

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 915**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/37** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2015** **PCT/US2015/045142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016** **WO16025764**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2015** **E 15832128 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3180022**

54 Título: **Casete de expresión mejorado para el empaquetado y la expresión del factor VIII variante para el tratamiento de los trastornos de la hemostasia**

30 Prioridad:

**13.08.2014 US 201462036936 P**

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

**13.01.2025**

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA**  
**(25.00%)**

**3401 Civic Center Boulevard**  
**Philadelphia, PA 19104, US;**  
**SABATINO, DENISE (25.00%);**  
**HIGH, KATHERINE A. (25.00%) y**  
**ELKOUBY, LIRON (25.00%)**

72 Inventor/es:

**SABATINO, DENISE;**  
**ELKOUBY, LIRON y**  
**HIGH, KATHERINE A.**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

ES 2 993 915 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

Casete de expresión mejorado para el empaquetado y la expresión del factor VIII variante para el tratamiento de los trastornos de la hemostasia

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la producción de factor de coagulación recombinante y de tratamiento de trastornos médicos asociados a la hemostasia aberrante. Más particularmente, la invención proporciona un casete de expresión mejorado que empaqueta más eficientemente la secuencia variante del factor VIII de la invención, en el que la variante mejorada asimismo muestra una actividad incrementada respecto a las proteínas de factor VIII de tipo salvaje.

### Introducción

A lo largo de la memoria descriptiva se citan varias publicaciones y documentos de patente con el fin de describir el estado de la técnica a la que se refiere la presente invención. Cada una de estas citas se incorpora en la presente memoria como referencia como si se hubiera expuesto en su totalidad.

La hemofilia es un trastorno hemorrágico ligado al cromosoma X presente en 1 de cada 5.000 varones en todo el mundo. Las terapias destinadas a incrementar los niveles de factor de coagulación hasta justo superar el 1 % del nivel normal están asociadas a una mejora sustancial del fenotipo grave de la enfermedad. Unos ensayos clínicos recientes para la transferencia génica mediada por AAV de la hemofilia B (HB) han demostrado la expresión a largo plazo sostenida de niveles terapéuticos de factor IX (FIX), aunque establecieron que la dosis de vector de AAV podría ser limitante debido a respuestas inmunitarias anti-AAV contra la cápside del AAV. Aunque estos datos se refieren a la hemofilia B, 80 % de todas las hemofilias se deben a la deficiencia de FVIII: hemofilia A (HA).

El tratamiento actual para esta enfermedad es la terapia de sustitución de la proteína, que requiere la infusión frecuente de la proteína factor VIII. Existe una necesidad inmediata de alcanzar niveles terapéuticos sostenidos de expresión de factor VIII de manera que los pacientes ya no requieran dichos tratamientos frecuentes de proteína. En efecto, la expresión continua de factor VIII evitaría los episodios hemorrágicos y podría garantizar el establecimiento de tolerancia inmunitaria a la proteína.

En resumen, la terapia génica para la HA plantea 3 claros retos: (1) las propiedades intrínseca del FVIII humano (hFVIII) dificultan expresarlo, en comparación con otras proteínas de tamaño similar, (2) el gran tamaño del ADNc del FVIII y efectos específicos de secuencia correlacionan con reorganizaciones que dificultan la producción de AAV, y (3) las tasas elevadas de formación de anticuerpo anti-FVIII (inhibidores) en respuesta a la terapia de proteína, que ocurren en 25 % a 30 % de los pacientes de HA grave (<1 % de FVIII).

La invención proporciona variantes mejoradas de factor VIII que resultan útiles para el tratamiento en pacientes que lo necesitan, tales como los pacientes de HA.

### Sumario

La invención se expone en el conjunto adjunto de reivindicaciones. Según la invención, se proporcionan variantes de ácido nucleico codificantes de factor VIII (FVIII) de codones optimizados, diferentes del ácido nucleico de tipo salvaje codificante del FVIII de tipo salvaje. Tales variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII de codones optimizados codifican la proteína FVIII, opcionalmente sin un dominio B, tal como la proteína FVIII (por ejemplo, la proteína FVIII humana) sin un dominio B (ver, por ejemplo, la figura 1). Tales variantes de ácido nucleico que codifican FVIII de codones optimizados muestran una expresión incrementada en 4 a 5 veces para una secuencia particular de codones optimizados (CO/CO3), al transferirla hasta el interior la célula (ver, por ejemplo, la figura 6B), conduciendo a una secreción, y por lo tanto actividad, incrementada de la proteína FVIII (ver, por ejemplo, la figura 7). Tales variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII de codones optimizados asimismo se empaquetan más eficientemente en diferentes serotipos de vector de AAV, llevando a una producción incrementada de vectores de AAV de todos los serotipos de AAV (ver, por ejemplo, las tablas 3 a 5).

Inesperadamente, dichas características incrementan drásticamente la expresión de FVIII, en comparación con la expresión de ácido nucleico de tipo salvaje que codifica FVIII de tipo salvaje, o la expresión de FVIII de tipo salvaje sin dominio B, y asimismo incrementa la eficiencia de empaquetado en un vector de AAV, llevando a mayores rendimientos de vector. Las secuencias codificantes de FVIII de codones optimizados podrían mostrar una reducción de los sucesos de reorganización que tienen un impacto sobre la integridad del transgén de FVIII tras el empaquetado del AAV que se observa con el FVIII de tipo salvaje y otros transgenes del hFVIII de codones optimizados, por ejemplo CO/CO3 es superior tanto a CO1 como a CO2. Además, las variantes de FVIII de codones no optimizados y de codones optimizados que presentan un cambio de un solo aminoácido o una eliminación ("deletion") pequeña (1 a 4 aminoácidos) en un sitio de escisión PACE-furina pueden mostrar un nivel incrementado de secreción *in vivo* (de codones no optimizados: figura 3B, y de codones optimizados: figura 6B) y de actividad

específica de la proteína FVIII. Las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII de la invención, que codifican para FVIII con o sin dominio B, y/o con o sin sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina mutado, pueden incrementar la expresión de FVIII, incrementar la producción de vector de AAV, así como proporcionar una mayor eficacia en el contexto de la transferencia génica mediante niveles circulantes incrementados de FVIII y conseguir la hemostasis con un menor nivel de FVIII, reduciendo de esta manera la dosis eficaz necesaria para resultados terapéuticos beneficiosos.

En una forma de realización, una variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) muestra una mayor expresión que la de FVIII de tipo salvaje. En otra forma de realización, una variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) comprende una eliminación del dominio B y muestra un nivel de expresión mayor que el de FVIII de tipo salvaje que comprende una eliminación del dominio B. En una forma de realización adicional, la variante de ácido nucleico codificante de FVIII se empaqueta más eficientemente en un vector vírico, tal como un vector de virus adenoasociado (AAV).

En una forma de realización adicional, un FVIII codificado por dicha variante de ácido nucleico muestra una actividad biológica superior en comparación con FVIII de tipo salvaje o en comparación con FVIII de tipo salvaje que comprende una eliminación del dominio B (por ejemplo, según se determina mediante un ensayo de coagulación o un nivel reducido de hemorragia en un ensayo de FVIII o modelo de deficiencia de FVIII).

En formas de realización todavía adicionales, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII de codones optimizados codifican proteína FVIII con un sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina mutado, denominada FVIII o proteína FVIII variante. Tales variantes de ácido nucleico de FVIII de codones optimizados que codifican la proteína FVIII con un sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina mutado muestran una actividad incrementada de secreción y coagulación sanguínea (ver, por ejemplo, las figuras 2, 6 y 7). En aspectos particulares, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII presentan 1, 2, 3 o la totalidad de los 4 codones que codifican el sitio de escisión PACE/furina de FVIII sustituidos o eliminados. En dichos aspectos, las proteínas FVIII variantes codificadas por tales variantes de ácido nucleico de FVIII presentan 1, 2, 3 o la totalidad de los 4 sitios de corte de PACE/furina de FVIII sustituidos o eliminados. En aspectos más particulares, 1, 2, 3 o la totalidad de los 4 codones que codifican el sitio de escisión PACE/furina expuestos como HHQR o RHQR entre las posiciones 1645 y 1648 está/están eliminados en variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII.

En aspectos adicionales, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII presentan uno o más codones de leucina cambiados a CTG en comparación con TTA, TTG, CTT, CTC o CTA en ácido nucleico codificante de FVIII de tipo salvaje. En aspectos adicionales, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII presentan 2 a 5, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 50, 50 a 100, 100 a 250, 250 a 500, 500 a 750 o 750 a 850 codones de leucina CTG modificados desde codones de leucina TTA, TTG, CTT, CTC o CTA en el ácido nucleico codificante de FVIII de tipo salvaje. En aspectos todavía adicionales, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII presentan todos los codones de leucina CTG, modificados desde codones de leucina TTA, TTG, CTT, CTC o CTA en el ácido nucleico codificante de FVIII de tipo salvaje. En aspectos particulares, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII presentan entre aproximadamente 50 % y 59 %, o entre 50 % y 56 %, o entre 50 % y 53 % de contenido de GC. En otros aspectos, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII presentan uno o más codones de lisina AAG en comparación con los codones de lisina AAA en el ácido nucleico codificante de FVIII de tipo salvaje.

En formas de realización todavía adicionales, las variantes de ácido nucleico codificante de FVIII son por lo menos 75 % idénticas al ácido nucleico de FVIII humano de tipo salvaje o al ácido nucleico de FVIII humano de tipo salvaje que comprende una eliminación del dominio B. En aspectos más particulares, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII son aproximadamente 75 % a 85 % idénticas (por ejemplo, aproximadamente 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 % o 85 % idénticas) al ácido nucleico de FVIII humano de tipo salvaje o al ácido nucleico de FVIII humano de tipo salvaje que comprende una eliminación del dominio B.

En aspectos particulares, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII se exponen en cualquiera de las SEC ID n°:1 a 7 y 9.

En diversas formas de realización, las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII son de mamífero, tales como humanas. Tales variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII de mamífero, incluyendo formas humanas, pueden estar basadas en FVIII de tipo salvaje o FVIII de tipo salvaje que comprende una eliminación del dominio B.

Según la invención, se proporcionan, además, vectores de expresión que incluyen variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII tal como se indica en la presente memoria. En formas de realización particulares, un vector de expresión comprende un vector vírico asociado a adenovirus (AAV), un vector retroviral, un vector adenoviral, un plásmido o un vector lentiviral. En aspectos particulares, un vector de AAV comprende un serotipo de AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8.

Los vectores de expresión pueden incluir componentes o elementos adicionales. En formas de realización particulares, un vector de expresión, tal como un vector de AAV, incluye además un intrón, un elemento de control

de la expresión, una o más repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV (por ejemplo, cualquiera de los serotipos de AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, o una combinación de los mismos) y/o una secuencia polinucleotídica de relleno. En aspectos particulares, un intrón se encuentra dentro o flanquea una variante de ácido nucleico codificante de FVIII, y/o un elemento de control de la expresión está ligado funcionalmente a la variante de ácido nucleico codificante de FVIII, y/o una o más ITR de AAV flanquean el extremo 5' o 3' de la variante de ácido nucleico codificante de FVIII, y/o una secuencia polinucleotídica de relleno flanquea el extremo 3' o 5' de la variante de ácido nucleico codificante de FVIII.

En aspectos particulares, un elemento de control de la expresión comprende un elemento de control constitutivo o regulable, o un elemento de control de la expresión o promotor específico de tejido. En aspectos más particulares, un elemento de control de la expresión comprende un elemento que confiere la expresión en el hígado. En aspectos particulares adicionales, un elemento de control de la expresión comprende un promotor de TTR o promotor de TTR mutante, tal como SEC ID n°:8.

Según la invención, se proporcionan adicionalmente células hospedadoras que expresan el FVIII codificado por las variantes de ácido nucleico indicadas en la presente memoria. En formas de realización particulares, una célula hospedadora incluye una variante de ácido nucleico codificante de FVIII o un vector de expresión que comprende una variante de ácido nucleico codificante de FVIII. En aspectos particulares, tales células hospedadoras producen proteínas FVIII codificada por las variantes de ácido nucleico y se recupera la proteína FVIII producida. Tal proteína FVIII producida por las células, opcionalmente aislada y/o purificada, puede administrarse al sujeto tal como se indica en la presente memoria.

Según la invención, se proporcionan, además, vectores víricos que incluyen las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII o los vectores de expresión que comprenden las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII. En formas de realización particulares, un vector vírico comprende un vector de AAV. En aspectos particulares, un vector de AAV comprende una secuencia de cápside VP1, VP2 y/o VP3 que presenta una identidad de secuencia de 75 % o mayor (por ejemplo, de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, 99.6 %, 99.7 %, 99.8 %, etc.) respecto a las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8. En aspectos más particulares, un vector de AAV comprende una secuencia de cápside VP1, VP2 y/o VP3 seleccionada de cualquiera de: los serotipos de AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8.

