttatg cagaggggtga acatgatcat ggcctgagagc cctggcctga tcaccatctg
961 cgtcgtgggc taactgtgtt ctgctgaatg tacaggtttg tttccttttt tataatacat
1021 ttgagtatgct tgccttttag alatagaat atctgattct gcttctctta ctaaattttg
1081 attacatgat ttgacagcaa tattgaagag tctaacagcc agcaccagg ttggttaagta
1141 ctgggttcttt gtttagctagg ttttctctct cttcactttt aaactctaat agatggacaa
1201 tgccttatgat gcaataaggt ttaataaaca ctgttcagtt cagtatttgg tcattgtaatt
1261 cctgttcaaaa aacagtcact tcttgggttt aaaaaaatta aaagtgggaa aacaaagaaa
1321 tagcagaata tagtgaaaaa aaataaccac agtatttttg tttggactta cacttttgaa
1381 atcaaatctg gaaacaaaag cacaacaggt ggccttattt acacaaaaag tctgatttta
1441 agatatgtga caattcaagg ttctagaagt atgtaaggag gctgtctctc aattttttaa
1501 attatataat ttcaatttaa agtttttagtt aaaaacataaa gattaacott tcatatagaa
1561 gctgttaggt atcaccaaaag cttttcatgg attaggaaaa aatcattttg tctctatctc
1621 aaacatcttg gagttgatat ttggggaaac acataactca gttgagttcc ctaggggaga
1681 aaagcaagct taagaattga cacaagaggt aggaagttag ctattgcaac atatatcact
1741 ttgttttttc acaactacag tgactttatt tatttccag aggaaggcct acaggggaag
1801 aattatccca tttggacaaa cagcatgttc tcacagtaag cacttatcac acttacttgt
1861 caactttcta gaatacaatc tagtagctga cagtaccagg atcaggggtg ccaaccttaa
1921 gaccccccag aaagctgact ggcctgttgg ttcacatcc agcactgtga tcaagtgtga
1981 aatccacctc cctggacatc aattaggctt ctgtttctca ggagacattt gttcaagtc
2041 atttgggcaa ccatattctg aaaaacagcc agccaggggtg atggatcact ttgcaagat
2101 cctcaatgag ctattttcaa gtgtgacaa agtgtgaagt taagggtcca tttgaaact
2161 ttctttttca tccaaagtaa attcaaatat gattagaagt ctgacctttt attactggaa
2221 ttctcttgac taaaagttaa attgaatttt aattcctaaa tctccatgtg tatadagta
2281 tgtgggaaca tcacagattt tggctccatg cctcaagag aaattggctt tcagattatt
2341 tggattaaaa acaaaagact tttaagaga tgtaaaaatt tcatgatgtt ttcttttttg
2401 ctaaaactaa agaattatcc ttttacatct cagtttttct tgatcatgas aatgccaaca
2461 aaattctgaa tagaccaag aggtataact ctggcaagct tgaagagttt gtaaggggga
2521 atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcaagcttga ggaagccaga gaagtgtttg
2581 aaaatacaga gagaacaact gaattttgga agcagttatg ggttggtgat caatgtgaga
2641 gctaatccct cttgaatggg gggagctgtg aagatgatat ccaacagctat gaatgttggt
2701 gtcccttttg atttgagggg aaactctgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg
2761 gcaggtgtga ccaattttgc aaqaattctg ctgataacaa agtgggtctg agctgcactg
2821 agggatatag gctggctgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtgcc tttccctgtg
2881 ggagagtgtc tgtgagccaa accagcaagc tgaatagggt tgaagcagtc tttcctgatg
2941 tagatttatg gaatagcact gaggtcgaga caatccttga caatatcact cagagccaca
3001 agagcttcaa tgacttcaac aggttgtag gaggggagga tgcacagcct gggcagttcc
3061 cctggcaggt agtgcctaat ggaaagtggt atgctttttg tggaggttca attgtaaatg
3121 agaagtggat tgtgactgca gccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtgtgtg
3181 ctggagagca caatattgag gaaactgagc acactgagca gaagaggat attgatcaga
3241 ttatccccc cccacaactac aatgtgtgta tcacaaagta caacatgac attgcccctc
3301 tggaaactga tgaacccctg gcttgaaaca gctatgtgac accatcttgt atttgtgata
3361 aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg
3421 tgttccataa aggcaggtct gccctggtat tgcagtattt ggggtgctct ctggtggata
3481 gagcaacctg cttgctgagc acccaagtta caatctacaa caatatgttc tgtcagggtt
3541 tccatgaagg tggtagagac agctgccagg gacttctgtg gggctccctc gctgactgag
3601 tggggggaac cagcttccctg actgggattta tcaagctggg tggaggagtgt gctatgaagg
3661 gaaagtatgg gatctacaca aaagtstcca gatattgtga ctggattaag gagaaccaca
3721 agctgacttg atgaagatg gatttccaa gtttaattcat tggaaattga aattaacaga
3781 gatctagagc tgaactctg cagccagggg gatcagcttc tactgtgctt ctagtgtccc
3841 agccactctgt tgtttgcccc tcccccttgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca
3901 ctgtccttcc ctaataaaat gaggaatttg catcacattt tctgagtagg tctcatttota
3961 ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga tggggaagag taatagcaggc
4021 atgctgggga tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccagc tggggctcga
4081 gatccactag ggcgcgagga acccctagtg atggagtttg ccactccctc tctgcgcct
4141 cctctcgtca ctgagccgcg ccgggttttg cccggggggc ctcagtgagc

```

Figura 12A (continuación)

4201 gcagctgcct gcaggggagc cttgaaggaa atactaaggc aaaggtactg aaagtgcctg
 4261 caacattcgc ctatgcggat battgcogta gtgcogcgac gccgggggca agatgcagag
 4321 attgcctatg tacagggcgt gccgttgata ctgcacaaac agagctgttg gggagagttg
 4381 tcgagaaaga gtgcgggaag tcgcaaggcg ccggctattc aaggatgcca gccagcgag
 4441 catatcgccg cgtgacgatg ctaatcccaa accctaccca accacactgg tcacgcactg
 4501 ttaagccgct gtatgaogct ctgggtgggc aatgcccaca agaagagtca atcgcagaca
 4561 acatcttgaa tcgggtcaca cgttagcagc atgattgcga cggatggcaa datattacag
 4621 gcattgatatt gacttatlga alaaaaattg gtaaaattga ctcaacgatg ggtlaattcg
 4681 ctogtttggt tagtgagatg aaaagaggcg gogcttacta ccgattccgc ctagtgtgtc
 4741 acttcgacgt atcgtctcgg actccaacca ccgcagcgag agaggtctgc aasatgcaat
 4801 ccgcaaacag ttcgcaggtc atagttagag cctgcataac ggtttcggga ttttttatat
 4861 ctgcacaaca ggtaagagca ttgagtcgat aatcgtgaag agtcggcgag cctggttagc
 4921 cagtgctctt tcogttgtgc tgaattaaag gaataccgga agcagaaccg gatcaccaaa
 4981 tcggtacagg cgtcatcgcc gccacgcaac agcacaaacc aaactgagcc gtacccactg
 5041 tctgtctcga attcattagt aatagttacg ctggggcctt ttacacatga cctcogtgaa
 5101 agggggtggc agggagtcgc gctaaccaac cctcgccgtt ttgcccgtgc atctcgtca
 5161 cgaacaaatc tgattactaa acacagtagc ctggatbtgt tctatcagta atcgacotta
 5221 ttcctaatta aatagagcaa atcccttctt tgggggttag acatgaagat gccagaaaaa
 5281 actgacgtgt tggcggcgtc tctcggggca aaggaaacag gnatcggggc aatccttgcg
 5341 tttgcaatgg cgtacctcgg ccggcagatc aatggcggtg cgtttacaaa aacagtaatc
 5401 gacgcaacga cgtgcgcgat tatcgctag ttcattcgtg acctctcaga cttcgcggga
 5461 caaagttaga atctcgttgc tataccgagc gtgtttatcg gctacatcgg aatccttgcg
 5521 actggttcgc ctatcaaacg cttcgctgct aaaaaagccg gagttagaaga tggtagaaat
 5581 caataatcaa cgttaaggcgt tcttcgatat gctggcgttg tcggagggaa ctgataacgg
 5641 acgtcagaaa accagaaatc atggttatga atggttagag gccggagagc taattactga
 5701 ttaactccgat caccctcgca aacttgctac gctaaaccca aaactcaaat caacggggcg
 5761 cggacgtcac cagcttcttt ccogtfggtg ggatgcctac ccgaagcagc ttggcctgaa
 5821 agacttctct ccgaaagtc aggaacgtgt ggcattgcag cagattaaag agcgtggcgc
 5881 tttacctatg attgatcggc gtgataltcg ccaggaatc gaccgttgca gccataltcg
 5941 ggccttactg ccgggcgcgc gttatgggtc gaacggctcag gtttcagcat aaggctgaca gctcatttgc
 6001 aaaattcaaa gaagcggcgcc agagattgat atagatttgc gtatgagcag agtcaccccg
 6061 atttatctcg ctctggttat ctgcactatc gtctgcctgt catgggctgt taactattac
 6121 cgtgataacg ccattaccta caaagcccag ccgcacaaaa atgcacagaa actgaagctg
 6181 cggcaacggc caattactga catgcagatg cgtcagcgtg atgttgcctc atgttcgtca
 6241 aaatacacga aggagttagc tgatgctaaa gctgaatatg atgtctcgcg tgatgatgtt
 6301 gcogctgggc gtcgtcggtc gcacatcaaa gcagctctcc tgcagcctcc cagacacccg tgaacggat
 6361 accgctcccg gcgtggataa tgcagcctcc gctgatcact atgcacaaac aactgggaag aaccacgaag
 6421 tatctcaacc agcagtgcaq atagagttgc ccatactgat qggcaactca tgcattattt
 6481 gtgagcaata caccagcgtc tccagcggag tataaatgac caaagtaata aaacggagca
 6541 atccatttacc gaatgtttgc tgggtttctg ttttaacaa attttctcgc ccgcacaaa
 6601 ttttggctgc atcgacagct tctctctgcc caattccaga aacgaagaaa tgatgggtga
 6661 tgggttctct cgggtgctact cgttcgggtt tctctctgcc agttaaactg agttaaactg
 6721 atccctgaat aagcagggcc agcgcagtag ccagtagcat tttttctatg gtgttattcc
 6781 cgtatgtttt tgaagttcgc agaactcgtt gtgttagaaa tlaaaccaac cctaaacat
 6841 gagttgaaat ttcataattg taatttttat taatgtatgt caggtgggat gaaactgat
 6901 tctattcccg gattaaactat gtcacagcc acacaggggt tagngngtac angtatgca ttagcnaac
 6961 gggaaatatt aaaaagatgc aaacaggggt gttatgattt agcgtggaaa gatttgtgta
 7021 gcccgggtgc tgaacagggc gaaacgggac gttatgattt gaattatcaa aggtatagta atactttta
 7081 gtggttctgaa tgcctctcag taatttgtaa actcctgctt tagcaagatt tccctgtat
 7141 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7201 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7261 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7321 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7381 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7441 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7501 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7561 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7621 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7681 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7741 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7801 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7861 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7921 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 7981 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8041 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8101 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8161 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8221 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8281 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8341 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8401 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8461 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8521 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8581 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8641 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8701 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