Según la invención, se proporcionan todavía adicionalmente composiciones que comprenden variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII indicadas en la presente memoria. En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas incluyen un vector de expresión, o un virus o vector de AAV, en un portador o excipiente biológicamente compatible. Tales composiciones farmacéuticas incluyen opcionalmente AAV de cápside vacía (por ejemplo, carecen de genoma del vector que comprende variante de ácido nucleico codificante de FVIII). En formas de realización particulares adicionales, se encapsulan variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII, vectores de expresión, o vectores víricos o AAV en un liposoma o se mezclan con fosfolípidos o micelas.

Según la invención, se proporcionan todavía adicionalmente procedimientos para administrar o transferir variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII en un mamífero o una célula de mamífero. En una realización, un procedimiento incluye administrar o poner en contacto una variante de ácido nucleico codificante de FVIII, un vector de expresión que comprende variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector vírico o AAV que comprende una variante de ácido nucleico codificante de FVIII a un mamífero o célula de mamífero, administrando o transfiriendo de esta manera la secuencia de ácido nucleico al mamífero o célula de mamífero. Tales procedimientos introducen variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII en una célula de mamífero en cultivo o en un sujeto (por ejemplo, un paciente).

Entre los procedimientos de la invención se incluyen, además, el tratamiento de sujetos humanos (por ejemplo, pacientes), tales como seres humanos que necesitan factor VIII (la persona produce una cantidad insuficiente de proteína factor VIII, o una proteína factor VIII defectuosa o aberrante). En una forma de realización, un procedimiento de tratamiento de un mamífero en necesidad de factor VIII incluye: proporcionar una variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector de expresión que comprende variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector vírico o AAV que comprende una variante de ácido nucleico codificante de FVIII, y administrar una cantidad de la variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector de expresión que comprende variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector vírico o AAV que comprende variante de ácido nucleico codificante de FVIII, al sujeto mamífero, de manera que el factor VIII codificado por la variante de ácido nucleico codificante de FVIII es expresado en el sujeto mamífero.

En otra forma de realización, un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con la hemostasia en un paciente que lo necesita (por ejemplo, el paciente produce una cantidad insuficiente de proteína factor VIII, o una proteína factor VIII defectuosa o aberrante) incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector de expresión que comprende una variante de

ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector vírico o AAV que comprende una variante de ácido nucleico codificante de FVIII en un portador biológicamente aceptable, al paciente.

En aspectos particulares de los procedimientos de la invención, el factor VIII se expresa a niveles que presentan un efecto beneficioso o terapéutico sobre el mamífero, y/o el factor VIII se expresa en una célula, tejido u órgano del mamífero. Entre tales aspectos se incluyen la introducción de variante de ácido nucleico codificante de FVIII en un tejido u órgano, tal como el hígado. Entre tales aspectos se incluyen, además, la introducción de variante de ácido nucleico codificante de FVIII en una célula secretora. Entre tales aspectos se incluyen, además, la introducción de variante de ácido nucleico codificante de FVIII en una célula endocrina o una célula endotelial. Entre tales aspectos adicionalmente se incluyen la introducción de variante de ácido nucleico codificante de FVIII en un hepatocito, una célula endotelial sinusoidal, un megacariocito, una plaqueta o célula madre hematopoyética.

Entre los sujetos candidatos (por ejemplo, un paciente) y mamíferos (por ejemplo, seres humanos) para la administración (por ejemplo, el suministro) de una variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector de expresión que comprende variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector vírico o AAV que comprende una variante de ácido nucleico codificante de FVIII se incluyen aquellos que presentan o corren riesgo de presentar un trastorno tal como: hemofilia A, enfermedad de von Willebrand y sangrado asociado a traumatismo, lesión, trombosis, trombocitopenia, accidente cerebrovascular, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (CID) o trastorno por sobretratamiento anticoagulación.

Entre los sujetos candidatos (por ejemplo, pacientes) y mamíferos (por ejemplo, seres humanos) para la administración (por ejemplo, el suministro) de una variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector de expresión que comprende variante de ácido nucleico codificante de FVIII, o un vector vírico o AAV que comprende una variante de ácido nucleico codificante de FVIII se incluyen aquellos que son seronegativos para anticuerpos de AAV, así como aquellos que presentan o corren el riesgo de desarrollar anticuerpos de AAV. Tales sujetos (por ejemplo, pacientes) y mamíferos (por ejemplo, seres humanos) pueden ser seronegativos o seropositivos para un serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-Rh10 y/o AAV-Rh74.

Por lo tanto, los procedimientos de la invención incluyen, además, la administración de AAV de cápside vacío a dicho mamífero o dicho paciente. En unas formas de realización particulares, se administran adicionalmente al mamífero o paciente cápsides vacías de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-Rh10 y/o AAV-Rh74.

Entre los procedimientos de administración (por ejemplo, suministro) según la invención se incluye cualquier modo de contacto o suministro, *ex vivo* o *in vivo*. En formas de realización particulares, la administración (por ejemplo, suministro) es por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intracavitaria, mediante intubación o mediante catéter.

La invención proporciona, además, procedimientos para someter a ensayo las variantes de FVIII mejoradas en modelos de animales pequeños y grandes que son tolerantes a FVIII humano con el fin de evaluar la posología y monitorizar la inmunogenicidad de las variantes. El modelo de perro con HB es superior para predecir la dosis eficaz requerida para la terapia génica de FIX humano. Además, la utilización de dicho modelo proporciona un contexto que permite evaluar seres humanos que actualmente están recibiendo terapia de sustitución de proteína por hFVIII-BDD sin pruebas de una respuesta de anticuerpos anti-hFVIII, quienes es probable que desarrollen una respuesta inmunitaria a dichas variantes.

### Descripción de los dibujos

La figura 1 representa cortes proteolíticos de factor VIII. El FVIII presenta una estructura de dominios que consiste en tres dominios A (A1, A2 y A3), dos dominios C (C1 y C2) y un dominio B grande codificado por el exón 14 del gen que es prescindible para la función del FVIII. El FVIII funciona como un factor en la activación del factor X a factor Xa en una reacción catalizada por el factor IXa. El FVIII es secretado en forma de un heterodímero compuesto de cadenas pesada y ligera del FVIII que son estabilizadas en la circulación por el factor de von Willebrand (vWF). Con el corte por trombina, el FVIII forma el heterotrímero activado.

La figura 2 representa la expresión del factor VIII tras la administración mediante AAV de factor VIII de codones optimizados. El gen del factor VIII humano de codones optimizados (CO) se administró en un vector vírico adenoasociado de serotipo 8 a ratones con hemofilia A/inactivación génica ("knockout") de CD4. Se administraron a los ratones  $1 \times 10^{11}$  genomas de vector (gv)/ratón de hFVIII-SQ (ADNc de factor VIII de tipo salvaje), TTR-hFVIII-SQ-CO, TTRmut-hFVIII-SQ-CO o TTRmut-hFVIII-SQ-CO-deIP/F. Se llevó a cabo un ELISA en el plasma recogido en las 2, 4, 8 y 12 semanas posteriores a la administración de vector, a fin de determinar los niveles de proteína factor VIII en la circulación.

La figura 3A representa constructos de AAV-hFVIII de codones no optimizados. Los vectores de AAV-hFVIII presentan el ADNc de factor VIII humano con eliminación de dominio B (BDD) de tipo salvaje. El elemento

intensificador/promotor es una región mínima de control hepático-intensificador/promotor de antitripsina  $\alpha$ -1 humana (HCR-hAAT) que presenta una versión acortada de la región de control hepático del locus génico ExxC-1 de la proteína apo1 humana (Nathwani et al. 2006, Sabatino et al. 2011). Asimismo está incluido un intrón de 65 pb del SV40 y una poliadenilación de 134 pb del SV40. La única diferencia entre estos constructos es que uno utiliza el hFVIII-BDD de tipo salvaje (constructo en la parte superior) y el otro utiliza el hFVIII-BDD de tipo salvaje con una variante por eliminación de PACE-furina (constructo en la parte inferior). La totalidad de las cinco variantes por eliminación P/F (tabla 1) se introdujeron en dicho casete de expresión.

La figura 3B representa la expresión de FVIII tras la administración con AAV8 de variantes por eliminación de PACE-furina de hFVIII. Se administraron AAV ( $5 \times 10^{11}$  gv/ratón) a ratones con inactivación génica para hemofilia A/CD4 (inmunodeficientes). Se realizó un seguimiento de la expresión del hFVIII (antígeno y actividad) en el plasma durante las 12 semanas posteriores a la administración de AAV.  $*=p<0.05$ .

La figura 4A representa constructos de transgén de FVIII de tipo salvaje y de codones optimizados. El promotor de TTR controla la expresión de FVIII de codones optimizados. SQ: forma con eliminación del dominio B que presenta S743 y Q1638 en la unión; ITR: secuencias de repetición terminal invertida requeridas para el empaquetado del transgén en los vectores de AAV.

La figura 4B representa que la optimización de codones de hFVIII conduce a niveles de expresión más altos. Comparación de los niveles de expresión y actividad de FVIII, FVIII CO1, FVIII CO2 y FVIII de tipo salvaje, administrados mediante AAV, 4 y 8 semanas después de administrar el vector de AAV.

La figura 4C representa que la optimización de codones de hFVIII conduce a niveles de expresión más altos. Comparación entre los niveles de expresión y actividad de FVIII, entre FVIII CO1, FVIII CO3/CO y FVIII de tipo salvaje administrados mediante AAV, 4 y 8 semanas después de la administración de vector de AAV.

La Figura 5A representa la expresión de FVIII tras la administración mediante AAV de CO3. Comparación entre el promotor de TTR y el promotor de TTR mutante (TTRm) con FVIII-CO3. El promotor de TTR mutante con la eliminación de PACE-furina  $\Delta$ 4 (delP/F) introducida en CO3.

La figura 5B representa datos que indican que el promotor de TTR mutante resulta en una expresión incrementada de la expresión de FVIII-CO3 tras la administración de AAV.

La figura 6A representa constructos de transgén de FVIII humano. Los constructos de transgén utilizan un promotor de transtiretina modificada (TTRm), intrón sintético (Intrón) y señal de poliadenilación (Poli A). Los transgenes de factor VIII son ADNc de factor VIII humano con eliminación del dominio B de tipo salvaje (FVIII WT) o ADNc de factor VIII humano con eliminación de dominio B de codones optimizados (FVIII CO). Las variantes por eliminación de PACE furina  $\Delta$ 3 y  $\Delta$ 4 se introdujeron en los transgenes de hFVIII.  $\Delta$ 3: eliminación de tres residuos (aminoácidos 1645 a 1647) del sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina.  $\Delta$ 4: eliminación de cuatro residuos (aminoácidos 1645 a 1648) del sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina. SQ: forma con eliminación del dominio B que presenta un S743 y Q1638 en la unión; ITR: secuencias de repetición terminal invertida requeridas para el empaquetado del transgén en los vectores de AAV.

La figura 6B representa la expresión del factor VIII tras la administración de AAV de constructos de FVIII de tipo salvaje y de codones optimizados. Se determinaron los niveles de antígeno hFVIII mediante un ELISA específico de FVIII humano (Affinity Biologicals). La actividad de FVIII determinada mediante el ensayo de Coatest correlacionaba con los niveles de antígeno FVIII. Estos datos se presentan como factor de diferencia respecto a hFVIII-TTRmut-wtSQ en los puntos temporales de 2 y 4 semanas.

La figura 7 representa el reto hemostático *in vivo* de ratones tras la administración mediante AAV de constructos de hFVIII de tipo salvaje y de codones optimizados. Seis semanas después de la administración de vector ( $1 \times 10^{11}$  gv/ratón), los ratones tratados con constructos de AAV-hFVIII fueron retados utilizando un ensayo de pinza en la cola (Invaicu L. et al., Nature Biotech 2011, 29(11):1028-1033). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano y la cola se precalentó a 37 °C seguido de la sección transversal de la cola en un diámetro de 3 mm. Se recolectó sangre durante 10 minutos en 14 ml de solución salina a 37 °C. Se determinó la pérdida total de sangre ( $\mu$ l) mediante medición de la hemoglobina total mediante absorbancia a 575 nm tras la lisis de los glóbulos rojos. Se comparó la pérdida de sangre de los ratones con hemofilia A que habían sido tratados con constructos de AAV-hFVIII con la pérdida de sangre de ratones con hemofilia A no tratados y con ratones de tipo salvaje.