 8761 tcttctgaga atttaacatt tgcactctat ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg

Figura 12A (continuación)

```

8821 ctcccttttag gggtccgatt tagtgcttta cggcaacctcg acccaaaaaa acctgatttg
8881 ggtgatgggtt cagctagtgg gccatcgccc tgatagaagg tttttcgccc tttagcgttg
8941 gagtccacgt tcttttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaaacac caactctatc
9001 tcggggtatt ctttttgattt agacctggcag gaatgcaagg ttggcaactg cctgcgtttt
9061 acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgcttg cagcacatcc
9121 ccttttcgccc agctggcgta atagcgaaga ggcccgccac gatcgccctt cccaacagtt
9181 gcgcagcctg aatggcgaat gcgatttatt caacaaagcc gccgtccctt caagtccagc
9241 taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga tttagaaaaa tcatcgagca
9301 tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaanaagcc
9361 gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaacga ggcaagttcca taggatggca agatccctgt
9421 atcgggtctg gatctcgact cgtcccaacat caatacaacc tattaatttc cctcgtcaa
9481 aaataagggtt atcaagttag aastcaccat gagtgaagac tgaatccgtt gagastggca
9541 aaagcttatg cttttcttcc cagacttggt caacaggcca gccattacg tcgtcatcaa
9601 aatcactcgc atcaacaaaa ccgtttattca ttctgtgatt cgcctgagcg agacgaaata
9661 cgcgatcgct gttaaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaacccg ccgaggaaca
9721 ctcgcagcgc atcaacaata ttttcaacctg aatcaggata ttctctaat acctggastg
9781 ctgtttttccc ggggatcgca gtgggtgagta accatgcctc atcaggagta cggataaaat
9841 gcttgatggt cgggaagagcc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg
9901 caacatcatt ggcaacgcta cctttgccc atgttcagaaa caactctggc gcctcgggtt
9961 tcccatacaa tcgatsgatt gtccgacctg attgcctcgac attatcgoga gcccatttat
10021 acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg cttcgagcaa gacgtttccc
10081 gttgaatatg gctcataaca ccccttgat tactgrrtat gtaagcagc agttttattg
10141 ttcattgatga tataattttta tcttggtgca tgtaacatca gagattttga gacacaacgt
10201 ggctttgttg aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg catcttcccg
10261 acaacgcaga ccgttcctgt gcaaaagcaaa agttcaaaat caccactgg tccacctaca
10321 acaaaactct catcacccgt ggctccctca cttcttggtt ggatgatggg gogattccag
10381 cctgggtatga gtcagcaaca ccttcttcc gaggcagacc tctcgagga gttccactga
10441 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgctga
10501 atctgctgct tgcacaaaaa aaacccaccc ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa
10561 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaataact
10621 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca
10681 tccctcgctc tgcataact gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgcttt
10741 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgascgggg
10801 ggttcgtgca cacagcccag cctggagcga acgaactaca ccgaactgag atacctacag
10861 cgtgagctat gaaaaagcgc caccgttccc gaagggaqaa agggcgacag gtatccgcta
10921 agcggcggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat
10981 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtcgtgctcg
11041 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc
11101 ttttgctgga ctttgcctca catgt

```

//

Figura 12A (continuación)

phFIX39v2 (SEC ID n.º 26)

LOCUS phFIX39v2 11199 bp ADN UNA circular

CARACTERÍSTICAS Ubicación/Calificadores
 repeat_region 1..141
 /label="AAV2 ITR"
 potenciador 152..472
 /label="ApoE HCR-1"
 promotor 482..878
 /label="hAAT Promoter"
 CDS order(908..995,2434..3731)
 /label="hFIX CDS"
 intrón 996..2433
 /label="hFIX Intron"
 3'UTR 3732..3779
 /label="hF9 3' UTR"
 Terminador 3820..4047
 /label="bGH_PA term"
 repeat_region complement(4097..4237)
 /label="AAV2 ITR"
 misc_feature 4248..8713
 /label="Eukaryotic Stuffer"
 rep_origin 8754..9060
 /label="F1 Ori"
 CDS complement(9355..10170)
 /label="Kanamycin resistance"
 rep_origin complement(10527..11194)
 /label="pUC Ori"

ORIGEN

```

1  cctgcaggca  gctgcgcgct  cgctcgctca  ctgaggccgc  cccggcacaag  cccggggcgtc
61  gggcgacctt  tggtcgcccc  gcctcagtga  gcgagcgagc  gcgcagagag  ggagtgggcca
121  actocatcac  taggggttcc  tgcggcctag  taggctcaga  ggcacacagg  agtttctggg