## Descripción detallada

Los informes anteriores han mostrado que la terapia génica hepática de AAV de FVIII canino (cFVIII) resulta en la expresión a largo plazo de niveles terapéuticos de FVIII en ratones HA previamente no expuestos (Sabatino et al., Mol Ther. 19, 442-449, 2011). Esta estrategia asimismo eliminó los inhibidores de cFVIII en perros HA con anticuerpos de cFVIII neutralizantes preexistentes (Finn, J.D. et al., Blood 116, 5842-5848, 2010). Estos datos

demuestran que AAV-FVIII puede mejorar significativamente el fenotipo de la enfermedad y eliminar los inhibidores de FVIII. Curiosamente, cFVIII es inherentemente más estable que el FVIII humano (hFVIII), resultando en una actividad biológica incrementada (Sabatino, D.E. et al. Blood 114, 4562-4565, 2009). De esta manera, la dosis en AAV de cFVIII no es predictiva de la dosis terapéutica de hFVIII. Ello contrasta con el factor IX, que presenta una actividad biológica similar en ambas especies y es predictivo de la dosis terapéutica de AAV en seres humanos. Cabe destacar que el modelo de perro con hemofilia ha sido un excelente predictor tanto de eficacia como de respuesta inmunitaria al transgén en ensayos centrados en hígado y músculo para la HB.

Con el fin de entender la base bioquímica para la función mejorada del cFVIII, los presentes inventores identificaron un sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina en FVIII que es único del cFVIII, en comparación con todas las demás especies, incluyendo hFVIII. La introducción de un cambio de un solo aminoácido en este sitio en hFVIII confiere una estabilidad incrementada y una actividad biológica más alta a hFVIII (Siner, J.I., et al. Blood 121, 4396-4403, 2013).

En la presente memoria se dan a conocer variantes de ácido nucleico que codifican FVIII humano, diferentes del ácido nucleico de tipo salvaje que codifica FVIII. Tales variantes de ácido nucleico que codifican FVIII humano se expresan a niveles incrementados en células y/o animales, lo que a su vez puede proporcionar niveles incrementados de proteína FVIII *in vivo*. En la presente memoria se dan a conocer, además, variantes de ácido nucleico codificante de FVIII humano que pueden empaquetarse más eficientemente en AAV de diferentes serotipos. En la presente memoria se dan a conocer, además, variantes de ácido nucleico codificantes de variantes de proteína FVIII humana que presentan una estabilidad y/o actividad biológica más alta *in vitro* y/o *in vivo*.

En la presente memoria se dan a conocer todavía adicionalmente datos que muestran la eficacia y la seguridad de la administración mediante AAV de varias variantes de FVIII humano en modelos animales de hemofilia A. En particular, por ejemplo, el ácido nucleico de codones optimizados que codifica el FVIII humano con y sin eliminaciones en el sitio de reconocimiento de corte de proteasa intracelular muestra uno o más de los siguientes aspectos: 1) expresión incrementada en células y/o animales, 2) actividad incrementada, según se observa en una coagulación incrementada, por ejemplo, 3) estabilidad incrementada, y 4) consigue un efecto terapéutico a dosis de AAV más bajas que el hFVIII nativo, sin ningún incremento aparente de inmunogenicidad respecto a los constructos de FVIII con eliminación del dominio B utilizados actualmente.

El término "polinucleótido" y la expresión "ácido nucleico" se utilizan indistintamente 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 ("spliced") o no procesado, ARNr, ARNt y ADN o ARN inhibidor (ARNi, por ejemplo, ARN en horquilla pequeña o corta (hc), microARN (miARN), ARN interferente pequeño o corto (ip), ARN procesado entre cadenas ("trans-splicing RNA"), o ARN antisentido). Entre los polinucleótidos se incluyen polinucleótidos naturales, sintéticos y deliberadamente modificados o alterados (por ejemplo, un ácido nucleico variante). Los polinucleótidos pueden ser de cadena sencilla, de doble cadena, de triple cadena, lineales o circulares, y pueden presentar cualquier longitud. En la discusión de los polinucleótidos, en la presente memoria puede describirse una secuencia o estructura de un polinucleótido particular según la convención de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "modificar" o "variante" y variaciones gramaticales de los mismos, se refieren a que un ácido nucleico, polipéptido o subsecuencia del mismo difieren de una secuencia de referencia. Por lo tanto, las secuencias modificadas y variantes pueden presentar sustancialmente la misma expresión, actividad o función, o una mayor o menor, que una secuencia de referencia, aunque por lo menos retienen una actividad o función parcial de la secuencia de referencia. Un ejemplo particular de una modificación o variante es una secuencia de ácido nucleico de codones optimizados que codifica FVIII.

Un "ácido nucleico" o "polinucleótido" variante se refiere a una secuencia modificada que ha sido alterada genéticamente respecto al tipo salvaje. La secuencia puede modificarse genéticamente sin alterar la secuencia de la proteína codificada. Alternativamente, la secuencia puede modificarse genéticamente para que codifique una proteína variante. Un ácido nucleico o polinucleótido variante asimismo puede referirse a una secuencia de combinación en la que se han modificado los codones para codificar para una proteína que todavía retiene una identidad de la secuencia por lo menos parcial respecto a una secuencia de referencia, tal como la secuencia de la proteína de tipo salvaje, y cuyos codones asimismo han sido modificados para que codifiquen para una proteína variante. Por ejemplo, algunos codones de dicha variante de ácido nucleico se cambiarán sin que se alteren los aminoácidos de la proteína (FVIII) codificados por ellos, y algunos codones de la variante de ácido nucleico se cambiarán que a su vez resultarán en aminoácidos modificados de la proteína (FVIII) codificados por ellos.

La expresión "factor VIII variante (FVIII)" se refiere a un FVIII modificado que ha sido alterado genéticamente de manera que la proteína codificada muestre una expresión incrementada en comparación con el FVIII de tipo salvaje no modificado o con FVIII-BDD. Dicha variante puede denominarse "variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII)". Se ha alcanzado un incremento de por lo menos 30 veces con el casete de expresión TTRmut-hFVIII-SQ-CO delP/F en comparación con el promotor HCR/haAT que controla el hFVIII de tipo salvaje (figura 2). Son

ejemplos particulares de tales modificaciones de FVIII, las variantes codificantes de FVIII de codones optimizados que muestran una expresión incrementada y/o una eficiencia de empaquetado incrementada en vectores de AAV, en comparación con FVIII de tipo salvaje de codones no optimizados o FVIII-BDD, y las muestran sin modificaciones en el ácido nucleico que resulten en cambios de aminoácidos en la proteína FVIII codificada. Al

5 comparar la expresión, en el caso de que la proteína FVIII variante retenga el dominio B, resulta apropiado compararla con la expresión del FVIII de tipo salvaje, y en el caso de que la proteína FVIII variante presente una eliminación del dominio B, se comparará con la expresión del FVIII de tipo salvaje que asimismo presente una eliminación del dominio B.

10 La expresión “factor VIII variante (FVIII)” asimismo puede referirse a una proteína FVIII modificada tal que la proteína modificada presenta una alteración de los aminoácidos respecto al FVIII de tipo salvaje y muestra un incremento de la actividad y/o estabilidad en comparación con el FVIII de tipo salvaje. Son ejemplos de tales modificaciones particulares de la proteína FVIII, modificaciones genéticas que conducen a mutaciones, eliminaciones o sustituciones del sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina en la proteína FVIII, denominado

15 en la presente memoria “proteína FVIII variante”. Al comparar la actividad y/o estabilidad, si la proteína FVIII variante retiene el dominio B, resulta apropiado compararla con el FVIII de tipo salvaje, y si la proteína FVIII variante presenta una eliminación del dominio B, se comparará con el FVIII de tipo salvaje que asimismo presenta una eliminación del dominio B.

20 Las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria son fácilmente obtenibles de GenBank. Para el FVIII humano, ver el nº de acceso NG-011403.1. Para el FVIII canino, ver el nº de acceso NM\_001003212-1. FVIII-BDD, hFVIII-BDD, cFVIII-BDD y similares se refieren a un FVIII variante que carece del dominio B (ver, por ejemplo, la figura 1).

25 Los “polipéptidos”, “proteínas” y “péptidos” codificados por el “ácido nucleico” o “secuencias polinucleotídicas” incluyen secuencias nativas de longitud completa (FVIII), al igual que con las proteínas de tipo salvaje 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 nativa. Por ejemplo, una proteína FVIII puede presentar una eliminación del dominio B tal como se indica

30 en la presente memoria y retener la función de coagulación. En los procedimientos y usos de la invención, tales polipéptidos, proteínas y péptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico puede ser idénticos, aunque ello no es necesario, a la proteína endógena que es defectuosa, o cuya expresión es insuficiente o deficiente, en el mamífero tratado.

35 Entre los ejemplos no limitativos de modificaciones se incluyen una o más sustituciones de nucleótidos o aminoácidos (por ejemplo, 1 a 3, 3 a 5, 5 a 10, 10 a 15, 15 a 20, 20 a 25, 25 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 100, 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 500, 500 a 750, 750 a 850 o más nucleótidos o residuos). Un ejemplo de una modificación de ácido nucleico es la optimización de codones, por ejemplo, para un codón de leucina que no es CTG, la modificación a CTG, o para un codón de lisina que no es AAG, la modificación a AAG. Otro ejemplo de

40 una modificación de optimización de codones de ácido nucleico es incrementar el contenido de GC. En aspectos particulares, una secuencia de ácido nucleico variante codificante de proteína FVIII humana presenta 1 % a 5 % más contenido de GC que la secuencia nativa codificante de factor FVIII humano (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 % más contenido de GC), o presenta 5 % a 10 % más contenido de GC que la secuencia nativa (de tipo salvaje) codificante de factor FVIII humano (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % más contenido de GC), o presenta 10 % a 15 % más contenido de GC que la secuencia nativa (de tipo salvaje) codificante de factor FVIII humano (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 % más contenido de GC).

Un ejemplo de una modificación de aminoácido es una sustitución conservadora o una eliminación de aminoácido (por ejemplo, subsecuencias o fragmentos, o eliminación de sitio de escisión PACE/furina) de una secuencia de

50 referencia, por ejemplo, FVIII. En formas de realización particulares, una secuencia modificada o variante retiene por lo menos parte de una función o actividad de la secuencia no modificada.

Todas las formas de mamífero y de no mamífero de ácido nucleico codificante de proteínas, incluyendo otras formas de mamífero del ácido nucleico de FVIII y proteínas FVIII dadas a conocer en la presente memoria están expresamente incluidas, ya sean conocidas o sean no conocidas. De esta manera, la invención incluye genes y

55 proteínas de no mamíferos, de mamíferos que no son el ser humano, y de seres humanos, cuyos genes y proteínas funcionan de una manera sustancialmente similar a los genes y proteínas del FVIII (por ejemplo, humano) indicados en la presente memoria.

60 El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico portadora pequeña, a un plásmido, a un virus (por ejemplo, el vector de AAV) o a otro vehículo que puede manipularse mediante inserción o incorporación de un ácido nucleico. Tales vectores pueden utilizarse para la manipulación genética (es decir, los “vectores de clonación”), para introducir/transferir polinucleótidos hasta el interior de las células, y para transcribir o traducir el polinucleótido insertado en las células. Un “vector de expresión” es un vector especializado que contiene una

65 secuencia génica o de ácido nucleico con las regiones reguladoras necesarias que se requieren para la expresión en una célula hospedadora. 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 intensificador), un intrón, una o más ITR, un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a un antibiótico) o una señal de poliadenilación.

Un vector vírico deriva de o está basado en uno o más elementos ácido nucleico comprendidos en un genoma vírico. Entre los vectores víricos particulares se incluyen lentivirus, lentivirus pseudotipados y vectores parvovíricos, tales como vectores de virus adenoasociado (AAV). Se proporcionan, además, vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido FVIII variante.

El término "recombinante", como modificador de un vector, tal como vectores víricos, por ejemplo, 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 han sido manipuladas (es decir, diseñadas) de una manera en la que generalmente no se observan en la naturaleza. Un ejemplo particular de un vector recombinante, tal como un vector de AAV, sería la inserción en el genoma vírico de un polinucleótido que no está presente normalmente en el genoma vírico (por ejemplo, AAV) de tipo salvaje. Un ejemplo de un polinucleótido recombinante sería la clonación en un vector de un ácido nucleico (por ejemplo, gen) codificante de una proteína FVIII, con o sin regiones 5', 3' y/o de intrón con las que el gen está normalmente asociado dentro del genoma vírico (por ejemplo, AAV). Aunque el término "recombinante" no siempre se utiliza en la presente memoria en referencia a vectores, tales como vectores víricos y AAV, así como secuencias tales como polinucleótidos, las formas recombinantes que incluyen polinucleótidos, están expresamente incluidas a pesar de cualquiera de tales omisiones.

Un "vector" vírico recombinante o "vector de AAV" deriva del genoma de tipo salvaje de un virus, tal como AAV, mediante la utilización de procedimientos moleculares para eliminar el genoma de tipo salvaje del virus (por ejemplo, AAV) y sustituirlo por un ácido nucleico no nativo, tal como una secuencia variante de ácido nucleico codificante de FVIII. Normalmente, para el AAV se retienen una o ambas secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma del AAV dentro del vector de AAV. Un vector vírico (por ejemplo, AAV) "recombinante" se distingue de un genoma vírico (por ejemplo, de AAV) en que la totalidad o una parte del genoma vírico ha sido sustituida por una secuencia no nativa con respecto al ácido nucleico genómico vírico (por ejemplo, de AAV), tal como una secuencia variante de ácido nucleico codificante de FVIII. Por lo tanto, la incorporación de una secuencia no activa define el vector vírico (por ejemplo, AAV) como un vector "recombinante", que en el caso del AAV puede denominarse "vector de AAVr".