181  ctcaccctgc  ccccttccaa  cccctcagtt  cccatccctc  agcagctggt  tgtgtgtgtgc
241  ctctgaagtc  cacactgaac  aaacttcagc  ctactcatgt  ccctaaaaatg  ggcaaacatt
301  gcaagcagca  aacagcaaac  acacagccct  cctgcctgct  tgaccttggg  gctggggcag
361  aggtcagaga  cctctctggg  cccatgccac  ctccaacatc  cactcgaccc  cttggaattt
421  cgggtggagag  gagcagaggt  tgtcctggcg  tggtttaggt  agtgtgagag  gggtaaccgg
481  ggatcttgct  accagtggaa  cagccactaa  ggattctgca  gtgagagcag  agggccagct
541  aagtgggtact  ctcccagaga  ctgtctgact  cagccacccc  cctccacctt  ggacacagga
601  cgctgtggtt  tctgagccag  gtacaatgac  tcctttcggt  aagtgcagtg  gaagctgtac
661  actgccacag  caaagcgtcc  gggcagcgta  ggccggcgac  tcagatccca  gccagtggac
721  ttagcccttg  tttgtctctc  cgataactgg  ggtgaccttg  gttaatattc  accagcagcc
781  tcccccgttg  cccctctgga  tccactgctt  aaatacggac  gaggcagagg  cccgtgtctc
841  tcagcttcag  gcaaccacc  tgacctggga  cagtgaatac  cactttcaca  atctgtctagc
901  aaagggttatg  cagaggggtga  acatgatcat  ggctgagagc  cctggcctga  tcaccatctg
961  cctgctgggc  tacctgctgt  ctgctgaatg  tacaggtttg  tttctttttt  tataatacat
1021  tgagtatgct  tgctttttag  atatagaaat  atctgattct  gtcttcttca  ctaaattttg
1081  attacatgat  ttgacagcaa  tattgaagag  tctaacagcc  agcaccacag  ttggttaagta
1141  ctgggttcttt  gtttagctagg  ttttctctct  ctccactttt  aaaactaaat  agatgggaaa
1201  tgccttatgat  gcaataaggt  ttaataaaca  ctgttcagtt  cagtatttgg  tcatgttaatt
1261  cctgtttaaaa  aacagtcctc  tccttggttt  aaaaaaatta  aaagtgggaa  aacaagaaa
1321  tagcagaata  tagtgaaaaa  aaataaccac  agtatttttg  tttggactta  ccactttgaa
1381  atcaaatggg  gaaacaaaag  cacaaacagt  ggccttattt  acacaaaaag  tctgatttta
1441  agatatgtga  caattcaagg  tttcagaagt  atgtaaggag  gtgtgtctct  aattttttta
1501  attatatatc  ttcaatttaa  agtttttagt  aaaacataaa  gattaacctt  tcattagcaa

```

Figura 12B

```

2101 cctcaatgag ctatbtttcaa gtgatgacaa agtgtgaagt taagggtcca tttagaact
2161 ttcttttttca tccaaagtaa attcaaatat gattagaat ctgacctttt attactggaa
2221 ttctcttgac taaaagtaaa attgaatttt aattcctaaa tctccatgtg tatacagtac
2281 tgtgggaaca tcaagatttt tggtccatg cctaaagag aaattgggtt tcagattatt
2341 tggattaaaa acaaagactt tcttaagaga tgtaaaattt tcatgatgtt ttcttttttg
2401 ctaaaaactaa agaattatct ttttacattt cagtttttct tgatcatgaa aatgccacaa
2461 aaattctgaa tagaccaasg aggtataact ctggcaagct tgaagagttt gtacagggga
2521 atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcagctttga ggaagccaga gaagtgtttg
2581 aaaatacaga gagaacaact gaatttttga agcagtatgt ggatgggtgat caatgtgaga
2641 gcaatccctg cttgaatggg gggagctgta aagatgatct caacagctat gaatgttggg
2701 gtcccttttg abttgagggg aaaaactgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg
2761 gcaggtgtga gcaabttttg aagaattctg ctgataacaa agtgggtctg actgacctg
2821 agggatatag gctgggtgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtgcct ttccctgtg
2881 ggagagtgtc tgtgagccaa accagcaagc tgactagggc tgaagcagtc ttctctgatg
2941 tagattatgt gaatagcact gaggtgaga caatccttga caatatcact cagagcacac
3001 agagcttcaa tgacttcacc aggggtggtag gaggggagga tgccaagcct gggcagttcc
3061 cctggcaggt agtgcataat ggaagagtgg atgccttttg tggaggttca attgtaatg
3121 agaagtggat tgtgactgca gccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtgggtg
3181 ttctggagca caatatttag gaaactgagc acactgagca gaagaggaat ctggtcagga
3241 ttatccccc cacaactac aatgctgcta tcaacaagta caacctgac attgccctcc
3301 tggaaactgga tgaacccctg gtcttgaaca gctatgtgac aacctatctg attgtcgata
3361 aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg
3421 tgttccataa aggcaggtct gccctggtat tgcaagtatt gaggtgctt ctggtggata
3481 gagcaacctg cttgctgagc accaagttta caatctacaa caatatgttc tgtgcagggt
3541 tccatgaagg tggtagagac agctgccagg gagattcttg ggggtcccat gtgactgagg
3601 tggaggggaa cagcttctct actgggatta tcaactgggg tgaggagtgt gctatgaagg
3661 gaaagtatgg gatctacaca aaagtatcca gatattgtaa ctggattaaq gagaaadca
3721 agctgacttg atgaagatg gatttccaag gtttaattcat tggaaattgaa aattacaga
3781 gatctagagc tgaattctct cagccagggg gatcagcttc tactgtgctt tctagtgtgc
3841 agccatctgt tgtttgccc tcccccttgc ctctcttgac cctggaaggt gccactccca
3901 ctgtcccttc ctaataaaat gaggaatttg catcacattg tctgagtagg tgtcattcta
3961 gcttcagggg tgggggtggg caggcacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc
4021 atgtctggga tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccage tggggctcga
4081 gatccactag ggcgcaggga acccctagtg atggagttag ccaactccctc tctgcccgtc
4141 cgtctgctca ctgaggccgg ggaaccaag gtcgcccgac gcccgggctt tgcgccggcg
4201 gccctcagtg gggagcgagc ggcagctgc ctgcaggggc caatgggcag atgcaccacc
4261 tgtctcagtg caaagccctg cctaaagtgg ctggtcataa gacctgtgtt ctgggtgtta
4321 ctccaatgga ttgtcagcat caataaaact tggccaacac tgttatatac tgggtattgat
4381 agttacaact gaacatattt gtttaagcaa ttggaattaa gaactccat gccatgatat
4441 cagggtctct cctctctggt tagtgtattg gggggaaatt ggacatctct cagctcagta
4501 ggctagttag gccaggatgg atgacatcca cagccctctg gcagagagat tatgtctgag
4561 ctagtctgac tcttgacaaa gacttgcttc ctggagcttc tactacttct tgggtggatg
4621 staaagaaaba tgggtgtgtt cttttaagtc tgaagagcat tatttttgcc aaccctgac
4681 caaacatctt tgcacaggaa aaggccctaa atatatttgc atttaaagat attanaaaact
4741 acttgggtttt ggaatgtttg gcttttcagg atcatagcta tcaaatattt agctattttg
4801 ggtatgagat gtctgtcttg tcaaggacaa gttcttaag acatcatgtt ggggaataat
4861 ggggaaaatg ggaaggctta tgcctgagt aagcatctg agttatcat tgtcaaacat
4921 ttttggtagt catagtctaa tgggagctg ttttccctct ttaatataca ttccatctg
4981 aatthabgah cttcattgac aatgcagcc cagaacaaca gctcttacc ttgtgttttc
5041 ttcttaacct ttaactccaa tgtaaccatt acctgcoatt tcagtataaac cattattctc
5101 ctacttacc ccccaagtt gtacaataaa gagtgtttgc tctactcat ataccaagca
5161 aattcatttg ttgtgatgt acagcttct atgcccacag atgtgggtttg cctagtctct
5221 tgcctaggtt catttgactg ggaacagatg ggtgctcac ttgggtttt aatgggtaac
5281 tagtcatgga aatgcatttc atcaaatat cttagaggat aattgtttta atgtctgccc
5341 agactagctt tgtagagcca ggtgccatta cacatgtcac ctctctattt ctcttaattg
5401 aattttttat atctgagata ggaataatag agggcttttt caagtgaaga tattactata
5461 gtctaaagac cttagtgtaa catctctggc cctaaggaaa aacaaagtct ggtttataca
5521 tataataact ttgcattgta tctgccactg agatgtgtcc taactcaaca gaaagattg
5581 aatctctgta gctaggtgta cagggaagaa gctgtacagg gaacctttta agatagcttc
5641 agggccaaagc tgaggaaagt ggtggagac tggggaaaat gctaaagacat tttaagattt
5701 ttcttttagt caaaaataga ataagaaata gacctttcc ctggacattt tctgtaggtt
5761 aatantgtta actattggta aatgcavatg ctacaactta atagtctgtc ttgttaggtt
5821 tagcattgtc tctctgtcat tccagaaatg aaatggcaaa tacatttaaa tcagaactaa

```

Figura 12B (continuación)

```

5881 aaaggggaac aggggtatataa ggctcaatttt agtcacatca tttcccttttc taccocaccc
5941 ccttttaaac agatggtttgc caatgcatta acaatgcaga tgtttcctga aagaaagttt
6001 agtaactcaa gcagacacct tattttcttt tcaagcagaa aagactatga gatgggtggtt
6061 gtggttgttc tggggagggag aagatataaa tgatacacat tatttcaaat catttcatga
6121 cctcactgca cacttatagt tattgtacct gttgtctttt tgcgttcaag cctagctcaag
6181 atcatttggg atgttcaaga tcaactatac atgcatgtgc acacatacac atgcacatat
6241 gttcactccc tatttcatcc apatgaacta agattactga tgtgtacaga ttcaagcac
6301 ttttattctt tcccaaggcc aagaagctga gctactttcc agaactgttg tgaagaccc
6361 tgtcactctt ctgcattgtt tctccacac cactccatc cagttcttta tgaatggcta
6421 ctgggttttca aaaatatgag ataaattgag tgtatasaag tcattttttag acaaaatgaa
6481 acaggaaatg aaagaaacca gaatctctcc tcatttgttg atgggcccag tccaccatgt
6541 catggtttaa ctgcagggag gaaatactag atttgatgtc agatcagact gcagcaaac
6601 tgcgtgtgac aaggcatcaa gagaaagcaa gcaacagctg gggcttcagt ggtgaaaaa
6661 ttatattctt agcttggaa tatgaatac tctcttcaga gttgtttctt ttatcttca
6721 ttcaaaatgc tgatgttca taagaacctt tctcttcaga gttgtttctt ttatcttca
6781 aattggccag ggttggaaat aaagtgtatc cttggtgaag aaatctcaca aagaagaccc
6841 tagagagttc acttctcatc gtagttaatga acagattgaa caaactagaa atggttagtc
6901 tgttaagaaa aaggtgttag ttagctgttt gcaagagcca caagggaag gggagagcaa
6961 cttctttgtg gacttaaggg tgaaggttgc aagcagccaa gacctttctg acctcatta
7021 agaaagccct tcccaaccaa caaccactgg gttggttact caggttgggc agcattggga
7081 gcaaatgttg actgaacaaa tgtttgtcag aatgttgac tcaaaagagt gttctgtcac
7141 tggggacagc agcagctaga tagcccatc cagggagagg gcatttgttc acctggccag
7201 agatcagagc aggtcaaggc actgctgggc tctgttcacg ctttgagacc ctacagagcc
7261 atgttccact agcaggtatc cttctgagg tcaactctat ttcttacctt attccagggc
7321 tttcactcca gcttgcagg ctggagccaa gggccaggc agcctcactt tgttggctat
7381 ggttagcttc caggagccc ctatggttca ggaacagctc tgcctgccc atctgtttg
7441 ctactctcta aagccaaagg cactggtggg ccaggccagc tcttaagtc ctacaaggtt
7501 agaaagttcc tgacaggaag gcttggaggc caatggaaag aggtacttca gtttccctc
7561 agatgccagc tgatgggctc agagctctct gagacttgg gaaaggagc aggggtctctg
7621 aagaataact ccaggagtay aaagaggaag ctgaggggtt aaatgcacta cccaggaaca
7681 gaaatgagtt tttcttagag ttagtatatg totagaggtg tagtaaaata aaadaagctt
7741 tgaattgpat acagccactt aggggaagaaa tgaaaacctt tgaattattg tgaaaaaagg
7801 gaaactgcaa cccctgtatt actagatagc tttcatcaac agctcaaaac agacagattt
7861 ttataggttt actgtgtgca ctttaataca agggcagctg ttcagaacta gtcaggctct
7921 gaaaaggatt taccaaatgt ttagtgtgct ctctagtgtt cactctccc agctttcttc