Una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, lentivírica, parvovírica o de AAV) puede empaquetarse, lo que en la presente memoria se denomina "partícula", para la infección (transducción) posterior de una célula, *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. En el caso de que una secuencia de vector recombinante se encapside o se empaquete en una partícula de AAV, la partícula asimismo puede denominarse "AAVr". Entre tales 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.

Un "genoma" de vector se refiere a la parte de la secuencia plasmídica recombinante que finalmente se empaqueta o encapsida para formar una partícula vírica (por ejemplo, AAV). En los casos en que se utilizan plásmidos recombinantes para construir o fabricar vectores recombinantes, el genoma del vector no incluye la parte del "plásmido" que no se corresponde con la secuencia genómica del vector del plásmido recombinante. Esta parte de genoma no del vector del plásmido recombinante se denomina "esqueleto del plásmido", que es importante para la clonación y amplificación del plásmido, un proceso necesario para la propagación y producción de virus recombinante, pero que no resulta empaquetado o encapsidado en las partículas de virus (por ejemplo, AAV). De esta manera, un "genoma" vírico se refiere al ácido nucleico que es empaquetado o encapsidado por el virus (por ejemplo, AAV).

En la presente memoria se utiliza "transgén" para referirse convenientemente a un ácido nucleico que se pretende introducir o que ha sido introducido en una célula u organismo. Entre los transgenes se incluyen cualquier ácido nucleico, tal como un gen que codifica un polipéptido o proteína (por ejemplo, factor VIII).

En una célula que presenta un transgén, el transgén ha sido introducido/transferido mediante "transducción" o "transfección" de la célula con el vector, tal como AAV. Los términos "transducir" y "transfectar" se refiere a la introducción de una molécula, tal como un ácido nucleico, en una célula u organismo hospedador. El transgén puede integrarse o no en el ácido nucleico genómico de la célula receptora. En el caso de que el ácido nucleico introducido se integre en el ácido nucleico (ADN genómico) de la célula u organismo receptor podrá mantenerse establemente en esa célula u organismo y además pasarse o heredarse en las 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 en forma extracromosómica, o sólo transitoriamente.

Una "célula transducida" es una célula en la que se ha introducido el transgén. De acuerdo con lo anterior, una célula "transducida" (por ejemplo, en un mamífero, tal como una célula o 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 ácido nucleico (por ejemplo, un transgén) en la célula. De esta manera, una célula "transducida" es una célula, o una progenie de la misma, en la que se ha introducido un ácido nucleico exógeno. La célula o células pueden propagarse y la proteína introducida, expresarse, o transcribirse el ácido nucleico. Para los usos y procedimientos de terapia génica, la célula transducida puede encontrarse en el sujeto.

Un "elemento de control de la expresión" se refiere a una o más secuencias de ácido nucleico que influyen sobre la expresión de un ácido nucleico ligado funcionalmente. Los elementos de control, incluyendo los elementos de control de la expresión indicados en la presente memoria, tales como promotores e intensificadores, secuencias de vector que incluyen vectores de AAV, pueden incluir uno o más "elementos de control de la expresión". Normalmente, dichos elementos se incluyen para facilitar la transcripción apropiada de polinucleótidos heterólogos y, en caso apropiado, la traducción (por ejemplo, un promotor, intensificador, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura apropiado del gen para permitir la traducción dentro del marco del ARNm y codones de parda, etc.). Dichos elementos normalmente actúan en cis, denominados elementos "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 ácido nucleico transcrito. Los elementos de control de la expresión asimismo pueden estar localizados 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 localizados en contigüidad o a cierta distancia de la secuencia transcrita (por ejemplo, 1 a 10, 10 a 25, 25 a 50, 50 a 100, 100 a 500, o más nucleótidos del polinucleótido), incluso a distancias considerables. Sin embargo, debido a las limitaciones de longitud de determinados vectores, tales como los vectores de AAV, los elementos de control de la expresión normalmente se encontrarán a una distancia de entre 1 y 1000 nucleótidos del ácido nucleico transcrito.

Funcionalmente, la expresión de ácido nucleico ligado funcionalmente es controlable por lo menos en parte por el elemento (por ejemplo, promotor), de manera que el elemento modula la transcripción del ácido nucleico y, según resulte apropiado, la traducción del transcrito. Un ejemplo específico de un elemento de control de la expresión es un promotor, que habitualmente está ubicado en el lado 5' de la secuencia transcrita, por ejemplo, la variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII). Un promotor típicamente incrementa la cantidad expresada a partir del ácido nucleico ligado funcionalmente, en comparación con la cantidad expresada cuando no existe un promotor.

El término "intensificador" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a cualquier secuencia que esté ubicada adyacentemente al polinucleótido heterólogo. Los elementos intensificadores normalmente están ubicados cadena arriba de un elemento promotor, aunque asimismo funcionan y pueden estar ubicados cadena abajo o dentro de una secuencia (por ejemplo, la variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII)). Por lo tanto, un elemento intensificador puede estar ubicado a 100 pares de bases, 200 pares de bases o 300 o más pares de bases cadena arriba o cadena abajo de la variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII). Los elementos intensificadores normalmente incrementan la expresión de un ácido nucleico ligado operablemente hasta un nivel superior a la expresión proporcionada por un elemento promotor.

Un constructo de expresión puede comprender elementos reguladores que sirven para controlar la expresión en una célula o tipo tisular específico. Entre los elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotores) se incluyen aquellos activos en un tejido o tipo celular específico, denominados en la presente memoria "elementos/promotores de control de la expresión específicos de tejido". Los elementos de control de la expresión específicos de tejido normalmente son activos en una célula o tejido específico (por ejemplo, el hígado). Los elementos de control de la expresión normalmente son activos en células, tejidos u órganos particulares debido a que son reconocidos por proteínas activadoras de la transcripción u otros reguladores de la transcripción, los cuales son exclusivos de una célula, tejido o tipo de órgano específico. Tales elementos reguladores son conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) y Ausubel et al. (1992)).

La incorporación de elementos reguladores específicos de tejido en los constructos de expresión de la invención proporciona un tropismo de tejidos por lo menos parcial para la expresión de los FVIII variantes o fragmentos funcionales de los mismos. Son ejemplos de promotores que resultan activos en el hígado, el promotor de TTR, el promotor antitripsina alfa-1 humana (hAAT), el promotor albúmina, Miyatake, et al. J. Virol., 71:5124-32 (1997), el promotor nuclear del virus de la hepatitis B, Sandig, et al., Gene Ther. 3:1002-9 (1996); el promotor alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot, et al., Hum. Gene. Ther., 7:1503-14 (1996)], entre otros. Un ejemplo de un intensificador activo en el hígado es HCR-1 o HCR-2 de la 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/intensificadores ubicuos o promiscuos que son capaces de controlar la expresión de un polinucleótido en muchos tipos celulares diferentes. Entre dichos elementos se incluyen, aunque sin limitación, las secuencias de promotor/intensificador temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), las secuencias de promotor/intensificador del virus del sarcoma de Rous (VSR) y los demás promotores/intensificadores víricos activos en una variedad de tipos celulares 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 dihidrofolato reductasa, el promotor  $\beta$ -actina citoplasmático y el promotor fosfoglicerol cinasa (PGK).

Los elementos de control de la expresión asimismo pueden conferir expresión de una manera que es regulable, es decir, una señal o estímulos incrementan o reducen la expresión del polinucleótido heterólogo ligado funcionalmente. Un elemento regulable que incrementa la expresión del polinucleótido ligado operablemente en respuesta a una señal o estímulos asimismo se denomina "elemento inducible" (es decir, es inducido por una señal). Entre los ejemplos particulares se incluyen, aunque sin limitación, un promotor inducible por una hormona (por ejemplo, un esteroide). Normalmente, la magnitud del incremento o reducción conferido por tales elementos es proporcional a la magnitud de la señal o los estímulos presentes: cuanto mayor sea la señal o los estímulos, mayor será el incremento o reducción de la expresión. Entre los ejemplos no limitativos particulares se incluyen el promotor metalotioneína (MT) de oveja inducible por cinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por hormona esteroidea, el sistema de promotor de la polimerasa de 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, temperatura, fase aguda o desarrollo.

Entre los elementos de control de la expresión se incluyen, además, el elemento o elementos nativos para el polinucleótido heterólogo. Puede utilizarse un elemento de control nativo (por ejemplo, un promotor) en el caso de que se desee que la expresión del polinucleótido heterólogo imite la expresión nativa. El elemento nativo puede utilizarse en el caso de que la expresión del polinucleótido heterólogo deba regularse de manera temporal o a lo largo del desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. Asimismo pueden utilizarse otros elementos de control de la expresión nativos, tales como intrones, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso de Kozak.

La expresión "ligado funcionalmente" se refiere a que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de una secuencia codificante están situadas en las posiciones apropiadas respecto a la secuencia codificante de manera que afectan a la expresión de la secuencia codificante. Esta misma definición en ocasiones se aplica a la organización de secuencias codificantes y elementos de control de la transcripción (por ejemplo, promotores, intensificadores y elementos de terminación) en un vector de expresión. Dicha definición en ocasiones asimismo se aplica a la organización de secuencias de ácido nucleico de una primera y una segunda molécula de ácido nucleico, en donde se genera una molécula de ácido nucleico híbrida.

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 se refieren a 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 sobre la otra secuencia.

De acuerdo con lo anterior, entre los elementos adicionales para los vectores se incluyen, aunque sin limitación, un elemento de control de la expresión (por ejemplo, promotor/intensificador), un codón de señal de terminación o parada de transcripción, regiones 5' o 3' no traducidas (por ejemplo, secuencias de poliadenilación (poliA)) que flanquean una secuencia, tal como una o más copias de una secuencia de ITR de AAV, o un intrón.

Entre los elementos adicionales se incluyen, por ejemplo, secuencias polinucleotídicas de llenado o relleno ("stuffer"), por ejemplo para mejorar el empaquetado y reducir la presencia de ácido nucleico contaminante. Los vectores de AAV aceptan típicamente inserciones de ADN que presentan un intervalo de tamaño que es generalmente de aproximadamente 4 kb a aproximadamente 5.2 kb, o ligeramente más. Así, para secuencias más cortas, la inclusión de un relleno o llenado con el fin de ajustar la longitud hasta un tamaño igual o aproximadamente igual al normal en una secuencia genómica vírica que sea aceptable para el empaquetado del vector de AAV en la partícula vírica. En diversas formas de realización, una secuencia de ácido nucleico de llenado/relleno es un segmento no traducido (no codificante de proteína) del ácido nucleico. Para una secuencia de ácido nucleico menor de 4.7 Kb, la secuencia polinucleotídica de llenado o relleno presenta una longitud que al combinarla (por ejemplo, insertarla en un vector) con la secuencia 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 empaquetado del vector de AAV en la partícula vírica. Los intrones y fragmentos de intrones que funcionan como una secuencia polinucleotídica de llenado o relleno asimismo pueden potenciar la expresión.

La expresión “trastorno relacionado con la hemostasia” se refiere a trastornos hemorrágicos, tales como la hemofilia A, pacientes de hemofilia A con anticuerpos inhibidores, deficiencias en los factores de coagulación VII, VIII, IX y X, XI, V, XII, II, factor de von Willebrand, deficiencia combinada de FV/FVIII, deficiencia de vitamina K epóxido reductasa C1, deficiencia de gamma-carboxilasa, sangrado asociado a traumatismo, lesión, trombosis, trombocitopenia, accidente cerebrovascular, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (CID); sobre-anticoagulación asociada a heparina, heparina de bajo peso molecular, pentasacárido, warfarina, antitrombóticos de molécula pequeña (es decir, inhibidores de FXa) y trastornos plaquetarios, tales como el síndrome de Bernard Soulier, la trombastenia de Glanzman y la deficiencia de la reserva de almacenamiento.

El término “aislado”, cuando se utiliza como un modificador de una composición, se refiere a que las composiciones son preparadas artificialmente o se separan, por completo o por lo menos en parte, a partir de su medio *in vivo* natural. Generalmente, las composiciones aisladas están sustancialmente libres de uno o más materiales con los que están normalmente asociados en la naturaleza, por ejemplo, uno o más de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y membranas celulares.

En referencia a los ácidos nucleicos de la invención, el término “aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se separa de una o más secuencias respecto a las que es inmediatamente contiguo (en los sentidos 5' y 3') en el genoma natural (ADN genómico) del organismo del que se origina. Por ejemplo, el “ácido nucleico aislado” puede comprender una molécula de ADN o ADNc insertada en un vector, tal como un vector plásmido o virus, o integrada en el ADN de un procariota o eucariota.

Con respecto a las moléculas de ARN de la invención, el término “aislado” se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada tal como se ha definido anteriormente. Alternativamente, el término puede referirse a una molécula de ARN que se ha separado suficientemente de las moléculas de ARN con las que estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos), de manera que exista en una forma “sustancialmente pura” (la expresión “sustancialmente pura” se define posteriormente).

Con respecto a la proteína, en ocasiones se utiliza en la presente memoria la expresión “proteína aislada” o “proteína aislada y purificada”. Esta expresión se refiere principalmente a una proteína producida mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico aislada. Alternativamente, dicha expresión puede referirse a una proteína que ha sido suficientemente separada de otras proteínas con las que estaría naturalmente asociada, de manera que exista en forma “sustancialmente pura”.

El término “aislado” no excluye combinaciones producidas de manera artificial, por ejemplo, una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, AAVr), o partícula vírica que empaqueta o encapsida un genoma de vector y una formulación farmacéutica. El término “aislado” además tampoco excluye formas físicas alternativas de la composición, tales como híbridos/quimeras, multímeros/oligómeros, modificaciones (por ejemplo, fosforilación, glucosilación o lipidación) o formas derivatizadas, o formas expresadas en células hospedadoras producidas de manera artificial.

La expresión “sustancialmente puro” se refiere a una preparación que comprende por lo menos 50 % a 60 % en peso del compuesto de interés (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). La preparación puede comprender por lo menos 75 % en peso, o aproximadamente 90 % a 99.5 en peso, del compuesto de interés. La pureza se mide mediante procedimientos apropiados para el compuesto de interés (por ejemplo, procedimientos cromatográficos, agarosa o electroforesis en gel de poliacrilamida, análisis de HPLC y similares).

La expresión “que consiste esencialmente en” en referencia a una secuencia de nucleótido o secuencia de aminoácido particular se refiere a una secuencia que presenta las propiedades de una SEC ID n°. dada. Por ejemplo, al utilizarla en referencia a una secuencia de aminoácidos, la expresión incluye la secuencia misma y modificaciones moleculares que no afectarían a las características básicas y nuevas de la secuencia.

El término “oligonucleótido” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cebadores y sondas, y se define como una molécula de ácido nucleico que comprende dos o más ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, tal como más de tres. El tamaño exacto del oligonucleótido dependerá de diversos factores y de la aplicación particular para la que se utiliza el oligonucleótido.

El término “sonda” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido, polinucleótido o ácido nucleico, ya sea de ARN o sea de ADN, ya sea natural, tal como en un digerido purificado de enzima de restricción, o sea producido sintéticamente, que es capaz de aparearse o hibridarse específicamente con un ácido nucleico con secuencias complementarias a la sonda. La sonda puede ser de cadena sencilla o de doble cadena. La longitud exacta de la sonda dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, el origen de la sonda y el procedimiento de utilización. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, la sonda oligonucleotídica normalmente contiene 15 a 25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

Las sondas en la presente memoria se seleccionan para que sean “sustancialmente” complementarias a diferentes

5 cadenas de una secuencia de ácido nucleico diana particular. Ello significa que las sondas deben ser suficientemente complementarias para poder “hibridarse específicamente” o aparearse con sus cadenas diana respectivas bajo un conjunto de condiciones predeterminadas. Por lo tanto, la secuencia de la sonda no es necesario que refleje la secuencia exactamente complementaria de la diana. Por ejemplo, puede unirse un fragmento nucleotídico no complementario al extremo 5' o 3' de la sonda, en donde el resto de la secuencia de la sonda es complementario a la cadena diana. Alternativamente, pueden intercalarse bases o secuencias más largas no complementarias dentro de la sonda, siempre que la secuencia de la sonda presente suficiente complementariedad con la secuencia del ácido nucleico diana para poderse aparear específicamente con ella.

10 La expresión “hibridarse específicamente” se refiere a la asociación entre dos moléculas de ácidos nucleico de cadena sencilla de secuencia suficientemente complementaria para permitir dicha hibridación bajo condiciones predeterminadas utilizadas generalmente en la técnica (en ocasiones denominada “sustancialmente complementaria”). En particular, la expresión se refiere a la hibridación de un oligonucleótido con una secuencia sustancialmente complementaria contenida dentro de una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla de la invención, con exclusión sustancial de la hibridación del oligonucleótido a los ácidos nucleicos de cadena sencilla de secuencia no complementaria.

20 El término “cebador” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido, ya sea de ARN o ADN, ya sea de cadena sencilla o de doble cadena, derivado de un sistema biológico, generado mediante digestión con enzima de restricción, o producido sintéticamente, que, al situarlo en el medio adecuado, es capaz de actuar funcionalmente como un iniciador de la síntesis de ácido nucleico dependiente del molde. Al presentarle un ácido nucleico molde apropiado, precursores nucleótido trifosfato adecuados de ácidos nucleicos, un enzima polimerasa, cofactores adecuados y condiciones tales como una temperatura y pH adecuados, el cebador puede extenderse en su extremo 3' mediante la adición de nucleótidos por la acción de una polimerasa o actividad similar, produciendo un producto de extensión del cebador.

30 El cebador puede variar en longitud según las condiciones particulares y requisitos de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones diagnósticas, el cebador oligonucleotídico normalmente es de 15 a 25 o más nucleótidos de longitud. El cebador debe ser suficientemente complementario respecto al molde deseado para cebador la síntesis del producto de extensión deseado, es decir, debe ser capaz de aparearse con la cadena molde deseada de una manera suficiente para proporcionar la fracción 3'-hidroxilo del cebador en yuxtaposición apropiada para la utilización en el inicio de la síntesis por una polimerasa o enzima similar. No es necesario que la secuencia del cebador represente un complemento exacto del molde deseado. Por ejemplo, puede unirse una secuencia de nucleótidos no complementaria al extremo 5' de un cebador de otro modo complementario. Alternativamente, pueden intercalarse bases no complementarias dentro de la secuencia del cebador oligonucleotídico, siempre que la secuencia del cebador presente suficiente complementariedad respecto a la secuencia de la cadena molde deseada para proporcionar funcionalmente un complejo de molde-cebador para la síntesis del producto de extensión.

40 El término “identidad”, “homología” y variaciones gramaticales de los mismos, se refiere a que dos o más entidades referenciadas son iguales, cuando son secuencias “alineadas”. De esta manera, a título de ejemplo, cuando dos secuencias polipeptídicas son idénticas, presentan la misma secuencia de aminoácidos, por lo menos dentro de la región o parte referenciada. En donde dos secuencias polinucleotídicas son idénticas, presentan la misma secuencia polinucleotídica, por lo menos dentro de la región o parte referenciada. La identidad puede ser a lo largo de una zona (región o dominio) definida de la secuencia. Una “zona” o “región” de identidad se refiere a una parte de dos o más entidades referenciadas que son iguales. De esta manera, donde dos secuencias de proteína o ácido nucleico son idénticas a lo largo de una o más zonas o regiones de secuencia, comparten identidad dentro de esa región. Una secuencia “alineada” se refiere a múltiples secuencias polinucleotídicas o de proteína (de aminoácidos), que con frecuencia contienen correcciones por bases o aminoácidos faltantes o adicionales (huecos) respecto a una secuencia de referencia.

55 La identidad puede extenderse a lo largo de toda la longitud o una parte de la secuencia. En aspectos particulares, la longitud de la secuencia que comparte el porcentaje de identidad es de 2, 3, 4, 5 o más ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos. En aspectos particulares adicionales, la longitud de la secuencia que comparte identidad es de 21 o más ácidos nucleicos 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. ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos. En aspectos particulares adicionales, la longitud de la secuencia que comparte identidad es de 41 o más ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, etc. ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos. En aspectos particulares todavía adicionales, la longitud de la secuencia que comparte identidad es de 50 o más ácidos nucleicos 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. ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos.

65 Tal como se indica en la presente memoria, las variantes de ácido nucleico codificantes de factor VIII (FVIII) serán diferentes (por ejemplo, las que no son de tipo salvaje), aunque mostraron una identidad de secuencia con el ácido nucleico codificante de FVIII de tipo salvaje. En las variantes de ácido nucleico codificantes de FVIII de codones

optimizados, indicadas como CO1, CO2 y CO/CO3, al nivel de la secuencia de nucleótidos, una variante de ácido nucleico codificante de FVIII de codones optimizados normalmente será por lo menos aproximadamente 70 % idéntica, más habitualmente aproximadamente 75 % idéntica, todavía más habitualmente, aproximadamente 80 % a 85 % idéntica, al ácido nucleico codificante de FVIII de tipo salvaje. De esta manera, por ejemplo, una variante de ácido nucleico codificante de FVIII de codones optimizados puede presentar una identidad de 75 % a 85 % respecto al gen codificante de FVII de tipo salvaje, o entre sí, es decir, CO1 vs. CO2, CO1 vs. CO3, CO2 vs. CO3, etc. tal como se indica en la presente memoria.

Al nivel de la secuencia de aminoácidos, una variante, tal como una proteína FVIII variante, presentará una identidad de por lo menos aproximadamente 70 %, más habitualmente de aproximadamente 80 %, todavía más habitualmente de aproximadamente 90 % o mayor. En otras formas de realización, una variante, tal como una proteína FVIII variante, presenta una identidad de por lo menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor respecto a una secuencia de referencia, por ejemplo, proteína FVIII de tipo salvaje con o sin dominio B.

Con el fin de determinar la identidad, si la FVIII variante (variante de ácido nucleico codificante de FVIII o proteína FVIII) retiene el dominio B, resulta apropiado comparar la identidad respecto al FVIII de tipo salvaje. En el caso de que el FVIII variante (variante de ácido nucleico codificante de FVIII o proteína FVIII) presenta una eliminación del dominio B, resulta apropiado comparar la identidad respecto al FVIII de tipo salvaje que asimismo presenta una eliminación de dominio B.

Los términos "homólogo" u "homología" se refieren a que dos o más entidades referenciadas comparten una identidad por lo menos parcial en una región o parte dada. La expresión "zonas, regiones o dominios" de homología o identidad se refiere a que esa parte de dos o más entidades referenciadas comparten homología o son iguales. De esta manera, en el caso de que dos secuencias sean idénticas en una o más regiones de secuencia, comparten identidad en esas regiones. La expresión "homología sustancial" significa 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) o "porcentaje de identidad" entre dos secuencias puede determinarse utilizando un programa informático y/o algoritmo matemático. En el contexto de la presente invención, se llevan a cabo comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos utilizando el paquete GCG Wisconsin Package versión 9.1, disponible del grupo Genetics Computer Group, en Madison, Wisconsin. Por conveniencia, los parámetros por defecto (penalización por creación de hueco=12, penalización por extensión de hueco=4) especificados por dicho programa están destinados a la utilización en la presente memoria para comparar la identidad de secuencia. Alternativamente, el programa Blastn 2.0 proporcionado por el National Center for Biotechnology Information (presente en Internet en [ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/); Altschul et al., 1990, J Mol Biol 215:403-410) utilizando una alineación con huecos con parámetros por defecto, puede utilizarse para determinar el nivel de identidad y similitud entre secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos. Para las comparaciones entre secuencias polipeptídicas, habitualmente se utiliza un algoritmo de BLASTP en combinación con una matriz de puntuaciones, tal como PAM100, PAM250, BLOSUM62 o BLOSUM50. Asimismo se utilizan los programas de comparación de secuencias FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH, 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 mapeo topológico basado en Delaunay (Bostick et al., Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003)).

Pueden prepararse moléculas de ácido nucleico, vectores de expresión (por ejemplo, genomas de vector), plásmidos, incluyendo variantes de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) de la invención mediante la utilización de procedimientos de tecnología de ADN recombinante. La disponibilidad de información de secuencias nucleotídicas permite la preparación de moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención por una variedad de medios. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) utilizando diversas técnicas de clonación estándar, de ADN recombinante, mediante 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 cribado de bases de datos mediante ordenador. Entre dichas técnicas se incluyen, aunque sin limitación: (1) hibridación de bibliotecas de ADN genómico o ADNc con sondas para detectar secuencias nucleotídicas homólogas, (2) cribado de anticuerpos para detectar polipéptidos que presentan características estructurales compartidas, por ejemplo, utilizando una biblioteca de expresión, (3) reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en ADN genómico o ADNc utilizando cebadores capaces de hibridarse con 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 de ácido nucleico sustraída.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden mantenerse como ADN en cualquier vector de clonación conveniente.

En una forma de realización, los clones se mantienen en un vector plasmídico de clonación/expresión, tal como pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), que se propaga en una célula hospedadora *E. coli* adecuada.

Alternativamente, pueden mantenerse ácidos nucleicos en un vector adecuado para la expresión en células de mamífero. En casos en los que la modificación postraduccional afecta a la función de coagulación, la molécula de ácido nucleico puede expresarse en células de mamífero.

Entre las variantes de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) de la invención se incluyen ADNc, ADN genómico, ARN y fragmentos de los mismos, que pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. De esta manera, la presente invención proporciona oligonucleótidos (cadenas de sentido o antisentido de ADN o ARN) que presentan secuencias capaces de hibridarse con por lo menos una secuencia de un ácido nucleico de la invención. Dichos oligonucleótidos resultan útiles como sondas para detectar la expresión de FVIII.