7981 ctataaaggt gcatcaaggc acttgcttac aactggaact gaaatctcc aagtggact
8041 agacattgag atgggaaaaa tttcattgtt coactgtaat tatgcaagga atatccagtt
8101 gagataatgg acttgcctct tatctaataa taccagct caatgggtca ctgctttgtc
8161 cactttgccc aaattccaag cacagctaag ttgatatttt aggaacaaag cagcttacta
8221 tccagccaga gggagtaga atatggttaa gagagagtgg aaagaatgaa tgagccctgc
8281 tattctcac tgcctggatg gttataagca cagcccttat gggagcctta ggtcttctt
8341 cataatatto cagtttgaaa agggtttgas aagactctct agaaaaatca gtagttcttc
8401 tcttttgagt aacatgtagc aaaaaaatt tcatcatgta ggtacaggga acaccctaatt
8461 aactattaat ctcaaggagt caagccagtg tgttctctaa tgtatctgct gtatcccat
8521 gaagcaaat tgcacatcag agaaactgac tcatggggaa aaaatccaag gaactcaaat
8581 caccxaaaga agccactctc cagatttgcc taagcttaag cttccctgtc tctcattgtg
8641 tgttgccttc aatgcagbta cataaattggc ttttttgttt atgcacaaa aacactaatt
8701 catctgcaaa gctataggtc aaagcaacca tagtatgcac cctgctagct ggcgcattaa
8761 ggcggggggg tgtggtggtt agcgcagcg tgacogctac acttgccagc gctttagcgc
8821 cgcctctttt cgtcttcttc cttctcttcc tgcacagtt cgcgggttt cccgtcaag
8881 ctctaaatgg ggggcctctt ttagggttcc gatttagtgc tttaaggac ctgcacccc
8941 aaaaacttga tctgggtgat ggttccagta gtcggccatc ggcctgtag aggtttttc
9001 gccctttgac gttggagtcc agttctttt atagtgaat cttgttccaa actggaacaa
9061 cactcaactc tatctggggc tattcttttt atttagact gcaggcatgc aagcttggca
9121 ctggcgtgct tttcaaacg tctgactgc gaaaaacctg gcgttaccac acttaactgc
9181 cttgcagcac atccctcttt cgcagctgc cgtaatagcg aagagggccg cccgcatcgc
9241 ccttcccaac agttggggag cctgaatggc gaatggcatt tattcaacaa agcgcgctc
9301 cgcctcaagtc agcgtaatgc tctgcagtg ttacaaccaa tcaacaaatt ctgattagaa
9361 aaactcatgc agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata
9421 tttttgaaaa agcctgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgagggagt tccataggat
9481 ggcagatcc tgggtatcgt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa
9541 tttccctctg tcaaaaataa ggttatcaag tgagaatca ccatgagtga ctagtgaatc
9601 cgggtgagaa ggczaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag ggcagcattt

```

Figura 12B (continuación)

```

9661 acgctcgtca tcaaaatcac tgcatacaac caaacccgta tccattcgtg attgogcctg
9721 agcgagacga aatacgggat cgcctgttaa aggacaatta caaacaggaa togaatgcac
9781 ccggcgccag sacactgccg ggcatacaac catattttca cctgaatcag gatattcttc
9841 taataacctg aatgctgttt tcccggggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg
9901 agtacggata aaatgcttga tggcgggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct
9961 gaccatctca cctgtaacat cattggcaac gctaccttgg ccattgtttca gaaacaactc
10021 tggcgcatcg ggcctcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgac cgcattatct
10081 gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaac cgggcttcga
10141 gcaagacgtt tcccgttgaa tatggctcat aacacctctt gtattactgt ttatgtaagc
10201 agacagtttt attgttcctg atgatatatt ttatcttctg gcaatgtaac atcagagatt
10261 ttgagacaca acgtggcttt gtgaataaaa tcgaactttt gctgagttga aggatcagat
10321 caccgatctt ccgacaaacg cagaccgttc cgtggcaaac caaaagtcca aatccacca
10381 ctggtccacc tacaacaaag ctctcatcaa ccgtggctcc ctcactttct ggtggatga
10441 tggggcgatt caggcctggt atgagtcagc aacacctctt tcacgagga gacctctcga
10501 cggagttcca ctgagcgtca gaccocgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatctct
10561 tttttctgcy cgtaatctgc tgcctgcaca caaaaaaac accgctacca ggggtggttt
10621 gtttgcggga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc
10681 agataccaaa cactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg
10741 tagcaacgcc tacaatcctc gctctgctaa tctgtttacc agtggctgct gcaagtcggc
10801 ataagtcgtg tcttaacggg ttgaatcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcgtt
10861 cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgac taacccgaac
10921 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgcacgct tccgaaggg agaaaggcgg
10981 acaggtatcc gctaagcggc agggtcggaa caggagagcg cdcaggggg ctccagggg
11041 gaaacgcctg gtatctttat agtctctgct gglttcgcca cctctgactt gagcgtcgat
11101 ttttgtgatg ctctcagggg gggcggagcc tatggaaaaa cgcagcaac cgggcctttt
11161 taaggttctt ggccttttgc tggccttttg ctacatgt

```

//

Figura 12B (continuación)

pAAV-ApoE_hAAT-FIX39

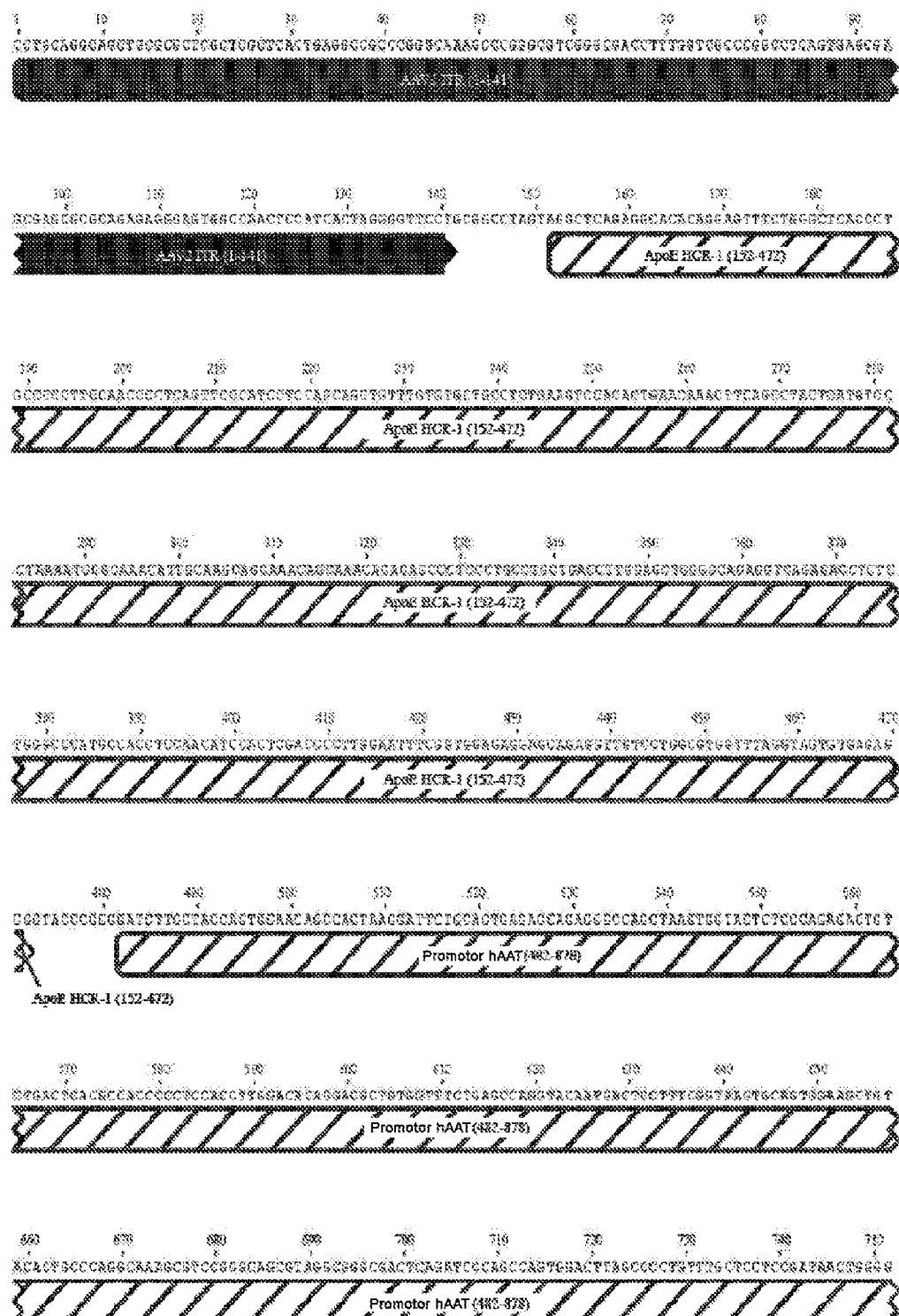


Figura 13

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3

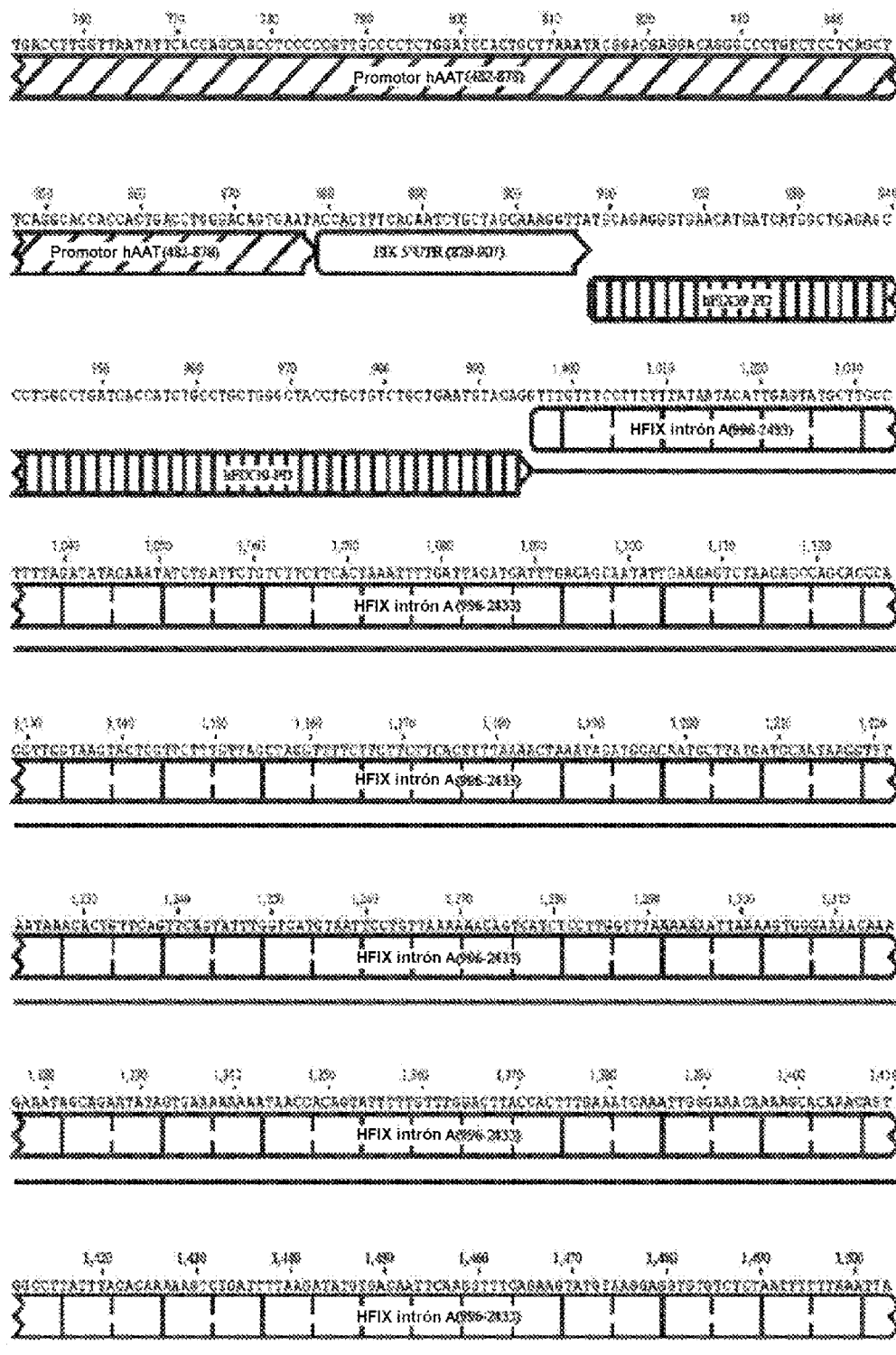


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

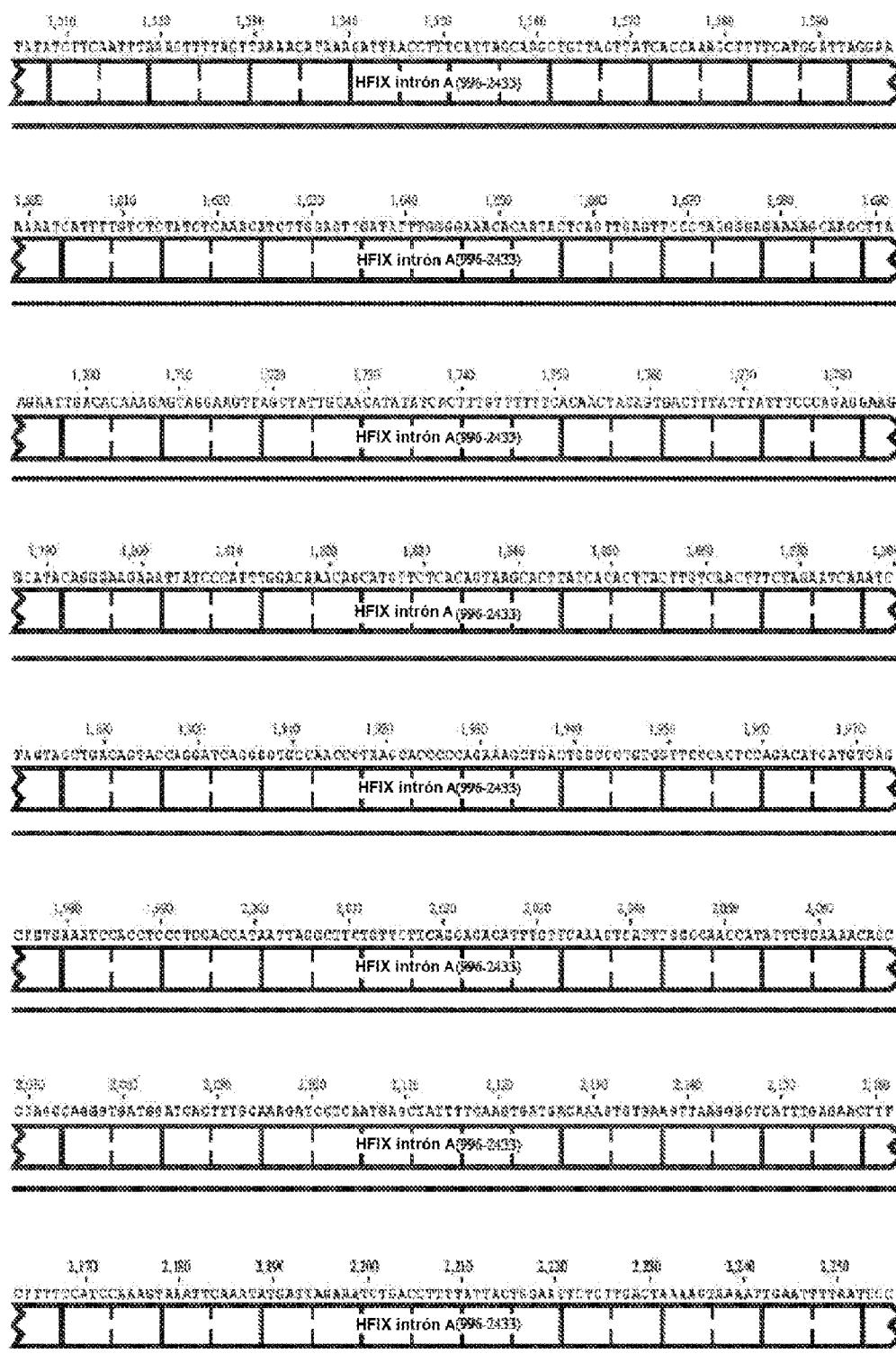


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