Puede prepararse una variante de ácido nucleico codificante de FVIII de codones optimizados con eliminación del dominio B de la invención, opcionalmente codificante de polipéptido FVIII variante con o sin una mutación, eliminación o sustitución del sitio de escisión PACE/furina, o un fragmento funcional de cualquiera de ellos tal como se indica en la presente memoria, de una variedad de modos, según procedimientos conocidos. La proteína puede purificarse a partir de fuentes apropiadas, por ejemplo, células o tejidos en cultivo bacterianos o animales transformados que expresan FVIII manipulado, mediante purificación por inmovinoafinidad.

La disponibilidad de las moléculas de ácido nucleico variantes de la invención codificantes de FVIII, opcionalmente codificantes de variante de polipéptido FVIII con o sin una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina, o un fragmento funcional de cualquiera de ellos tal como se indica en la presente memoria, permite la producción de FVIII utilizando procedimientos de expresión *in vitro* conocidos de la técnica. Por ejemplo, puede clonarse un ADNc o un gen en un vector de transcripción *in vitro* apropiado, tal como pSP64 o pSP65, para la transcripción *in vitro*, seguido de la traducción sin células en un sistema de traducción sin células adecuado, tal como lisados de germen de trigo o reticulocitos de conejo. Los sistemas de transcripción y traducción *in vitro* se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, de Promega Biotech, Madison, Wisconsin, o BRL, Rockville, Maryland.

Alternativamente, según una forma de realización, pueden producirse cantidades mayores de FVIII mediante la expresión en un sistema de expresión procariótico o eucariótico adecuado. Por ejemplo, parte o la totalidad de una variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII), por ejemplo, puede insertarse en un vector plásmido adaptado para la expresión en una célula bacteriana, tal como *E. coli* o una línea celular de mamífero, tal como células renales de hámster neonato (BHK), CHO o HeLa. Alternativamente, en una forma de realización, pueden generarse proteínas de fusión etiquetadas que comprenden FVIII. Dichas proteínas de fusión etiquetadas con FVIII están codificadas por parte o la totalidad de una molécula de ADN, ligadas en el marco de lectura de codones correcto a una secuencia de nucleótidos codificante de una parte o la totalidad de una etiqueta polipeptídica deseada que se inserta en un vector plásmido adaptado para la expresión en una célula bacteriana, tal como *E. coli* o una célula eucariótica, tal como, aunque sin limitación, células de levadura y de mamífero.

Los vectores tales como los indicados en la presente memoria comprenden los elementos reguladores necesarios para la expresión del ADN en la célula hospedadora situados de tal manera que permitan la expresión de la proteína codificada en la célula hospedadora. Entre dichos elementos reguladores requeridos para la expresión se incluyen, aunque sin limitación, secuencias de promotor, secuencias de intensificador y secuencias de inicio de transcripción, tal como se indica en la presente memoria y son conocidas por el experto en la materia.

La variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) codificante opcionalmente de proteínas FVIII variantes tal como se indica en la presente memoria, producida mediante expresión génica en un sistema procariótico o eucariótico recombinante, puede purificarse según procedimientos conocidos de la técnica. En una forma de realización, puede utilizarse un sistema de expresión/secreción disponible comercialmente, en el que la proteína recombinante se expresa y después se secreta a partir de la célula hospedadora, para purificarla fácilmente a partir del medio circundante. En el caso de que no se utilicen vectores de expresión/secreción, un enfoque alternativo implica purificar la proteína recombinante mediante separación por afinidad, tal como mediante interacción inmunitaria con anticuerpos que se unen específicamente a la proteína recombinante o columnas de níquel para el aislamiento de las proteínas recombinantes etiquetadas con 6 a 8 residuos de histidina en su extremo N-terminal o C-terminal. Las etiquetas alternativas pueden comprender el epítipo FLAG, GST o el epítipo hemaglutinina. Dichos procedimientos son utilizados habitualmente por el experto en la materia.

Las proteínas FVIII, preparadas mediante los procedimientos mencionados anteriormente, pueden analizarse según procedimientos estándares. Por ejemplo, pueden evaluarse dichas proteínas para propiedades de coagulación alteradas según procedimientos conocidos.

Tal como se da a conocer en la presente memoria, una manera conveniente de producir un polipéptido según la invención es expresar ácido nucleico codificante del mismo, mediante la utilización del ácido nucleico en un sistema de expresión. El experto en la materia conoce perfectamente una variedad de sistemas de expresión útiles para

los procedimientos de la invención.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona, además, procedimientos de preparación de un polipéptido (tal como se da a conocer), en donde el procedimiento incluye la expresión a partir de ácido nucleico codificante del polipéptido (generalmente ácido nucleico). Ello puede conseguirse convenientemente mediante el cultivo de una célula hospedadora que contiene dicho vector, bajo condiciones apropiadas que causan o permiten la producción del polipéptido. Asimismo pueden producirse polipéptidos en sistemas *in vitro*.

Entre los procedimientos y utilizaciones de la invención se incluyen administrar (transducir) ácido nucleico (transgén) en células hospedadoras, incluyendo células proliferantes y/o no proliferantes. Los ácidos nucleicos, vector recombinante (por ejemplo, AAVr), procedimientos, usos y formulaciones farmacéuticas de la invención adicionalmente resultan útiles en un procedimiento de suministro, administración o provisión de una proteína a un sujeto que la necesita, como un procedimiento de tratamiento. De esta manera, el ácido nucleico se transcribe y puede producirse la proteína *in vivo* en el sujeto. El sujeto podría beneficiarse o necesitar la proteína debido a que el sujeto presenta una deficiencia de la proteína, o debido a que la producción de la proteína en el sujeto puede proporcionar algún efecto terapéutico, como un procedimiento de tratamiento u otro.

Pueden utilizarse vectores, incluyendo secuencias de vector lentivírico o parvovírico (por ejemplo, AAV), partículas víricas recombinantes, procedimientos y usos para administrar una variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) con un efecto biológico para tratar o aliviar uno o más síntomas asociados a una deficiencia o anomalía de FVIII. Pueden utilizarse secuencias de vector lentivírico o parvovírico recombinante (por ejemplo, AAV), plásmidos, partículas víricas recombinantes, procedimientos y usos para proporcionar terapia para diversos estados de enfermedad que implican o se deben a una deficiencia o anomalía de FVIII.

Los ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinante (por ejemplo, AAVr) y partículas víricas recombinantes, procedimientos y utilizaciones de la invención permiten el tratamiento de enfermedades genéticas, por ejemplo, una deficiencia de FVIII. Para las enfermedades de estado de deficiencia, puede utilizarse la transferencia génica para llevar un gen normal al interior de los tejidos afectados para la terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales para 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 un esfuerzo por contrarrestar el estado de enfermedad. La utilización de la integración específica de sitio de secuencias de ácido nucleico para corregir defectos asimismo es posible.

En formas de realización particulares, pueden utilizarse variantes de ácido nucleico codificantes de factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes codificantes de FVIII de codones optimizados), variantes de ácido nucleico codificante de proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico con codones optimizados codificante de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, por ejemplo, como agentes terapéuticos y/o profilácticos (proteínas o ácidos nucleicos) que modulan la cascada de coagulación sanguínea o como un transgén en un gen. Por ejemplo, las variantes de ácido nucleico codificantes de factor VIII (FVIII) pueden presentar una actividad de coagulación similar a la del FVIII de tipo salvaje, o una actividad de coagulación alterada en comparación con FVII de tipo salvaje, tal como en el caso de una proteína FVIII variante (por ejemplo, una variante de ácido nucleico de codones optimizados codificante de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional. Las estrategias basadas en células permiten la expresión continua de variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) o variantes de proteína FVIII en pacientes de hemofilia A. Tal como se da a conocer en la presente memoria, determinadas modificaciones de las moléculas de FVIII (ácidos nucleicos y proteínas) resultan en una expresión incrementada al nivel de ácidos nucleicos, una eficiencia de empaquetado incrementada por el vector vírico (por ejemplo, AAV) y una actividad de coagulación incrementada y mayor estabilidad al nivel de proteínas, mejorando eficazmente de esta manera la hemostasia.

Las variantes de ácido nucleico codificantes de factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico codificantes de proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos pueden utilizarse para una variedad de propósitos según la invención. En una forma de realización, se proporciona un vehículo de administración de ácido nucleico (es decir, un vector de expresión) para modular la coagulación sanguínea, en el que el vector de expresión comprende variantes de ácido nucleico codificantes de factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico codificantes de proteína VIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos tal como se indica en la presente memoria. La administración de vectores de expresión codificantes de FVIII a un paciente resulta en la expresión de proteína FVIII que sirve para alterar la cascada de coagulación. Según la invención, una variante de ácido nucleico que codifica factor VIII (FVIII) puede codificar para un polipéptido FVIII tal como se indica en la presente memoria (por ejemplo, una proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional, cuya expresión incrementa la hemostasia. En una forma de realización, una variante de ácido nucleico codificante de factor VIII



(FVIII) codifica un polipéptido FVIII variante, tal como una proteína FVIII con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina, o un fragmento funcional de la misma.

En formas de realización adicionales de la invención, se proporcionan composiciones y procedimientos para la administración de un vector vírico que comprende una variante de ácido nucleico que codifica factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico codificantes de proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos. En una forma de realización, el vector de expresión que comprende variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, es un vector vírico.

Los vectores de expresión que comprenden una variante de ácido nucleico que codifica factor VIII (FVIII) (por ejemplo, una variante de codones optimizados codificante de FVIII), una variante de ácido nucleico que codifica proteína FVIII variante (por ejemplo, una variante de codones optimizados codificante de FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, pueden administrarse solos, o en combinación con otras moléculas útiles para modular la hemostasia. Según la invención, pueden administrarse los vectores de expresión o combinación de agentes terapéuticos al paciente por sí solos o en un composiciones farmacéuticamente aceptables o biológicamente compatibles.

Los vectores víricos, tales como los vectores lentivíricos y parvovíricos, incluyendo los serotipos de AAV y las variantes de los mismos, proporcionan un medio para el suministro de ácido nucleico en el interior de células *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, que codifica proteínas, de manera que las células expresan la proteína codificada. Los 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, estos virus pueden introducir ácido nucleico/material genético en sitios específicos, por ejemplo. Debido a que los AAV no están asociados a enfermedad patógena en seres humanos, los vectores de AAV son capaces de suministrar secuencias polinucleótidas heterólogas (por ejemplo, proteínas y agentes terapéuticos) en pacientes humanos sin causar patogénesis o enfermedad por AAV sustancial.

Entre los vectores víricos que pueden utilizarse en la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vectores virus adenoasociados (AAV) de múltiples serotipos (por ejemplo, AAV-1 o AAV-12, y otros) y vectores de AAV híbridos/químicos, vectores lentivíricos y vectores lentivíricos pseudotipados [por ejemplo, virus ébola, virus de la estomatitis vesicular (VEV) y virus de la inmunodeficiencia felina (VIF)], vectores de virus del herpes simple, vectores adenovíricos (con o sin promotores/intensificadores específicos de tejido), vectores de virus *Vaccinia*, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores no víricos y otros.

Las partículas de AAV y lentivíricas pueden utilizarse ventajosamente como vehículos para el suministro génico efectivo. Tales viriones poseen varias características deseables para dichas aplicaciones, incluyendo el tropismo para células proliferantes y no proliferantes. La experiencia clínica inicial con estos vectores asimismo ha demostrado que no producen toxicidad sostenida y las respuestas inmunitarias son mínimas o indetectables. Es conocido que los AAV infectan una amplia variedad de tipos celulares *in vivo* e *in vitro* mediante endocitosis mediada por receptores o mediante transcitosis. Estos sistemas de vector han sido sometidos a ensayo en seres humanos con diana en el epitelio retiniano, hígado, músculo esquelético, vías respiratorias, cerebro, articulaciones y células madre hematopoyéticas. Los vectores no víricos, por ejemplo, basados en ADN plasmídico o minicírculos, asimismo son vectores de transferencia génica adecuados para un gen de gran tamaño, tal como el codificante de FVIII.

Puede resultar deseable introducir un vector que pueda proporcionar, por ejemplo, múltiples copias de un gen deseado y, por lo tanto, mayores cantidades del producto de ese gen. Se han descrito en detalle vectores de AAV y lentivíricos mejorados y procedimientos para producir estos vectores, en varias referencias, patentes y solicitudes de patente, incluyendo: Wright J.F. (Hum Gene Ther 20:698-706, 2009), una tecnología utilizada para la producción de vector de grado clínico en el Children's Hospital of Philadelphia. Asimismo puede producirse vector lentivírico en CHOP y los demás vectores se encuentran disponibles a través del laboratorio central de producción de vectores lentivíricos del Gene Therapy Resource Program (GTRP) del NHLBI, Lentivirus Vector Production Core Laboratory.

De acuerdo con lo anterior, en diversas formas de realización de la invención, un vector incluye un vector lentivírico o parvovírico, tal como un vector adenovírico. En formas de realización particulares, un vector recombinante es un vector parvovírico. Los parvovirus son virus pequeños con un genoma de ADN de cadena sencilla. Los "virus adenoasociados" (AAV) están incluidos en la familia de los parvovirus.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona vectores víricos que incluyen variantes de ácido nucleico que

codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico codificantes de proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos. Por ejemplo, un vector de AAV recombinante puede incluir un ácido nucleico codificante de una proteína deseada (por ejemplo, factor VIII), tal como una variante de ácido nucleico codificante de factor VIII (FVIII) de codones optimizados (por ejemplo, variante de codones optimizados codificante de FVIII), donde la proteína FVIII codificada opcionalmente presenta una eliminación del dominio B, variantes de ácido nucleico codificantes de proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos. Por lo tanto, el suministro o administración de vector a un sujeto (por ejemplo, mamífero) proporciona FVIII (mediante, por ejemplo, variante de ácido nucleico de codones optimizados codificante de FVIII), variantes de ácido nucleico codificantes de proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, a un sujeto, tal como un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

La administración directa de vectores o la transducción *ex vivo* de células humanas, seguido de la infusión en el cuerpo resultará en la expresión de FVIII, ejerciendo de esta manera un efecto terapéutico beneficioso sobre la hemostasia. En el contexto de la invención, el factor VIII descrito en la presente memoria, tal administración potencia la actividad procoagulación.

Los vectores de AAV y vectores lentivíricos normalmente no incluyen genes víricos asociados a la patogénesis. Dichos vectores normalmente presentan uno o más de los genes de AAV de tipo salvaje eliminados en su totalidad o en parte, por ejemplo, genes *rep* y/o *cap*, aunque retienen por lo menos una secuencia de ITR flanqueante funcional, necesaria para el rescate, la replicación y el empaquetado del vector recombinante en una partícula de vector de AAV. Por ejemplo, sólo se incluyen las partes esenciales del vector, por ejemplo, los elementos de ITR y RTL, respectivamente. Por lo tanto, un genoma de vector de AAV incluiría las secuencias requeridas en cis para la replicación y el empaquetado (por ejemplo, secuencias de ITR funcionales).

El vector de AAV recombinante, así como los procedimientos y utilizaciones del mismo, incluyen cualquier cepa o serotipo vírico. A título de ejemplo no limitativo, un vector de AAV recombinante puede estar basado en cualquier genoma de AAV, tal como AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -rh74, -rh10 o AAV-2i8, por ejemplo. Tales 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 vector de AAV recombinante basado en un genoma de un serotipo puede ser idéntico a una o más de las proteínas de cápside que empaquetan el vector. Además, un genoma de vector de AAV recombinante puede estar basado en un genoma de AAV (por ejemplo, AAV2) de serotipo diferente de una o más de las proteínas de cápside de AAV que empaquetan el vector. Por ejemplo, el genoma del vector de AAV puede estar basado en AAV2, mientras que por lo menos una de las tres proteínas de cápside podría ser AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 o variante de las mismas, por ejemplo.

En formas de realización particulares, entre los virus adenoasociados (AAV) se incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, 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 se indica en el documento WO 2013/158879 (solicitud de patente internacional nº PCT/US2013/037170) y documento WO 2015/013313 (solicitud de patente internacional nº PCT/US2014/047670). Entre las variantes de AAV se incluyen las variantes AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 y AAV-2i8. De acuerdo con lo anterior, se proporcionan vectores de AAV y variantes de AAV (por ejemplo, variantes de cápside) que incluyen (encapsidan o empaquetan) variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos.

Los serotipos de AAV y variantes de AAV (por ejemplo, variantes de cápside) (por ejemplo, las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3) pueden ser o no diferentes de otros serotipos de AAV, incluyendo, por ejemplo, AAV1-AAV12, Rh74 o Rh10 (por ejemplo, diferentes de secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 de cualquiera de los serotipos AAV1-AAV12, 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 serológicamente diferente de otros serotipos de AAV. La diferenciación serológica se determina a partir de la ausencia de reactividad cruzada entre anticuerpos contra un AAV en comparación con otro AAV. Tales diferencias de reactividad cruzada habitualmente se deben a diferencias en secuencias de proteína de cápside/determinantes antigénicos (por ejemplo, debido a diferencias en la secuencia de VP1, VP2 y/o VP3 de los serotipos de AAV). A pesar de la posibilidad de que las variantes de AAV que incluyen variantes de cápside no sean serológicamente diferentes de un AAV de referencia u otro serotipo de AAV, difieren en por lo menos un

nucleótido o residuo aminoácido en comparación con el serotipo de referencia u otro serotipo de AAV.

Bajo la definición tradicional, un serotipo se refiere a 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 encuentran más aislados víricos naturales y/o se generen más mutantes de cápside, podría haber o no diferencias serológicas respecto a cualquiera de los serotipos actualmente existentes. De esta manera, en los casos en que el nuevo virus (por ejemplo, AAV) no presenta diferencias serológicas, este nuevo virus (por ejemplo, AAV) sería un subgrupo o variante del serotipo correspondiente. En muchos casos, los ensayos serológicos para actividad neutralizadora todavía no se han realizado en virus mutantes con modificaciones de secuencia de cápside para determinar si son otro serotipo según la definición tradicional de serotipo. De acuerdo con ello, en aras de la conveniencia y para evitar repeticiones, el término "serotipo" se refiere en términos amplios tanto a virus serológicamente diferentes (por ejemplo, AAV), como a virus (por ejemplo, AAV) que no son serológicamente diferentes y que pueden clasificarse en un subgrupo o una variante de un serotipo dado.

Por lo tanto, entre los vectores de 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 presentan identidad de secuencia sustancial a una o más secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas que comprenden 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 a una o más secuencias polinucleotídicas 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 polinucleotídicas o polipeptídicas que comprende AAV-Rh74. Tales vectores de AAV relacionados con otro serotipo, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, por lo tanto, puede presentar una o más secuencias diferentes de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, aunque puede 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, AAV12, Rh10, Rh74 y AAV-2i8 (por ejemplo, tal como tropismo celular/tisular). Entre los AAV variantes de ejemplo no limitativo se incluyen variantes de cápside de cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3.

En diversas formas de realización de ejemplo, un vector de AAV relacionado con un serotipo de referencia presenta un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia del mismo que incluye o consiste en una secuencia por lo menos 80 % o más (por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, etc.) idéntica a uno o más de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 y AAV-2i8 (por ejemplo, tal como las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3).

Entre las composiciones, procedimientos y usos de la invención se incluyen secuencias de AAV (polipéptidos y nucleótidos) y subsecuencias de los mismos 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, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, pero que son diferentes y no idénticos a los genes o proteínas de AAV conocidos, tales como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 y AAV-2i8, genes o proteínas, etc. En una forma de realización, un polipéptido de AAV o subsecuencia del mismo incluye o consiste en una secuencia por lo menos 75 % o más idéntica, por ejemplo, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.1 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, etc. y 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, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 (por ejemplo, VP1, VP2 y/o VP3). En aspectos particulares, una variante de AAV presenta 1, 2, 3, 4, 5 a 10, 10 a 15, 15 a 20 o más sustituciones de aminoácidos.

Pueden construirse vectores de AAV recombinantes, incluyendo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, 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 de ácido nucleico (transgenes) flanqueados por una o más secuencias de ITR de AAV funcionales.

En una forma de realización de la invención, las variantes de polipéptido FVIII, tales como la variante de FVIII humana con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina, puede administrarse al paciente mediante infusión en un portador biológicamente compatible, por ejemplo, mediante inyección intravenosa. Las variantes de polipéptido FVIII, tales como la variante de FVIII humana con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina de la invención puede encapsularse opcionalmente en liposomas o mezclarse con otros fosfolípidos o micelas para incrementar la estabilidad de la molécula. La proteína FVIII con una mutación, eliminación o sustitución del sitio de recorte de PACE/furina, o un fragmento funcional, puede administrarse por sí sola o en combinación con otros agentes que es conocido que modulan la hemostasia (por ejemplo, factor V, factor Va o derivados de los mismos).

Una composición apropiada en la que administrar las variantes de polipéptido FVIII, tales como la variante de FVIII humana con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina puede ser determinada por un profesional médico tras la consideración de una variedad de variables fisiológicas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, el estado del paciente y el estado hemodinámico. Una variedad de composiciones idóneas para diferentes aplicaciones y vías de administración son bien conocidas de la técnica y se describen a continuación en la presente memoria.

Una preparación que contiene proteína FVIII purificada, tal como una variante de FVIII con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina, o un fragmento funcional, contiene una matriz fisiológicamente aceptable y puede formularse en forma de una preparación farmacéutica. La preparación puede formularse utilizando procedimientos de la técnica anterior sustancialmente conocidos, puede mezclarse con un tampón que contiene sales, tales como NaCl, CaCl<sub>2</sub> y aminoácidos, tales como glicina y/o lisina, y en un intervalo de pH de entre 6 y 8. Hasta que se necesita, la preparación purificada que contiene variante de FVIII puede almacenarse en la forma de una solución acabada o en forma liofilizada o ultracongelada.

Una preparación puede almacenarse en forma liofilizada y disolverse en una solución visualmente transparente utilizando una solución de reconstitución apropiada. Alternativamente, la preparación según la invención asimismo puede ponerse a disposición en forma de una preparación líquida o en forma de un líquido que esté ultracongelado. La preparación según la invención opcionalmente puede ser especialmente estable, es decir, puede dejarse en reposo en forma disuelta durante un tiempo prolongado antes de la administración o la entrega.

La preparación según la invención puede ponerse a disposición en forma de una preparación farmacéutica con actividad de FVIII en la forma de una preparación monocomponente o en combinación con otros factores en la forma de una preparación multicomponente. Antes del procesamiento de la proteína purificada en una preparación farmacéutica, la proteína purificada se somete a los controles de calidad convencionales y se conforma en una forma terapéutica de presentación. En particular, durante la preparación recombinante, la preparación purificada se somete a ensayo para la ausencia de ácidos nucleicos celulares, así como ácidos nucleicos que derivan del vector de expresión, tal como se describe en el documento EP 0 714 987.

La preparación de proteína farmacéutica puede utilizarse a dosis de entre 30 y 100 UI/kg (una U.I. es 100 ng/ml) en forma de una única inyección diaria o hasta 3 veces/día durante varios días. Los pacientes pueden tratarse inmediatamente tras la presentación en la clínica con un sangrado. Alternativamente, los pacientes pueden recibir una infusión de bolo cada ocho a doce horas, o si se observa una mejora suficiente, una infusión una vez al día de la FVIII variante descrita en la presente memoria.

La invención proporciona, además, composiciones, tales como composiciones que incluyen variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácidos nucleicos de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), y fragmentos funcionales de cualquiera de ellos, que presentan uno o más de los atributos siguientes: 1) muestran una expresión incrementada por células o en animales, 2) muestran una secreción incrementada por células, 3) muestran una actividad incrementada, según se muestra en una coagulación incrementada, por ejemplo, 4) muestran una estabilidad incrementada, y 5) muestran un empaquetado incrementado por el vector de AAV.

De acuerdo con lo anterior, los ácidos nucleicos, vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, AAVr) y partículas víricas recombinantes y otras composiciones, agentes, fármacos, biológicos (proteínas) de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones farmacéuticas resultan útiles para, entre otras cosas, la administración y el suministro a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

En unas formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas contienen, además, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Entre dichos excipientes se incluyen cualquier agente farmacéutica que no induzca por sí mismo una respuesta inmunitaria perjudicial para el individuo que recibe la composición, y que puede administrarse sin toxicidad indebida.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" se refiere a una formulación biológicamente aceptable, gaseosa, líquida o sólida, o mezcla de las mismas, que resulta adecuada para una o más vías de administración, el suministro o el contacto *in vivo*. Una composición "farmacéuticamente aceptable" o "fisiológicamente aceptable" es un material que no resulta biológica o de otro modo indeseable, por ejemplo, el material puede administrarse al sujeto sin causar efectos biológicos indeseables sustanciales. De esta manera, tal composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, en la administración de un ácido nucleico, vector, partícula vírica o proteína a un sujeto.

Entre los excipientes farmacéuticamente aceptables se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol, azúcares y etanol. Asimismo pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables

en los mismos, por ejemplo, sales ácidas minerales, tales como hidroccloruros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares, y las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares.

La composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de una sal y puede formarse con muchos ácidos, incluyendo, aunque sin limitación, los ácidos clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en solventes acuosos u otros solventes protónicos que las formas de base libre correspondientes. En otros casos, la preparación puede ser unos polvos liofilizados que pueden contener algunos o todos los siguientes: histidina 1 a 50 mM, sacarosa al 0.1 % a 2 % y manitol al 2 % a 7 %, en un intervalo de pH de entre 4.5 y 5.5, que se combina con tampón antes del uso.