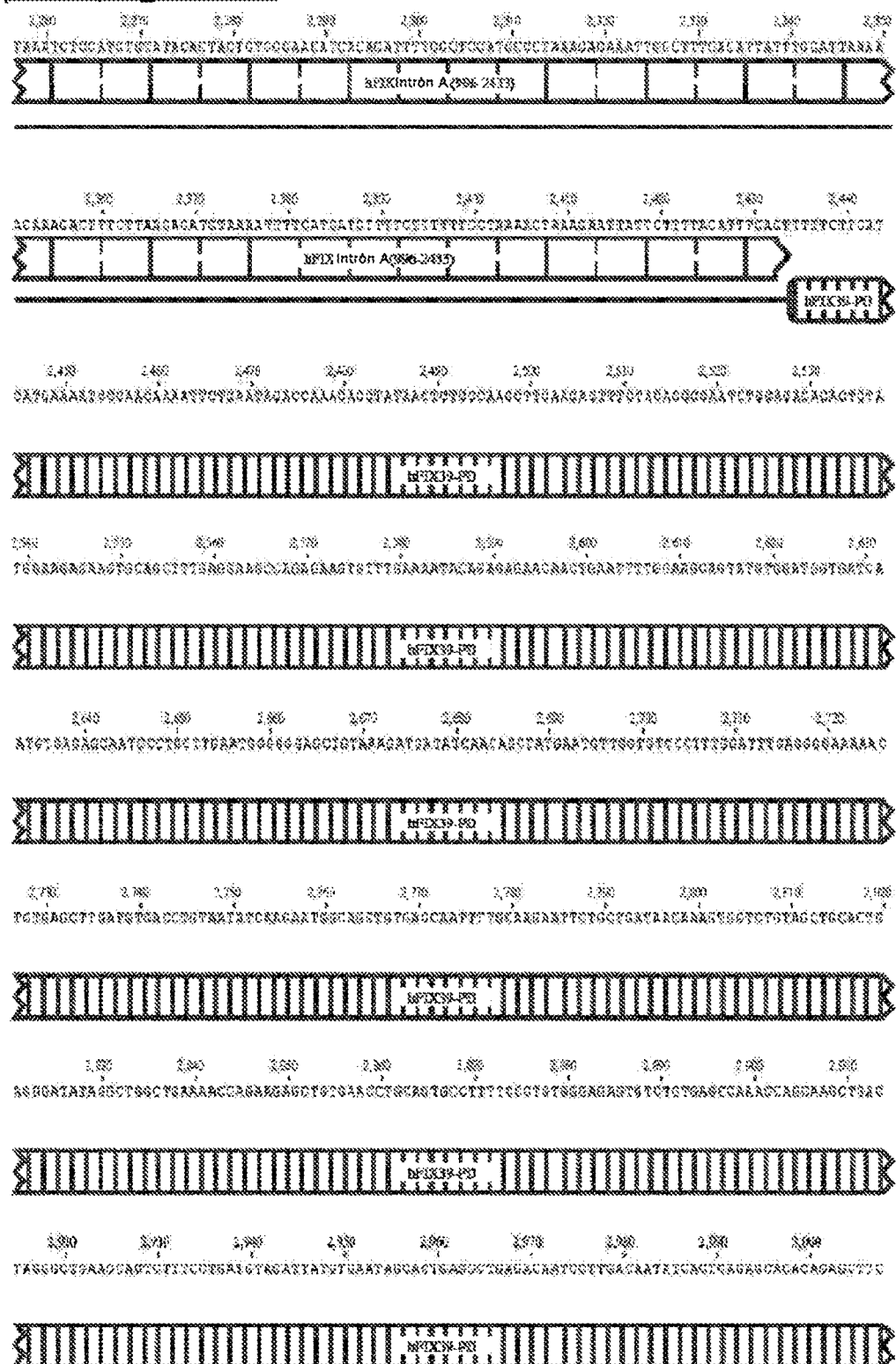


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

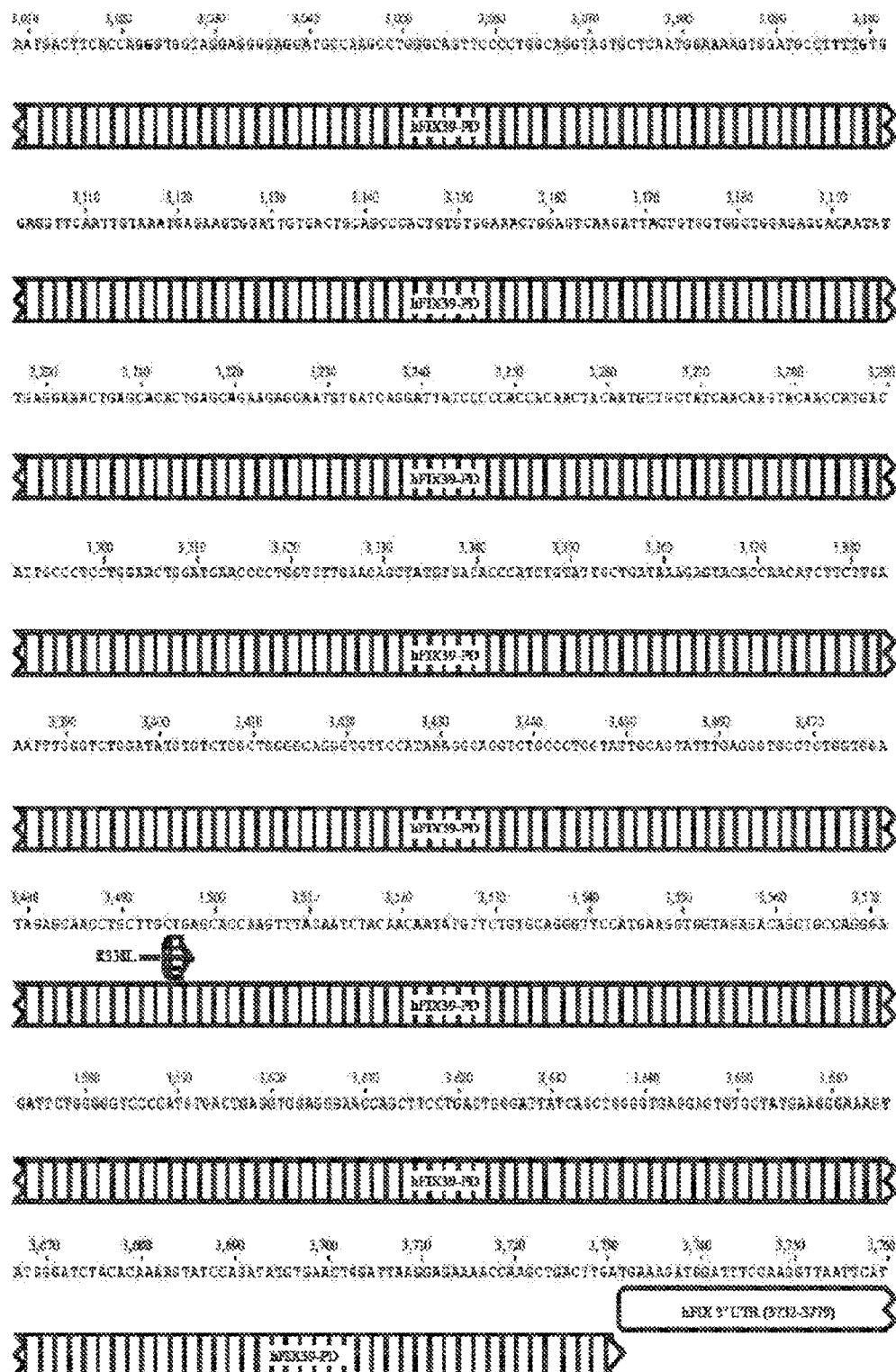


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

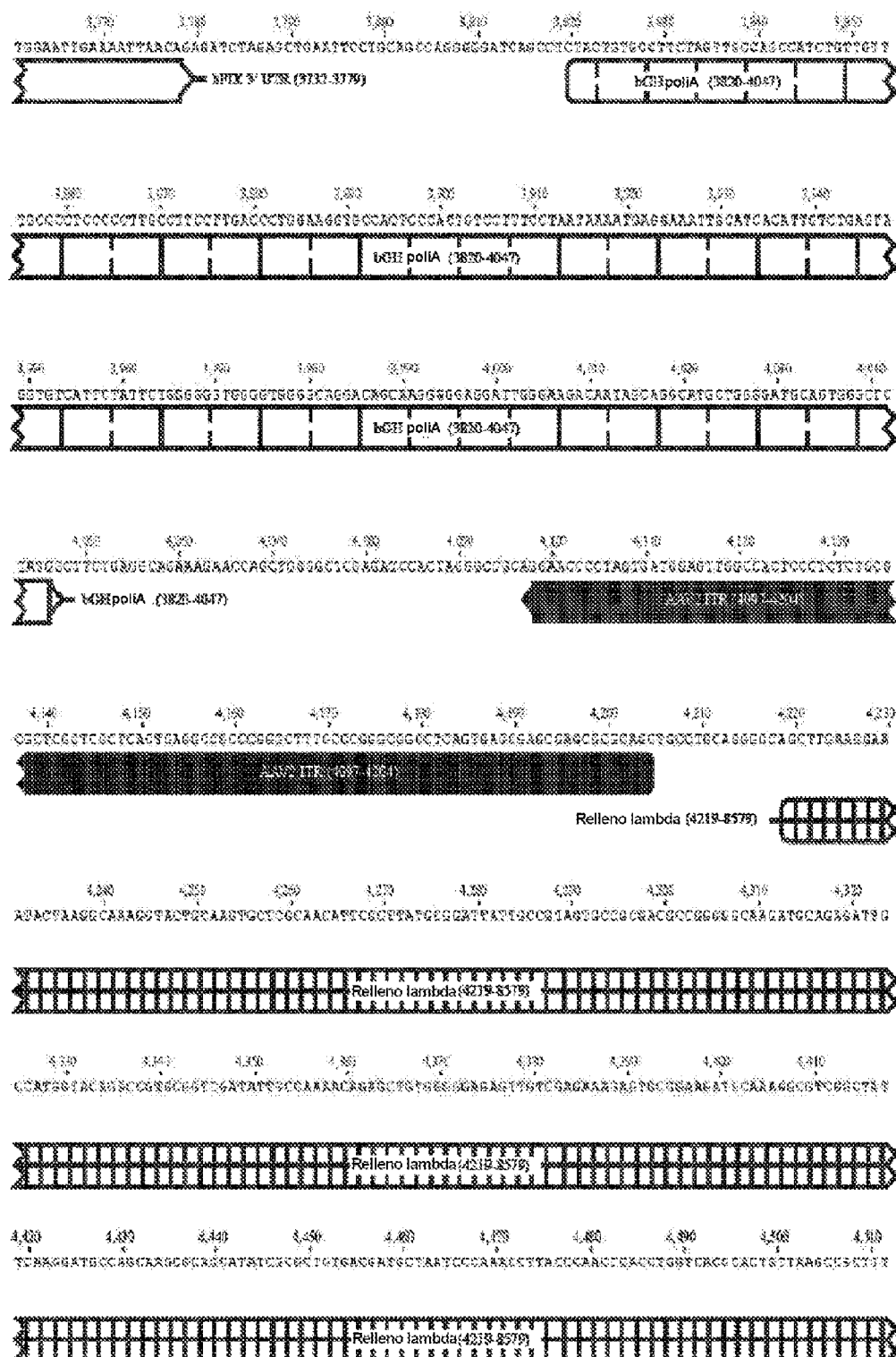


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

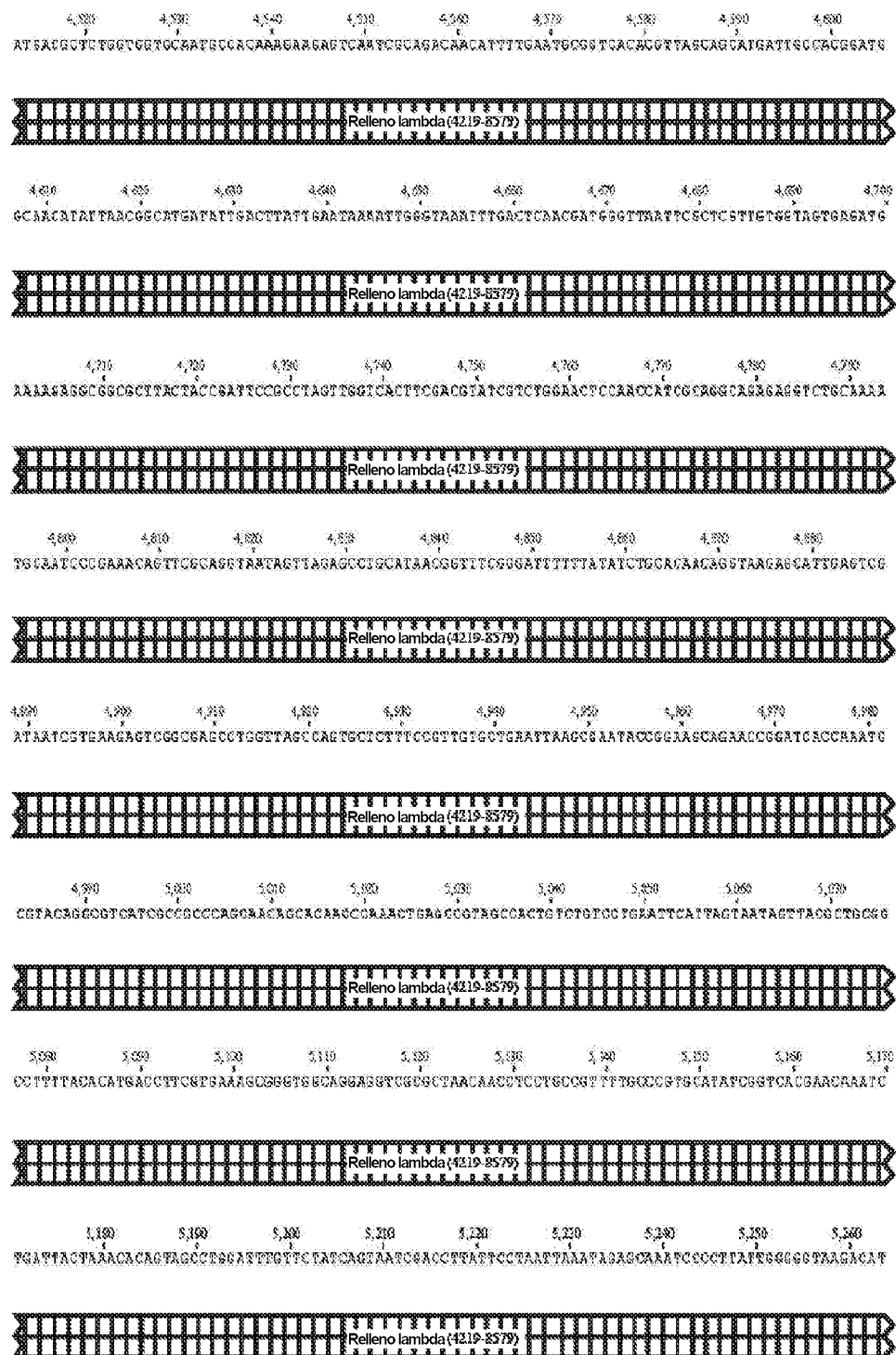


Figura 13 (continuación)



pAAV-ApoE hAAT-FIX3

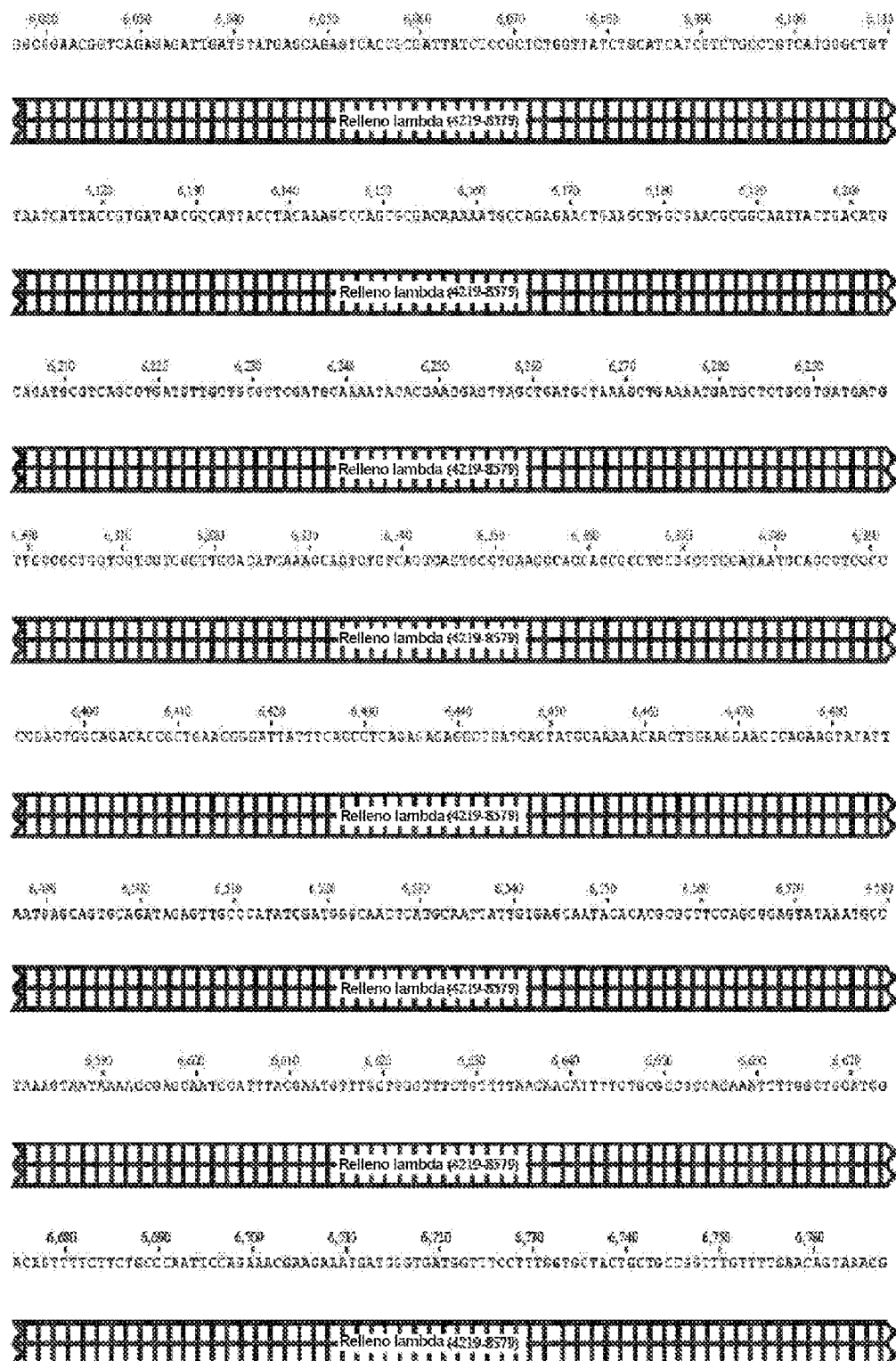


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

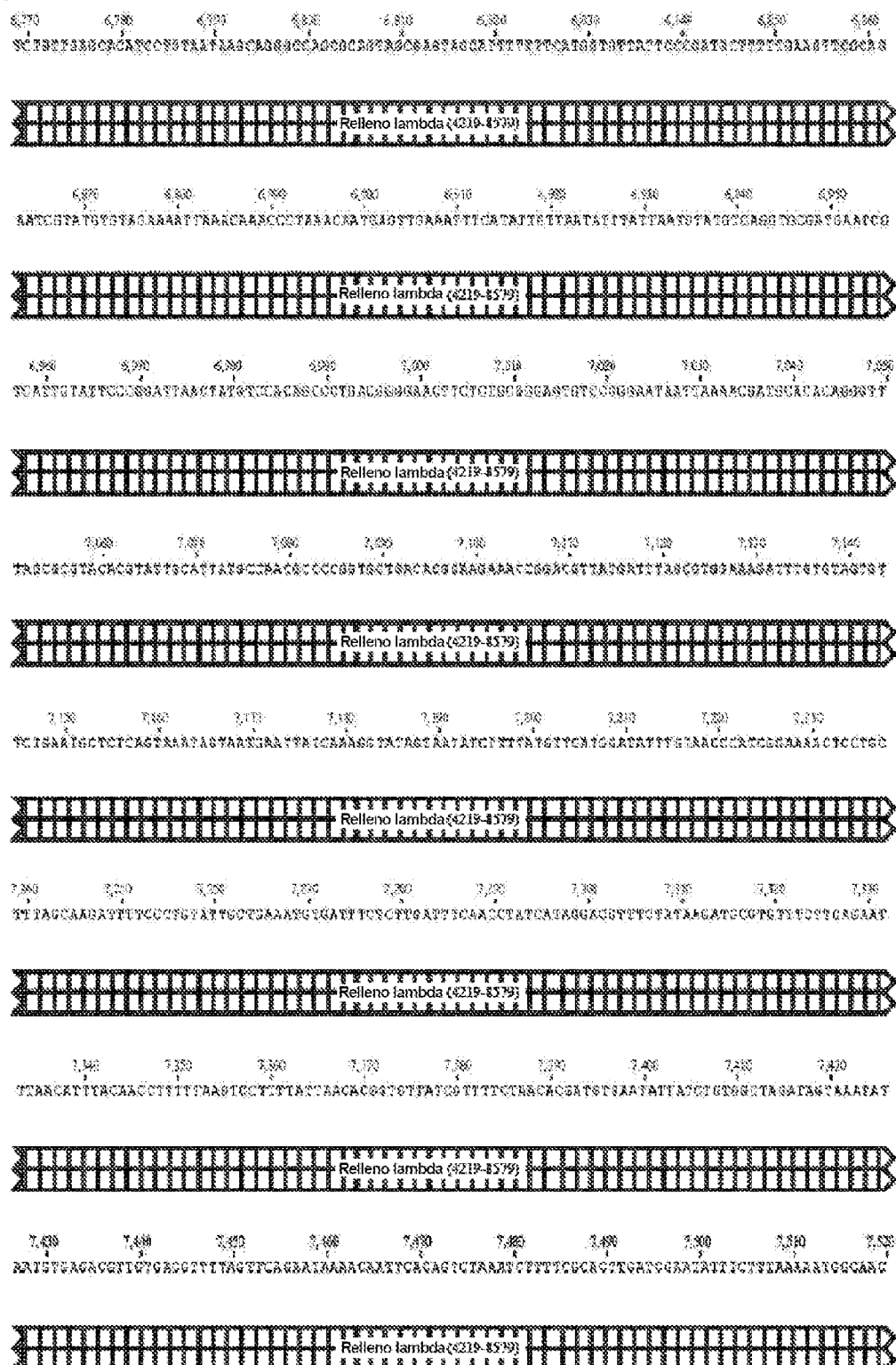


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

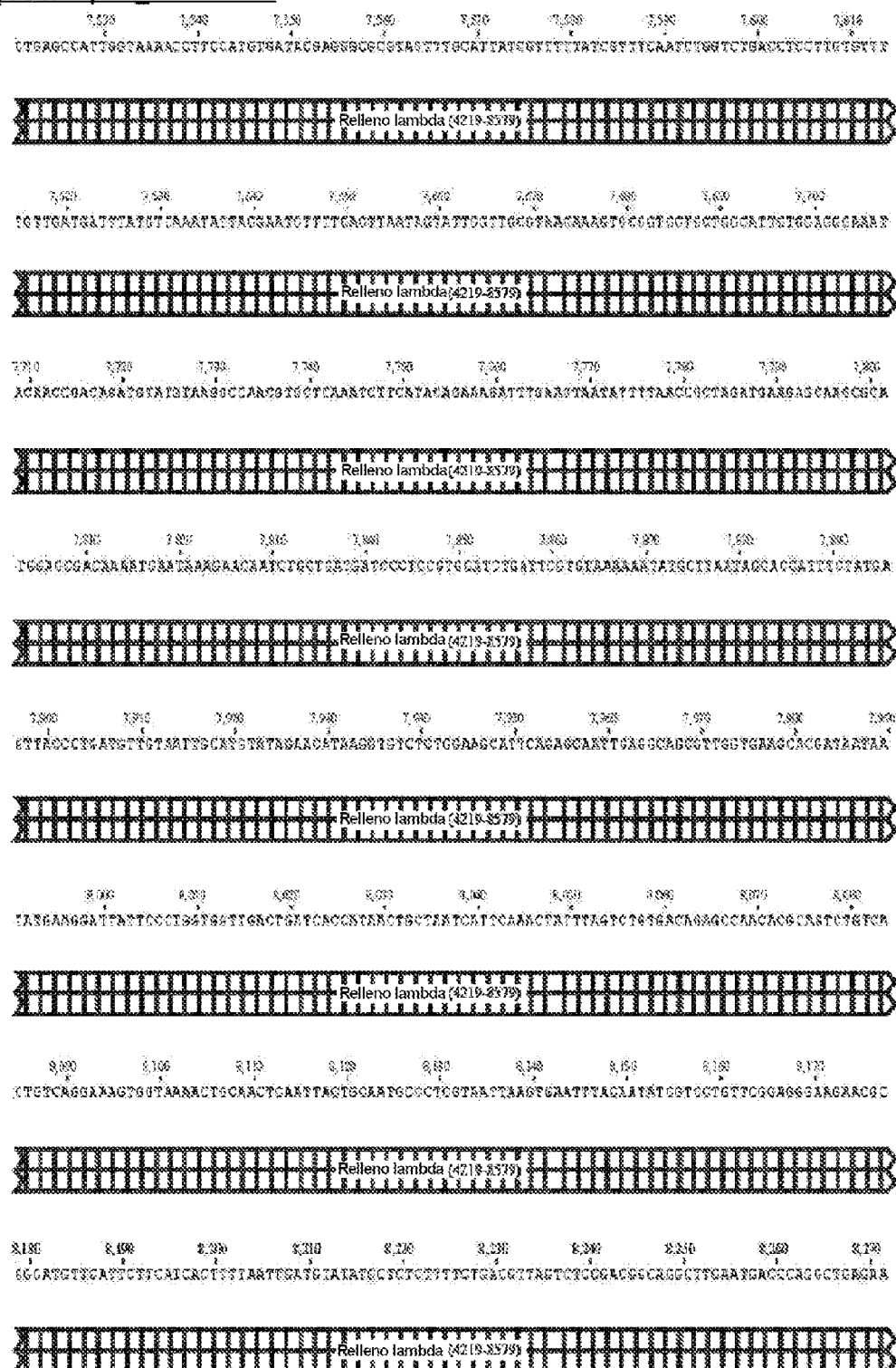


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

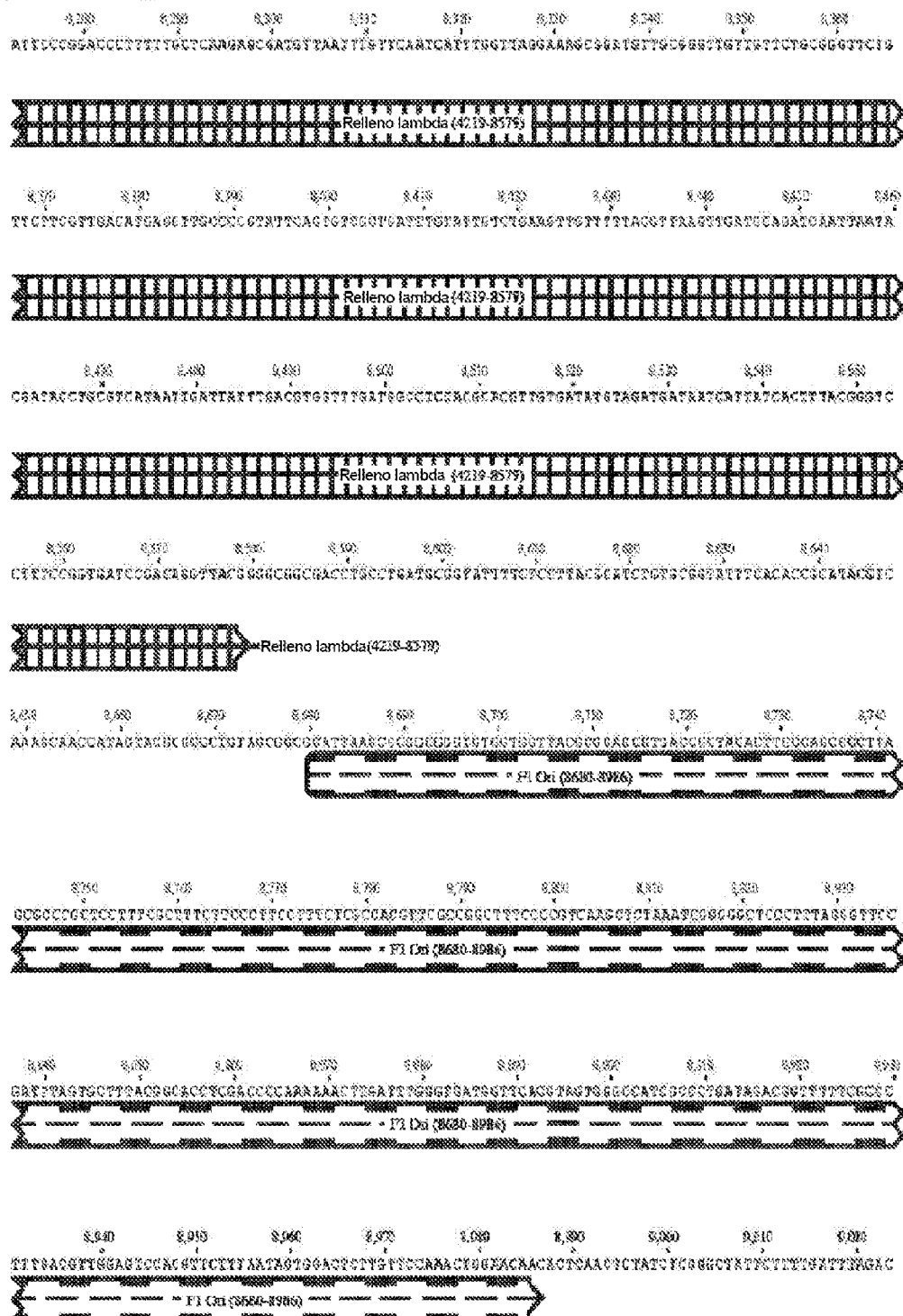


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

[illegible]

Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE hAAT-FIX3

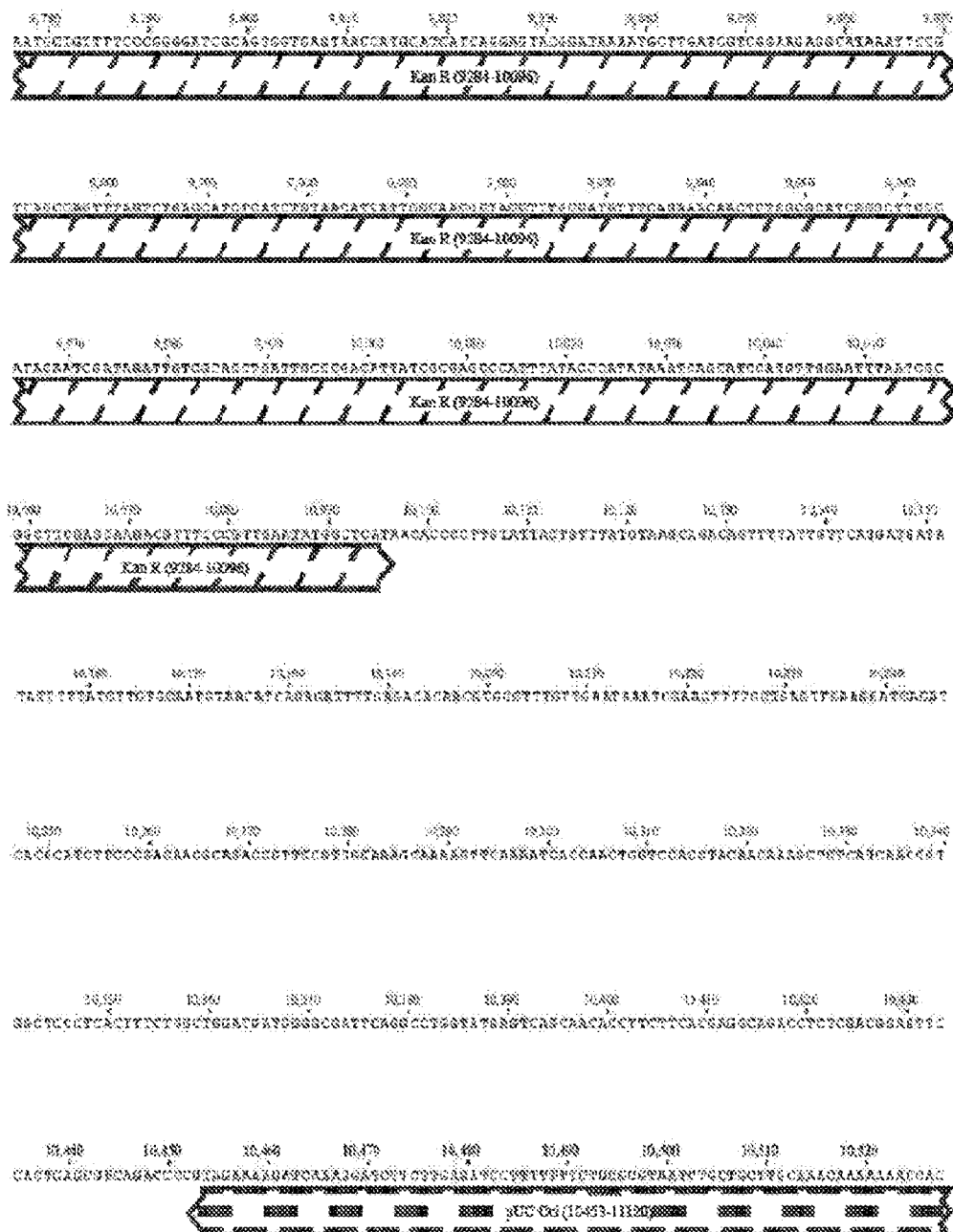


Figura 13 (continuación)

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3

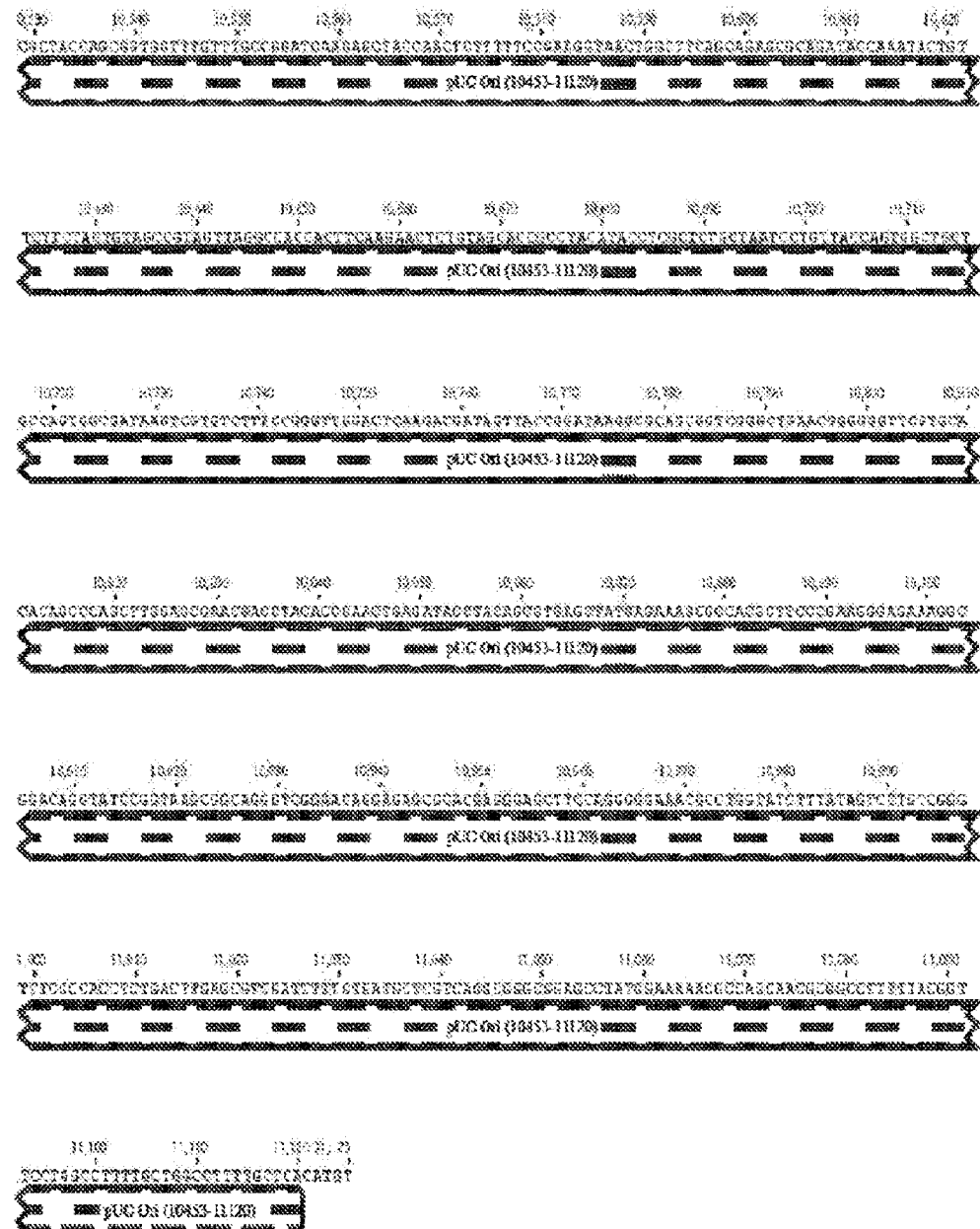


Figura 13 (continuación)

Secuencia de ácido nucleico de intrón A (SEC ID n.º 17):

GTTTGTTCCTTTTTTATAATACATTGAGTATGCTTGCCTTTTAGATATAGAAATATCTGATTCTGTC
 TTCTTCACTAAATTTTGATTACATGATTTGACAGCAATATTGAAGAGTCTAACAGCCAGCACCCAG
 GTTGGTAAGTACTGGTTCCTTTGTTAGCTAGGTTTCTTCTTCACTTTTAACTAAATAGATGG
 ACAATGCTTATGATGCAATAAGGTTTAATAAACTGTTTCAGTTCAGTATTTGGTCATGTAATTCCT
 GTTAAAAACAGTCATCTCCTTGGTTTAAAAAAATTAAAAGTGGGAAAAACAAAGAAATAGCAGAA
 TATAGTGAAAAAAATAACCACAGTATTTTGTGTTGGACTTACCACCTTTGAAATCAAATTGGGAAA
 CAAAAGCACAAACAGTGGCCTTATTTACACAAAAAGTCTGATTTTAAGATATGTGACAATTCAG
 GTTTCAGAAGTATGTAAGGAGGTGTGTCTCTAATTTTTTAAATTATATATCTTCAATTTAAAGTTTT
 AGTTAAACATAAAGATTAACCTTTTATTAGCAAGCTGTTAGTTATCACCAAAGCTTTTCATGGAT
 TAGGAAAAAATCATTTTGTCTCTATCTCAAACATCTTGGAGTTGATATTTGGGGAACACAATACT
 CAGTTGAGTTCCTAGGGGAGAAAAAGCAAGCTTAAGAATTGACACAAAGAGTAGGAAGTTAGCTA
 TTGCAACATATATCACTTTGTTTTTTACAACTACAGTGACTTTATTTATTTCCAGAGGAAGGCAT
 ACAGGGAAGAAATTATCCCATTTGGACAAACAGCATGTTTCTACAGTAAGCACTTATCACACTTAC
 TTGTCAACTTTCTAGAATCAAATCTAGTAGCTGACAGTACCAGGATCAGGGGTGCCAACCCTAAGC
 ACCCCCAGAAAGCTGACTGGCCCTGTGGTTCCCACTCCAGACATGATGTCAGCTGTGAAATCCACC
 TCCCTGGACCATAATFAGGCTTCTGTTCTCAGGAGACATTTGTTCAAAGTCATTTGGGCAACCATA
 TTCTGAAAAACAGCCCAGCCAGGCTGATGGATCACTTTGCAAAGATCCTCAATGAGCTATTTTCAAG
 TGATGACAAAGTGTGAAGTTAAGGGCTCATTTGAGAACTTTCTTTTTCATCCAAAGTAAATTCAAA
 TATGATTAGAAATCTGACCTTTTATTACTGGAATTCCTTGGACTAAAAGTAAAATTGAATTTTAATT
 CCTAAATCTCCATGTGTATACAGTACTGTGGGAACATCACAGATTTTGGCTCCATGCCCTAAAGAG
 AAATTGGCTTTTCAGATTATTTGGATTAAAAACAAAGACTTCTTAAGAGATGTAAAAATTTTCATGA
 TGTTCCTTTTTTGCTAAAACTAAAGAATTATTTTACATTTTCAG

Secuencia de ácido nucleico de FIX39, incluyendo el intrón A (el intrón A está subrayado) (SEC ID n.º 25)

ATGCAGAGGGTGAACATGATCATGGCTGAGAGCCCTGGCCTGATCACCATCTGCCTGCTGGGCTAC
 CTGCTGTCTGCTGAATGTACAGGTTTGTTCCTTTTTATAATACATTGAGTATGCTTGCCTTTTAGA
TATAGAAATATCTGATTCTGTCTTCTTCACTAAATTTTGATTACATGATTGACAGCAATATTGAAG
AGTCTAACAGCCAGCACCCAGGTTGGTAAGTACTGGTCTTTGTTAGCTAGGTTTCTTCTTCTTCA
CTTTTAAACTAAATAGATGGACAATGCCTTATGATGCAATAAGGTTTAAATAAACACTGTTCAAGTTC
AGTATTTGGTCATGTAATTCCTGTTAAAAAACAGTCATCTCCTTGGTTTAAAAAAATTAAAAAGTGG
GAAAAACAAAGAAATAGCAGAATATAGTGAATAAAAAATAACCACAGTATTTTGTGTTGGACTTACC
ACTTTGAAATCAAATTGGGAAACAAAAGCACAAACAGTGGCCTTATTTACACAAAAAGTCTGATT
TAAAGATATGTGACAATTCAGGTTTCAGAAAGTATGTAAGGAGGTGTGTCTCTAATTTTTTAAATT
ATATATCTTCAATTTAAAGTTTTAGTTAAAAATATAAGATTAACTTTCAATTAGCAAGCTGTTAGTT
ATCACCAAAGCTTTTCATGGATTAGGAAAAATCATTTTGTCTCTATCTCAAACATCTTGGAGTTG
ATATTTGGGGAAACACAATACTCAGTTGAGTTCCCTAGGGGAGAAAAAGCAAGCTTAAGAATTGAC
ACAAAGAGTAGGAAGTTAGCTATTGCAACATATATACACTTTGTTTTTACAACTACAGTGACTTT
ATTTATTTCCAGAGGAAGGCATACAGGGAAGAAATTATCCCATTTGGACAAAACAGCATGTTCTCA
CAGTAAGCACTTATCACACTTACTTGTCAACTTTCTAGAATCAAATCTAGTAGCTGACAGTACCAG
GATCAGGGGTGCCAACCCCTAAGCACCCCCAGAAAGCTGACTGGCCCTGTGGTTCCCACTCCAGAC
ATGATGTCAGCTGTGAAATCCACCTCCCTGGACCATAATTAGGCTTCTGTTCTTCAGGAGACATTT
GTTCAAAGTCATTTGGGCAACCATATCTGAAAAACAGCCAGCCAGGGTGATGGATCACTTTGCAA
AGATCCTCAATGAGCTATTTCAAGTGATGACAAAGTGTGAAGTTAAGGGCTCATTTGAGAAGTTT
CTTTTCATCCAAAGTAAATTCAAATATGATTAGAAATCTGACCTTTTATTACTGGAATTCCTTGA
CTAAAAGTAAATTTGAATTTTAATTCCTAAATCTCCATGTGTATACAGTACTGTGGGAACATCACA
GATTTTGGCTCCATGCCCTAAAGAGAAATTGGCTTTTCAAGATTATTTGGATTAAAAACAAAGACTTT
CTTAAGAGATGTAATAATTTTCATGATGTTTTCTTTTTTGTCTAAAACTAAAGAATTATCTTTTACAT
TTCAAGTTTTCTTGATCATGAAATGCCAACAAAATTCGAATAGACCAAGAGGTATAACTCTGG
 CAAGCTTGAAGAGTTTGTACAGGGGAATCTGGAGAGAGAGTGTATGGAAGAGAAGTGCAGCTTTG
 AGGAAGCCAGAGAAGTGTTTGAAAATACAGAGAGAACTGAATTTTGGAAAGCAGTATGTGGAT
 GGTGATCAATGTGAGAGCAATCCCTGCTTGAATGGGGGAGCTGTAAAGATGATATCAACAGCTA
 TGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAGGGGAAAACTGTGAGCTTGATGTGACCTGTAATATCAA
 GAATGGCAGGTGTGAGCAATTTTGAAGAATTTCTGCTGATAACAAAGTGGTCTGTAGCTGCACTGA
 GGGATATAGGCTGGCTGAAAACAGAGAGCTGTGAACCTGCAGTGCCTTTTCCCTGTGGGAGAG
 TGTCTGTGAGCCAAACCAGCAAGCTGACTAGGGCTGAAGCAGTCTTTCCCTGATGTAGATTATGTGA
 ATAGCACTGAGGCTGAGACAATCCTTGACAATATCACTCAGAGCACACAGAGCTTCAATGACTTC
 ACCAGGGTGGTAGGAGGGGAGGATGCCAAGCCTGGGCAGTTCCCTGGCAGGTAGTGTCTCAATGG
 AAAAGTGGATGCCTTTTGTGGAGGTTCAATTGTAAATGAGAAGTGGATTGTGACTGCAGCCCACTG
 TGTGGAACCTGGAGTCAAGATTACTGTGCTGGCTGGAGAGCACAATATTGAGGAACTGAGCACA
 CTGAGCAGAAGAGGAATGTGATCAGGATTTATCCCCCACCACAACCTACAATGCTGCTATCAACAAG
 TACAACCATGACATTGCCCTCTGGAACTGGATGAACCCCTGGTCTTGAACAGCTATGTGACACCC
 ATCTGTATTGCTGATAAAGAGTACACCAACATCTTCTTGAAATTTGGGTCTGGATATGTGTCTGGCT
 GGGGCAGGGTGTCCATAAAGGCAGGTCTGCCCTGGTATTGCAGTATTTGAGGGTGCCTCTGGTGG
 ATAGAGCAACCTGCTTGCTGAGCACCAAGTTTACAATCTACAACAATATGTTCTGTGCAGGGTTCC
 ATGAAGGTGCTAGAGACAGCTGCCAGGGAGATTCTGGGGTCCCATGTGACTGAGGTGGAGGGA
 ACCAGCTTCTGACTGGGATTATCAGCTGGGGTGAGGAGTGTGCTATGAAGGGAAAGTATGGGAT
 CTACACAAAAGTATCCAGATATGTGAACCTGGATTAAAGGAGAAAACCAAGCTGACTTGA

Figura 15

Eficiencia de transducción de AAV-variante de cápside 4-1 (SEC ID n.º 4)
analizada en un contexto *in vitro*

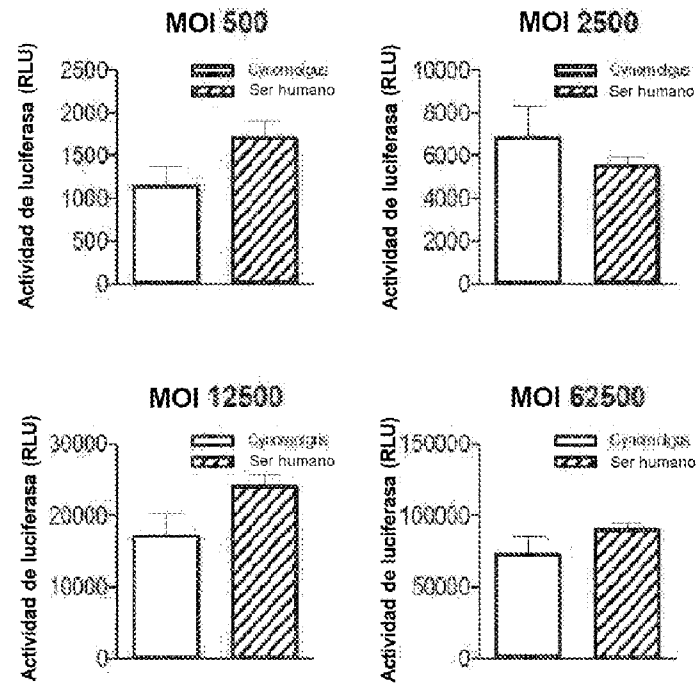


Figura 16

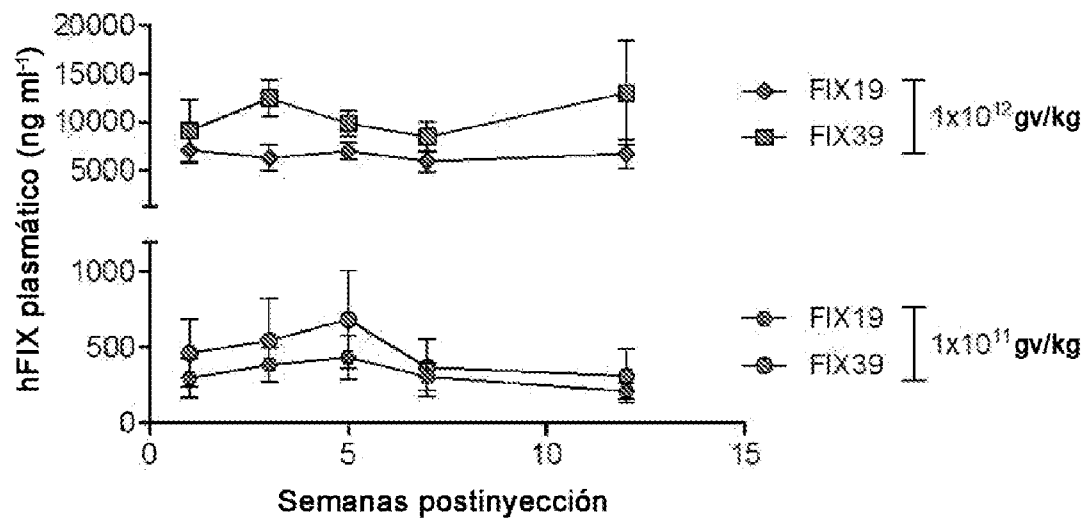


Figura 17

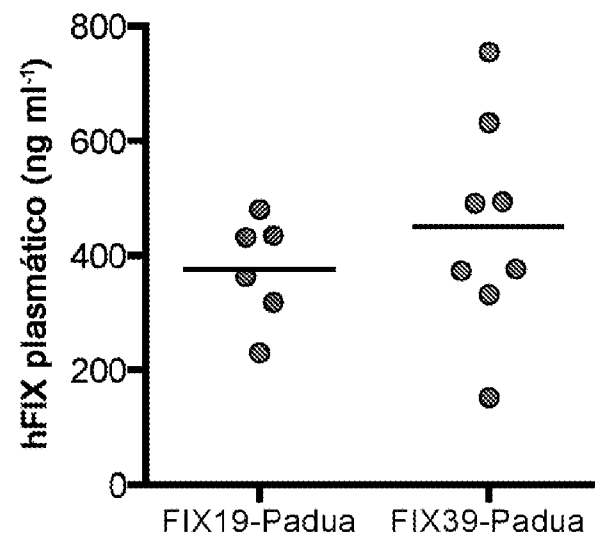


Figura 18

Comparación de los niveles de actividad temprana de FIX:C para los primeros 4 sujetos

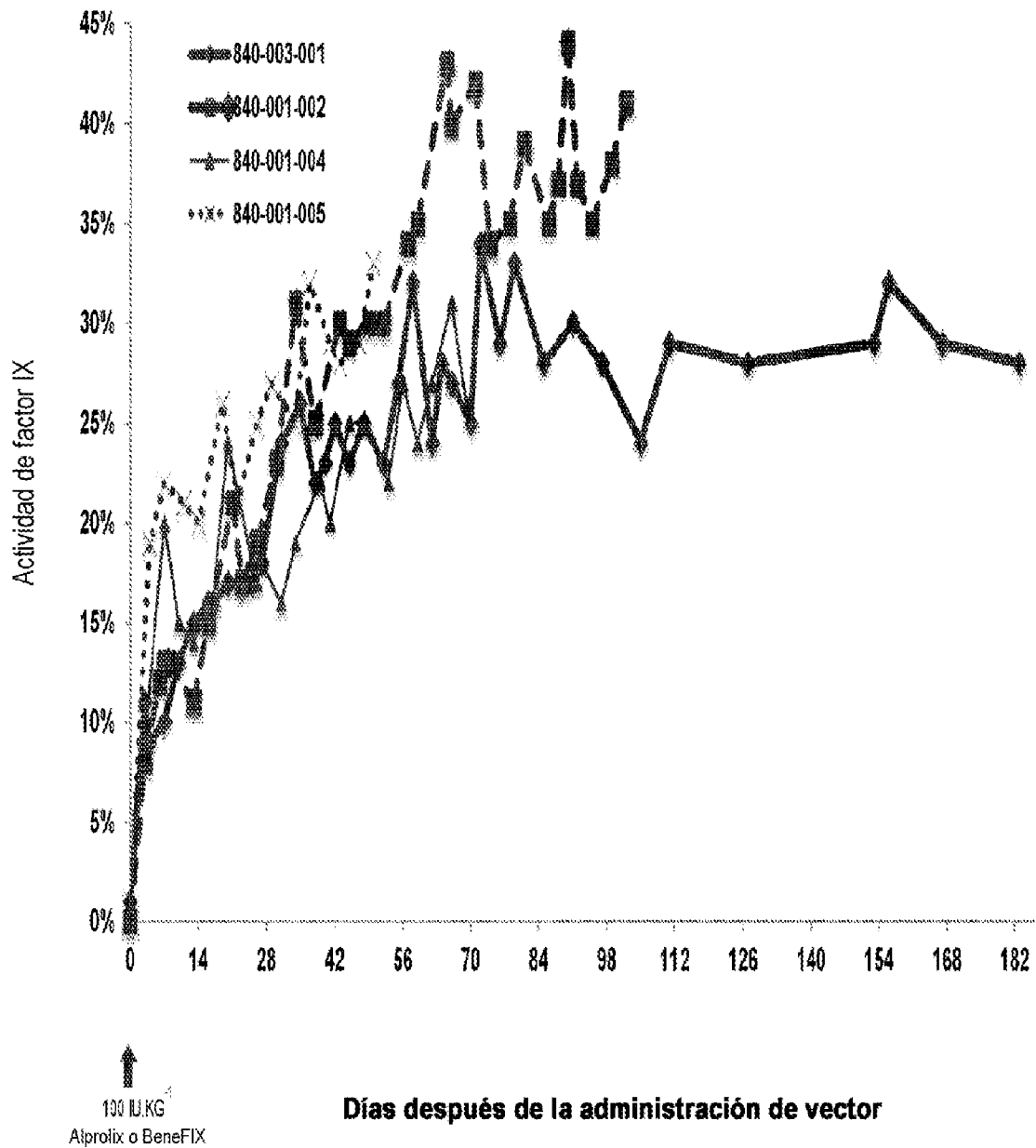


Figura 19

AAV-FIX39-Padua: 1º sujeto, día 183 Nivel de actividad de FIX:C a 28 %

Sujeto 1 [5×10^{11} gv/kg] 183 días después de la última infusión de Alprolix

Dosis: $4,08 \times 10^{13}$ gv de AAV-FIX39-Padua + $2,01 \times 10^{14}$ pc de cápsides vacías [1:5]

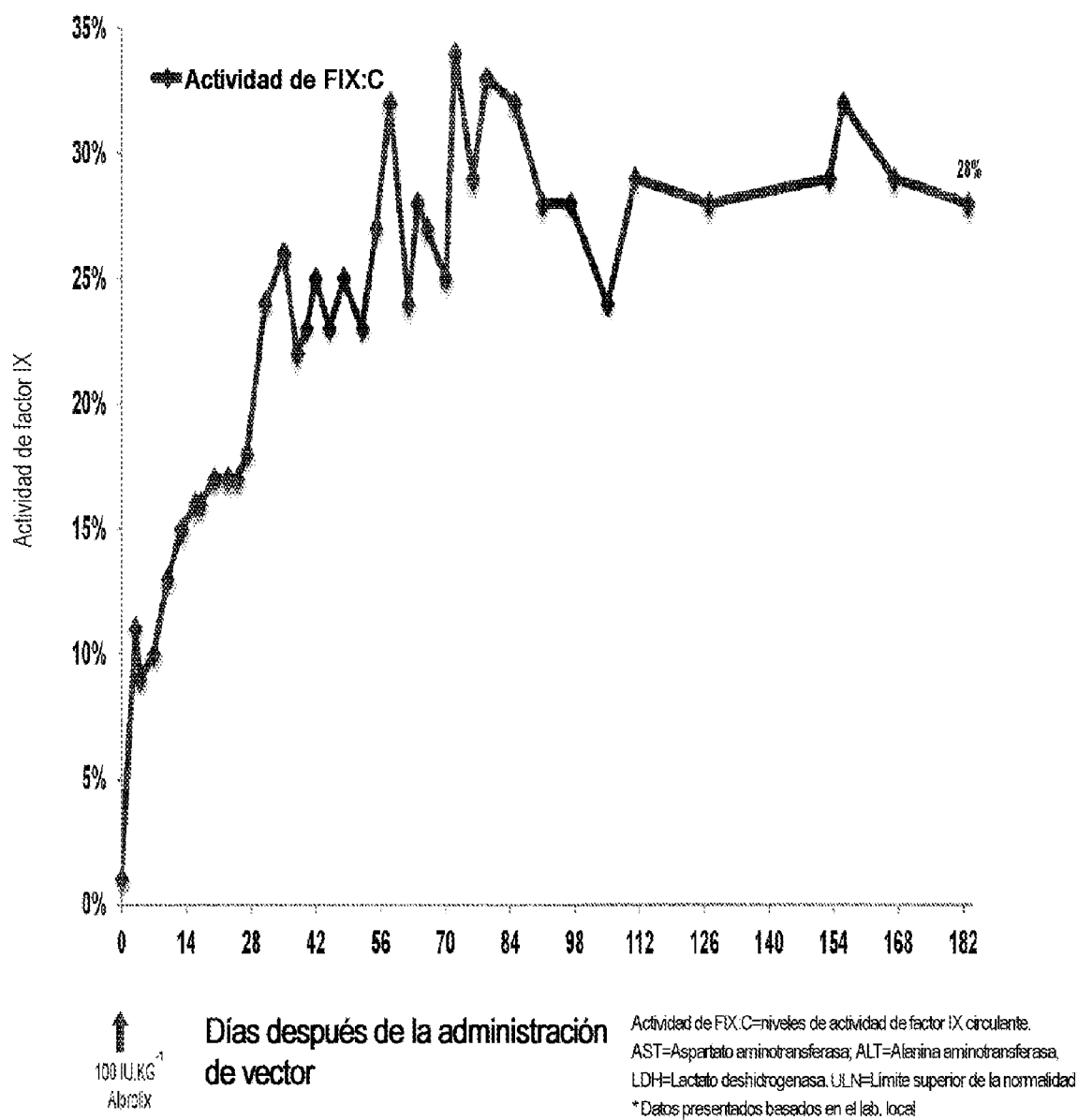


Figura 20A

AAV-FIX39-Padua: 1º sujeto, día 183 Funciones hepáticas

Sujeto 1 [5x10¹¹ gv/kg] 183 días después de última infusión de Alprolix

4,08x10¹³ gv de AAV-FIX39-Padua+2,01x10¹⁴ pc de cápsides vacías [1:5]

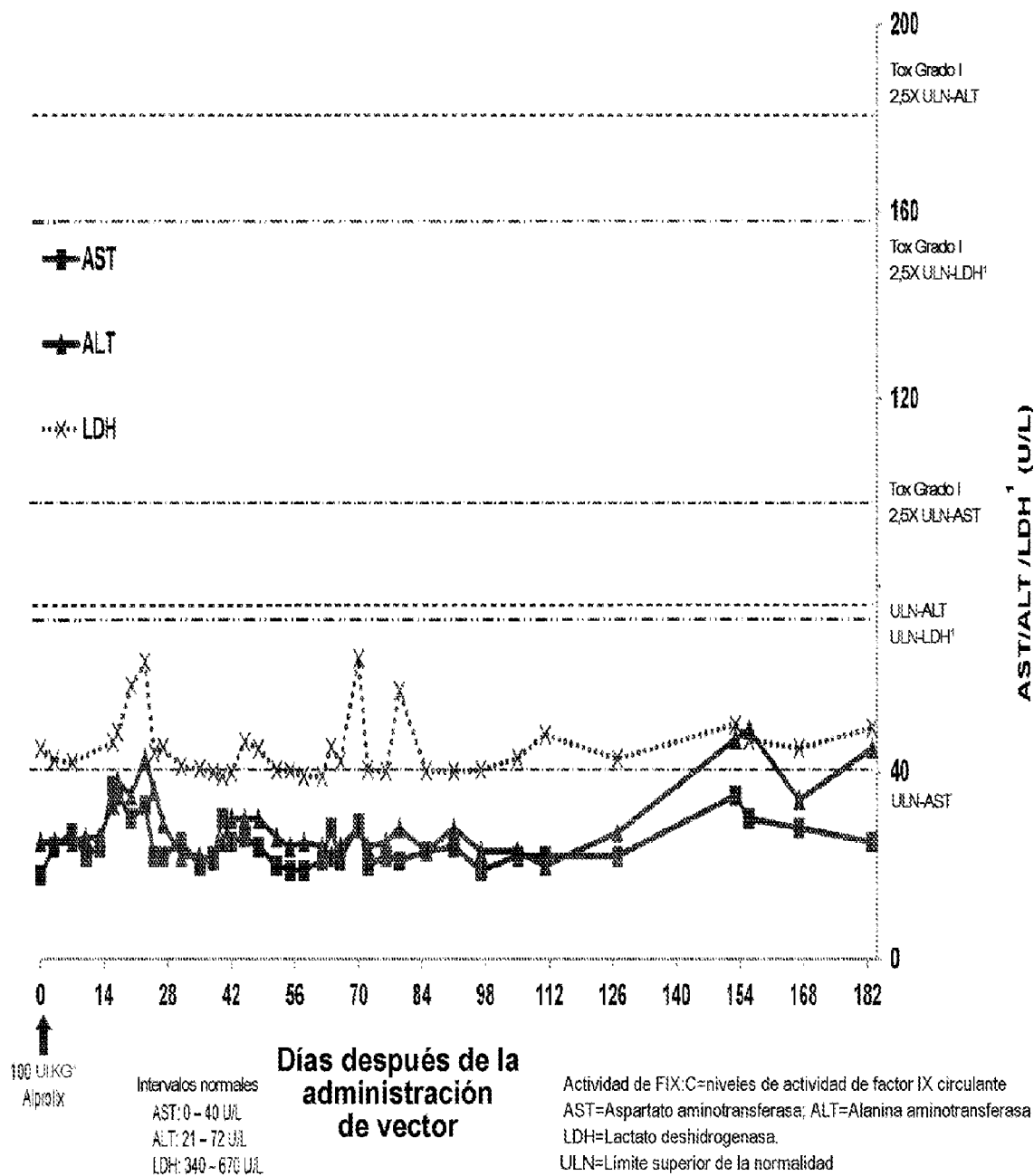


Figura 20B

AAV-FIX39-Padua: 2º sujeto, día 102 Nivel de actividad de FIX:C al 41 %

Sujeto 2 [5×10^{11} gv/kg] 102 días después de la última infusión de BeneFIX

Dosis: $2,84 \times 10^{13}$ gv de AAV-FIX39-Padua + $1,39 \times 10^{14}$ pc de cápsidas vacías [1.5]

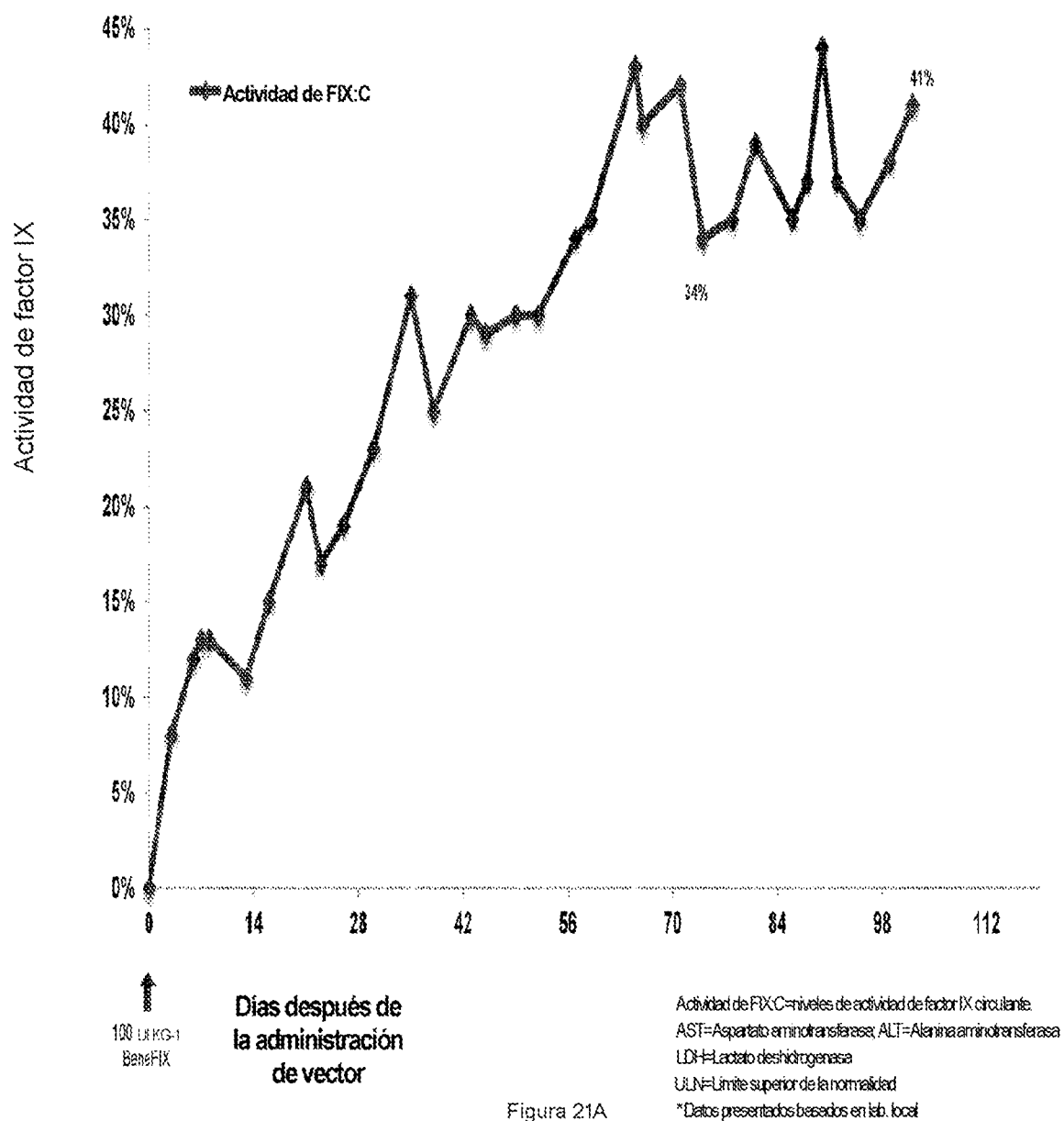
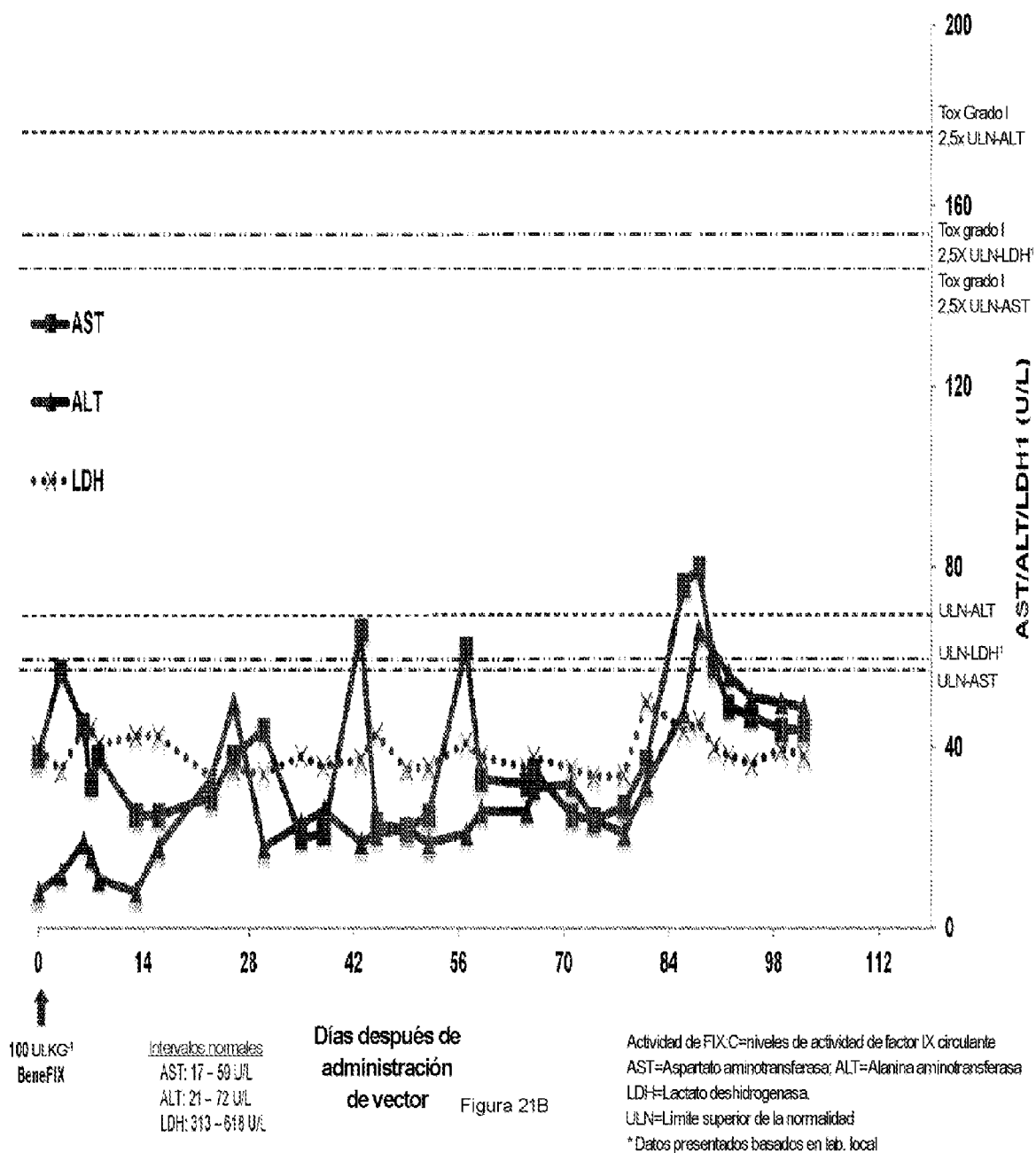


Figura 21A

AAV-FIX39-Padua: 2º sujeto, día 102 Funciones hepáticas

Sujeto 2 [5×10^{11} gv/kg] 102 días después de la última infusión de BeneFIX

$2,84 \times 10^{13}$ gv de AAV-FIX39-Padua + $1,39 \times 10^{14}$ pc de cápsides vacías [1:5]



AAV-FIX39-Padua: 3º sujeto, día 69 Nivel de actividad de FIX:C al 26 %
 Sujeto 3 [5×10^{11} gv/kg] 67 días después de la última infusión de Alprolix
 $5,38 \times 10^3$ gv de AAV-FIX39-Padua + $1,93 \times 10^{14}$ pc de cápsidas vacías [1:4]

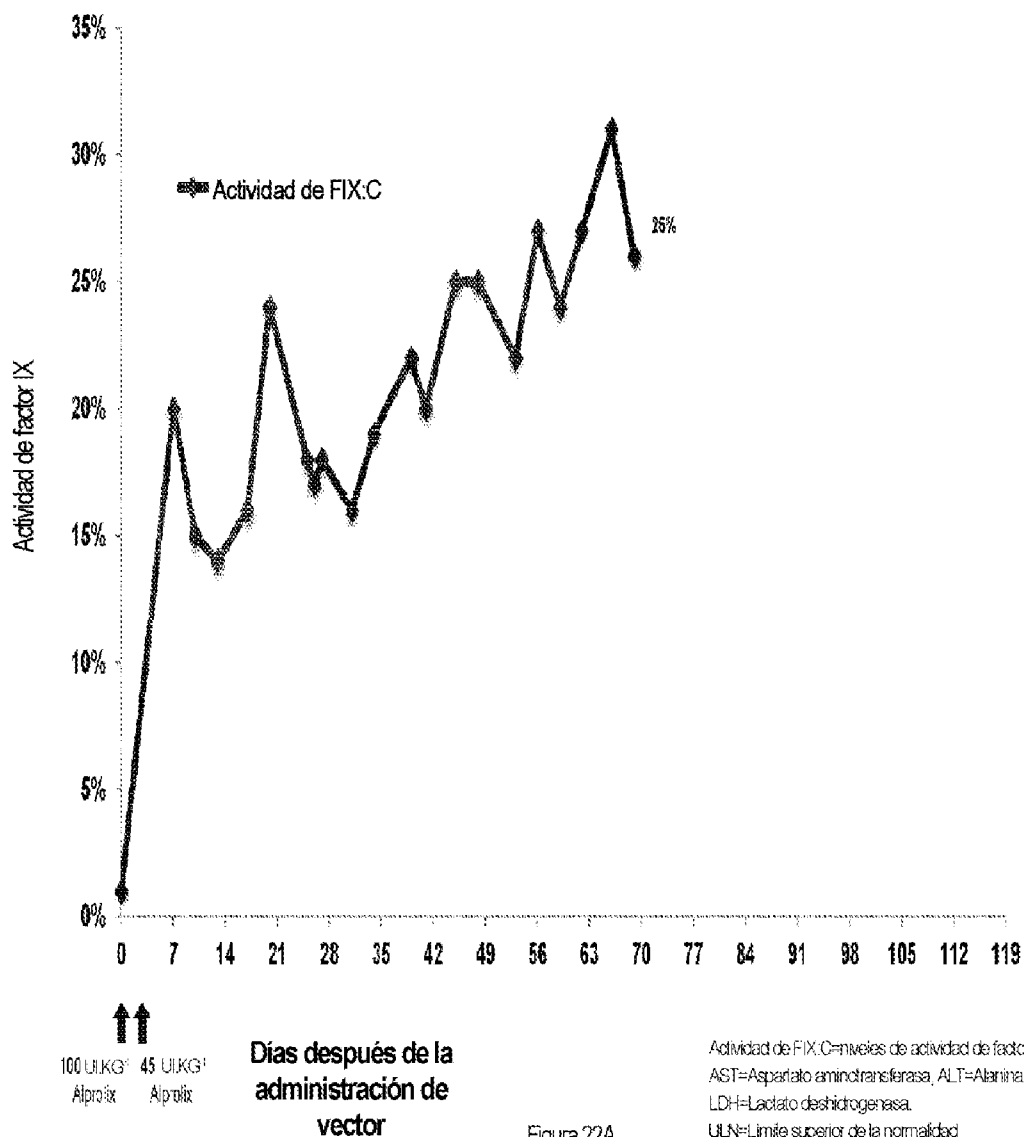
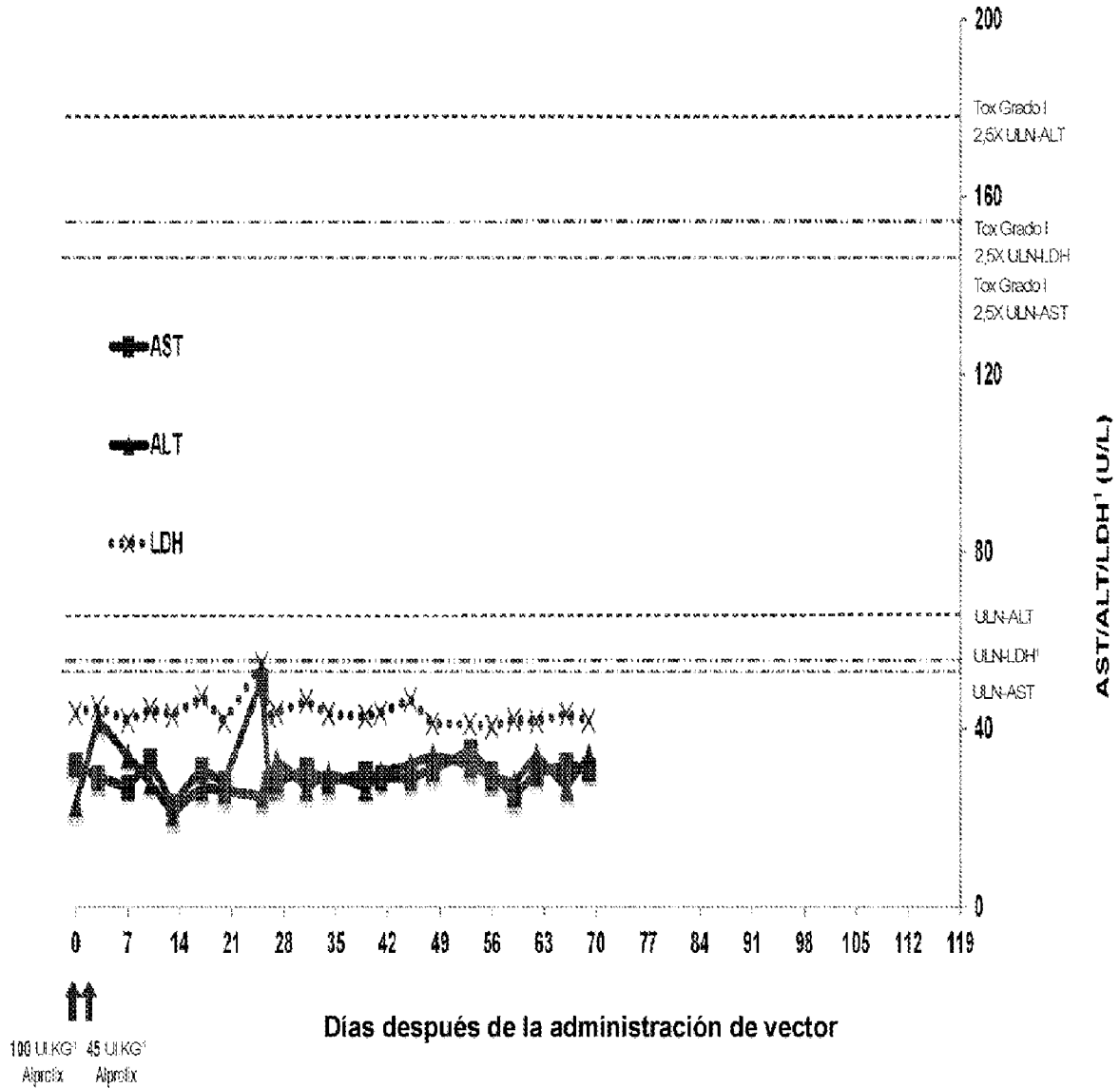


Figura 22A

AAV-FIX39-Padua: 3º sujeto, día 69 Funciones hepáticas

Sujeto 3 [5×10^{11} gv/kg] 67 días después de la última infusión de Alprolix

$5,38 \times 10^{13}$ gv de AAV-FIX39-Padua + $1,93 \times 10^{14}$ pc de cápsidas vacías [1:4]



Intervalos normales

AST: 17 – 59 U/L

ALT: 21 – 72 U/L

LDH: 313 – 518 U/L

Figura 22B

Actividad de FIX:C=niveles de actividad de factor IX circulante

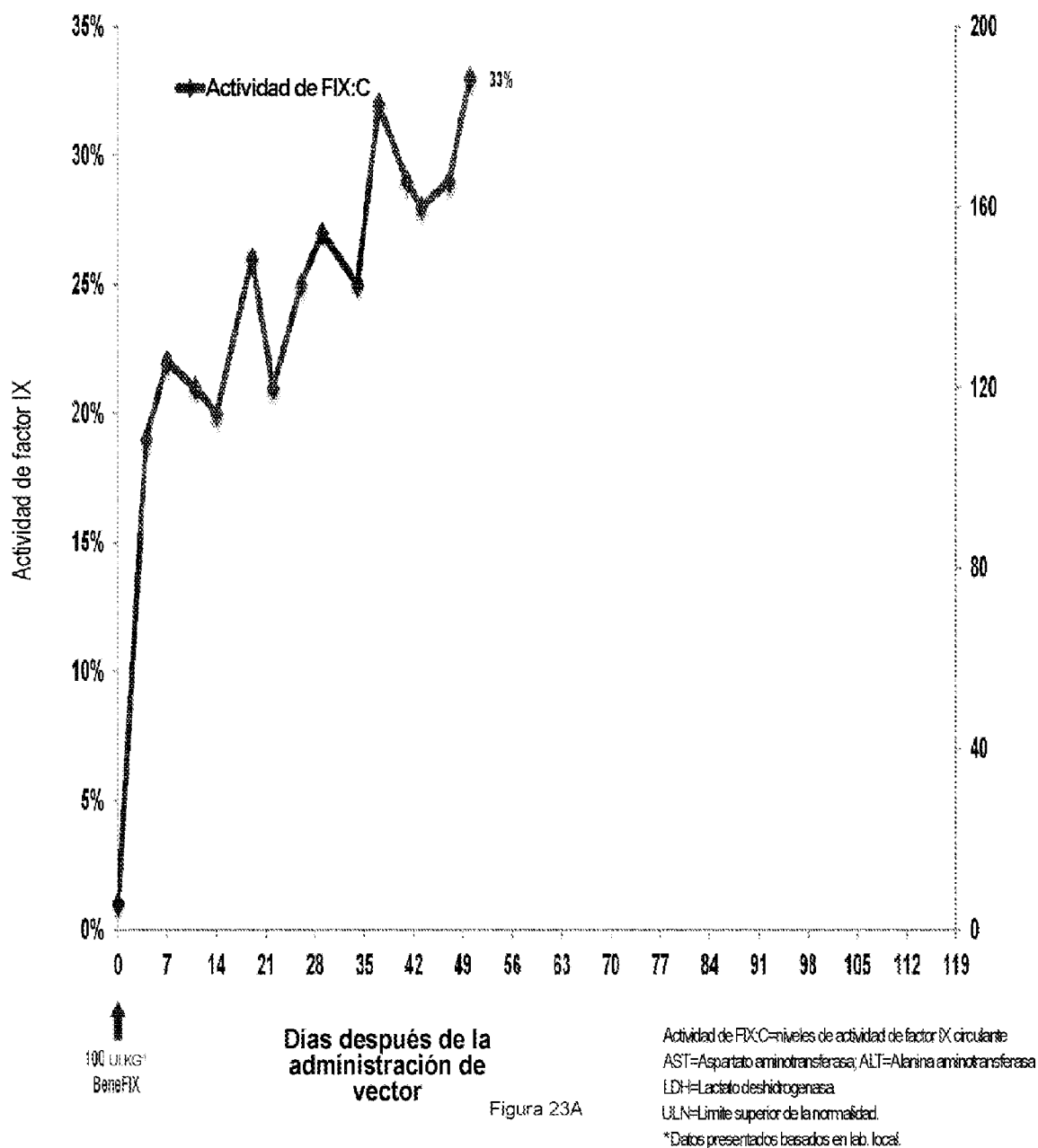
AST=Aspartato aminotransferasa, ALT=Alanina aminotransferasa

LDH=Lactato deshidrogenasa.

ULN=Límite superior de la normalidad

* Datos presentados basados en lab. local

AAV-FIX39-Padua: 4º sujeto, día 50 Nivel de actividad de FIX:C al 33 %
 Sujeto 4 [5×10^{11} gv/kg] 50 días después de la última infusión de BeneFIX
 $5,57 \times 10^{13}$ gv de AAV-FIX39-Padua + $2,22 \times 10^{14}$ pc de cápsides vacías [1:4]



AAV-FIX39-Padua: 4º sujeto, día 50 Funciones hepáticas

Sujeto 4 [5x10¹¹ gv/kg] 50 días después de la última infusión de BeneFIX

5,57x10¹¹ gv de AAV-FIX39-Padua + 2,22x10¹⁴ pc de cápsidas vacías [1:4]

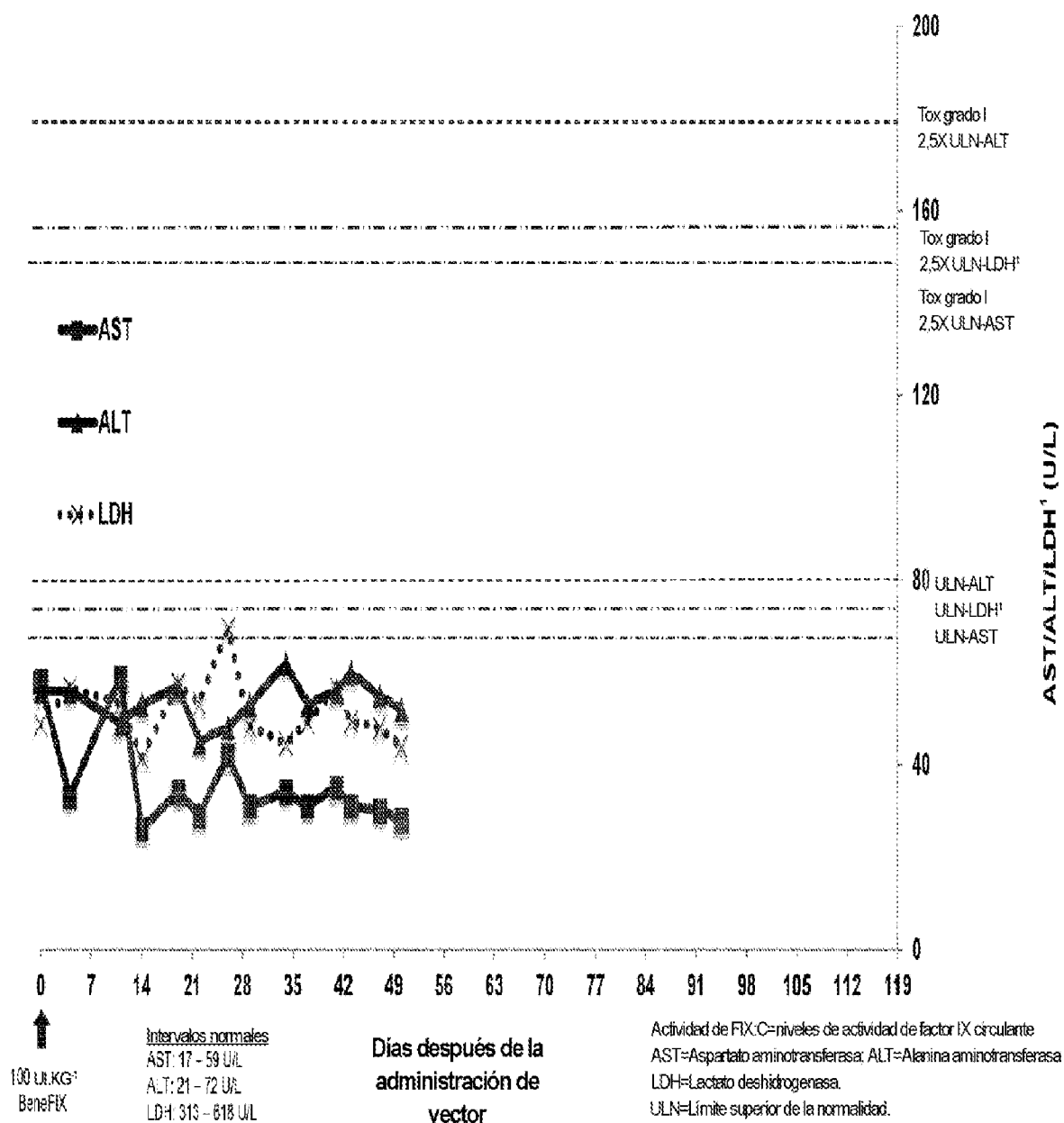
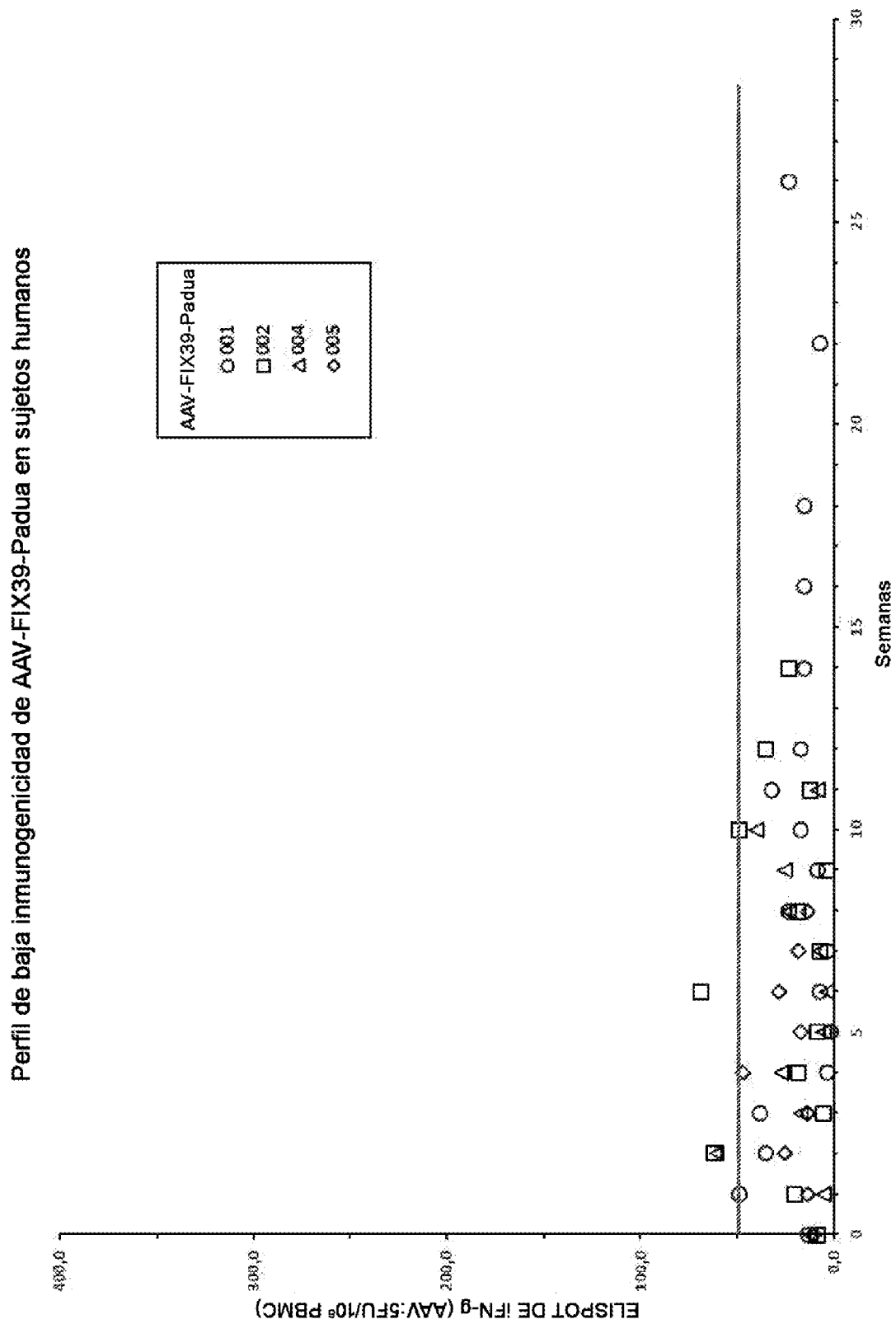


Figura 23B



Inmunogenicidad comparativa de vectores AAV en sujetos humanos

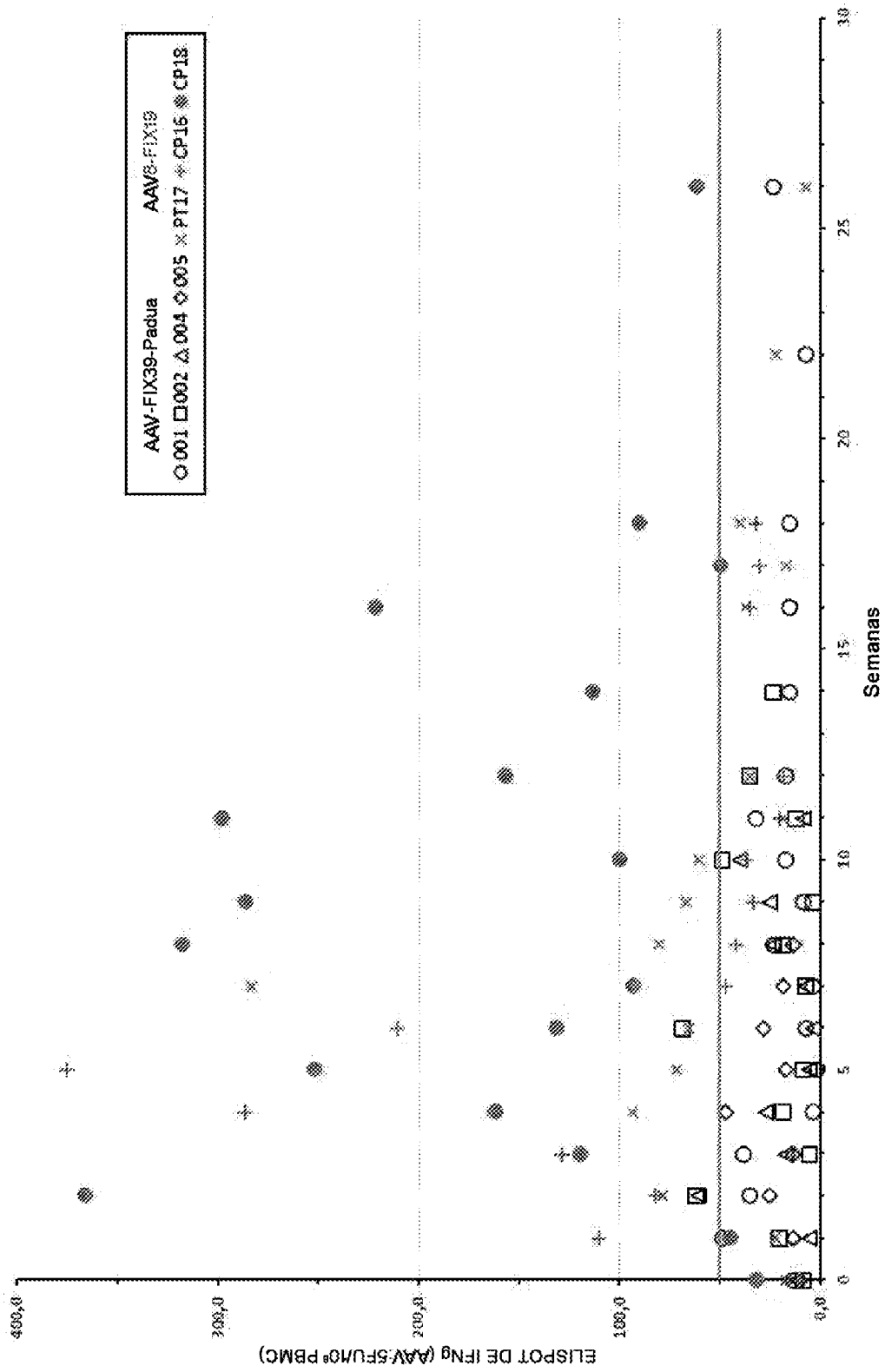


Figura 24B