Entre las composiciones farmacéuticas 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 en dispersión y suspensión, recubrimientos, agentes isotónicos y promotores o retardadores de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica o el contacto o suministro *in vivo*. Los solventes, soluciones y suspensiones acuosos y no acuosos pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Entre tales portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen comprimidos (recubiertos o no recubiertos), cápsulas (duras o blandas), microesferas, polvos, gránulos y cristales. Asimismo pueden incorporarse en las composiciones, compuestos activos suplementarios (por ejemplo, conservantes, agentes antibacterianos, antivíricos y antifúngicos).

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para ser compatibles con una vía de administración o suministro particular, tal como se indica en la presente memoria o es conocido para el experto en la materia. De esta 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 normalmente son estériles y pueden ser isotónicas con la sangre del receptor pretendido. Entre los ejemplos ilustrativos pero no limitativos se incluyen agua, solución salina tamponada, solución de Hank, solución de Ringer, dextrosa, fructosa, etanol, aceites animales, vegetales o sintéticos. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano.

Además, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones para inyección en aceite apropiadas. Entre los solventes o vehículos lipofílicos adecuados se incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión puede contener, además, estabilizantes o agentes adecuados que incrementen la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

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 ácido graso de polioxietileno. 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.

Después de la preparación de las composiciones farmacéuticas, pueden introducirse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento. Para la administración de vectores o polipéptidos que contienen FVIII, dicho etiquetado incluiría la cantidad, la frecuencia y el procedimiento de administración.

Las composiciones farmacéuticas y sistemas de administración apropiados para las composiciones, procedimientos y utilidades de la invención son conocidos en la materia (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003), 20a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12a ed., 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 ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; y Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., páginas 253 a 315).

La invención proporciona, además, procedimientos para introducir variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variante de codones optimizados codificante de FVIII), variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, variante de ácido nucleico de codones optimizados codificante de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), y fragmentos funcionales de cualquiera de ellos en una célula o un animal. En una forma de realización particular, la invención proporciona medios para modular la hemostasia. En una forma de realización, un procedimiento incluye el contacto o la administración de un individuo (paciente o sujeto, tal como un mamífero) con un vehículo de suministro de

ácido nucleico (por ejemplo, un vector de AAV) que comprende una variante de ácido nucleico que codifica factor VIII (FVIII) (por ejemplo, una variante de codones optimizados codificante de FVIII), o variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, variante de ácido nucleico de codones optimizados codificante de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, bajo condiciones en las que el polipéptido FVIII se expresa en el individuo. En otra forma de realización, un procedimiento incluye proporcionar células de un individuo (paciente o sujeto, tal como un mamífero) con un vehículo de suministro de ácido nucleico (por ejemplo, un vector de AAV) que comprende una variante de ácido nucleico que codifica factor VIII (FVIII) (por ejemplo, una variante de codones optimizados codificante de FVIII), o variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, una variante de ácido nucleico de codones optimizados codificante de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, bajo condiciones en las que el polipéptido FVIII se expresa en el individuo.

A partir de lo anteriormente expuesto, puede observarse que las variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados que codifican proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, pueden utilizarse en el tratamiento de trastornos asociados a una coagulación sanguínea deficiente, insuficiente o aberrante.

Pueden administrarse composiciones de variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o fragmentos funcionales, de cualquiera de ellos, incluyendo vectores, vectores recombinantes (por ejemplo, AAVr) y partículas víricas recombinantes, y pueden proporcionarse procedimientos y utilidades de la invención, en una cantidad suficiente o eficaz a un sujeto que necesita de los mismos. Una "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona, en dosis individuales o múltiples, solas 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 plazo o a corto plazo), un resultado esperado o deseado en un sujeto, o un beneficio para un sujeto, de cualquier grado medible o detectable o durante cualquier duración de tiempo (por ejemplo, durante minutos, horas, días, meses, años, o la curación).

Las dosis pueden variar y depender del tipo, inicio, progresión, gravedad, frecuencia, duración o probabilidad de la enfermedad a la que está destinada el tratamiento, el resultado clínico deseado, los tratamientos previos o simultáneos, el estado general de salud, la edad, el sexo, el origen étnico o la competencia inmunitaria del sujeto, y otros factores que serán apreciados por el experto en la materia. La cantidad, número, frecuencia o duración de las dosis puede incrementarse o reducirse proporcionalmente, según indiquen cualesquiera efectos secundarios adversos, complicaciones u otros factores de riesgo del tratamiento o terapia y del estado del sujeto. El experto en la materia apreciará cuáles son los factores que pueden influir sobre la dosis y tiempos requeridos para proporcionar una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico.

La dosis para alcanzar 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 tratada, cualquier respuesta inmunitaria del huésped al vector vírico, una respuesta inmunitaria del hospedador contra el polinucleótido o producto de expresión (proteína) heteróloga, y la estabilidad de la proteína expresada. El experto en la materia puede determinar un intervalo de dosis de AAVr/genomas de vector para el tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad o trastorno particular, basándose en los factores anteriormente indicados, así como otros factores. Generalmente, las dosis estarán comprendidas entre por lo menos  $1 \times 10^8$ , o más, por ejemplo,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$  o  $1 \times 10^{14}$ , o más, genomas de vector por kilogramo (gv/kg) del peso del sujeto, para conseguir un efecto terapéutico. Las dosis de AAV comprendida en el intervalo de entre  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^{11}$  en ratones, y entre  $1 \times 10^{12}$  y  $1 \times 10^{13}$  en perros, han resultado eficaces.

Utilizando la hemofilia B como ejemplo, en términos generales se cree que, a fin de conseguir un efecto terapéutico, se requiere una concentración de factor de coagulación sanguínea que sea superior a 1 % de la concentración de factor observada en un individuo normal para modificar un fenotipo de enfermedad grave a un fenotipo moderado. El fenotipo grave se caracteriza por daños articulares y sangrados potencialmente mortales. Para convertir un fenotipo de enfermedad moderada a uno leve, se cree que se requiere una concentración de factor de coagulación sanguínea superior a 5 % de lo normal. Con respecto al tratamiento de dicho sujeto hemofílico, una dosis típica es por lo menos  $1 \times 10^{10}$  genomas de vector (gv) por kilogramo (gv/kg) del peso del sujeto, o entre aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^{11}$  gv/kg del peso del sujeto, o entre aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  y  $1 \times 10^{12}$  gv/kg del peso del sujeto, o entre aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  y  $1 \times 10^{13}$  gv/kg del peso del sujeto, para conseguir un efecto terapéutico deseado.

Las dosis de una "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" para el tratamiento (por ejemplo, para aliviar o proporcionar un beneficio o mejora terapéutico) normalmente son 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 empeoramiento de la enfermedad es un resultado satisfactorio.

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

De acuerdo con lo anterior, entre los procedimientos y utilizaciones de la invención se incluyen, además, entre otras cosas, procedimientos 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 procedimiento o utilización de la invención presenta un beneficio terapéutico en el caso de que en un sujeto dado, se consiga 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, según la invención, se proporcionan procedimientos y usos para reducir la necesidad o el uso de otro tratamiento o terapia.

Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente no es necesariamente eficaz en todos y cada uno de los sujetos tratados, ni en una mayoría de los sujetos tratados en un grupo o población dada. Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente se refiere a la eficacia o suficiencia en un sujeto particular, no en un grupo o en la población general. Tal como es típico para tales procedimientos, algunos sujetos mostrarán una mayor respuesta, o una menor respuesta o ninguna respuesta a un procedimiento de tratamiento o uso dado.

El término "alivio" se refiere a una mejora detectable o medible en la enfermedad o síntoma de la misma en un sujeto. La mejora detectable o medible incluye una disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación o control subjetivos u objetivos en la ocurrencia, frecuencia, gravedad, progresión o duración de la enfermedad, o una complicación causada o asociada a la enfermedad, o una mejora en un síntoma o una causa subyacente o una consecuencia de la enfermedad, o una reversión de la enfermedad. Para HemA, una cantidad eficaz sería una cantidad que reduce la frecuencia o gravedad de los episodios de sangrado agudo en un sujeto, por ejemplo, o una cantidad que reduce el tiempo de coagulación medido mediante un ensayo de coagulación, por ejemplo.

De acuerdo con lo anterior, entre las composiciones farmacéuticas de la invención se incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito terapéutico pretendido. La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está perfectamente comprendida en los conocimientos del experto médico mediante la utilización de las técnicas y guías proporcionadas en la invención.

Las dosis terapéuticas dependerán, entre otros factores, de la edad y estado general del sujeto, de la gravedad del fenotipo aberrante de coagulación sanguínea, y de la fuerza de las secuencias de control que regulan los niveles de expresión de variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII) (por ejemplo, variantes de codones optimizados codificantes de FVIII), variantes de ácido nucleico que codifican proteína FVIII variante (por ejemplo, variantes de ácido nucleico de codones optimizados que codifican proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina), o un fragmento funcional de cualquiera de ellos. De esta manera, una cantidad terapéuticamente eficaz en seres humanos se encontrará comprendida en un intervalo relativamente amplio que puede ser determinado por el profesional médico basándose en la respuesta del paciente individual al tratamiento de FVIII basado en un vector.

Pueden administrarse al sujeto composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, de manera que permitan la producción de una proteína biológicamente activa (por ejemplo, variantes de ácido nucleico que codifican factor VIII (FVIII), o proteína FVIII variante codificada por variantes de ácido nucleico, tales como variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII con una mutación, eliminación o sustitución del sitio de escisión PACE/furina, o un fragmento funcional de cualquiera de ellos) o mediante la inducción de la expresión continua del transgén de FVIII *in vivo* mediante terapias basadas en genes o en células, o mediante la modificación *ex vivo* de las células del paciente o de un donante. En una forma de realización particular, unas composiciones farmacéuticas que comprenden suficiente material genético para permitir a un receptor producir una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido FVIII pueden influir sobre la hemostasia en el sujeto.

Alternativamente, tal como se da a conocer en la presente memoria, puede infundirse directamente en un paciente que lo requiere, una cantidad eficaz de un polipéptido de factor VIII variante, tal como FVIII con una o más mutaciones, eliminaciones o sustituciones en el sitio de reconocimiento de corte de proteasa intracelular (PACE/furina).

Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con por lo menos otro agente, tal como un compuesto estabilizador, que puede administrarse en cualquier portador farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo, aunque sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse al paciente solas, o en combinación con otros agentes (por ejemplo, cofactores) que influyen sobre la hemostasia.

Los polipéptidos de factor VIII variantes, solos o en combinación con otros agentes, pueden administrarse o ponerse en contacto o infundirse directamente en un paciente en un portador biológico apropiado tal como se describe en la presente memoria. Pueden administrarse vectores de expresión de la invención que comprenden secuencias de ácido nucleico variante que codifican FVIII, tales como variantes de codones optimizados codificantes de FVIII, o proteína FVIII variante codificada por variantes de ácido nucleico, tales como variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución del sitio de escisión PACE/furina, o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, a un paciente mediante una variedad de medios a fin de conseguir y opcionalmente mantener durante un periodo de tiempo un nivel profiláctico y/o terapéuticamente eficaz de polipéptido FVIII. El experto en la materia podrá determinar fácilmente los protocolos específicos para utilizar los vectores de expresión codificantes de FVIII de la invención para el tratamiento terapéutico de un paciente particular.

Los protocolos para la generación de vectores adenovíricos y la administración a pacientes han sido descritos en las patentes US nº 5.998.205, nº 6.228.646, nº 6.093.699, nº 6.100.242, y en las solicitudes de patente internacional WO 94/17810 y WO 94/23744, que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. En particular, por ejemplo, se utilizan vectores de AAV para administrar factor VIII (FVIII) codificado por variantes de ácido nucleico, tales como variantes de codones optimizados codificantes de FVIII, o proteína FVIII variante codificada por variantes de ácido nucleico, tales como variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución del sitio de escisión PACE/furina, o un fragmento funcional de cualquiera de ellos, a un paciente que lo necesita.

El factor VIII (FVIII) codificado por variantes de ácido nucleico, tales como variantes de codones optimizados codificantes de FVIII, o proteína FVIII variante codificada por variantes de ácido nucleico, tales como variantes de ácido nucleico de codones optimizados codificantes de proteína FVIII variante con una mutación, eliminación o sustitución de sitio de escisión PACE/furina, o un fragmento de funcional de cualquiera de ellos administrado mediante los vectores de AAV de la invención, puede administrarse al paciente mediante cualesquiera medios conocidos.

Entre los procedimientos y utilidades de la invención se incluyen el suministro y la administración sistémica, regional o local, o por cualquier vía, por ejemplo, mediante inyección o infusión. El suministro de las composiciones farmacéuticas *in vivo* puede llevarse a cabo en general mediante inyección utilizando una jeringa convencional, aunque se encuentran contemplados otros procedimientos de administración, tales como la administración potenciada por convección (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.720.720). Por ejemplo, pueden administrarse composiciones por vía subcutánea, epidérmica, intradérmica, intratecal, intraorbitaria, intramucosa, intraperitoneal, intravenosa, intrapleural, intraarterial, oral, intrahepática, mediante la vena portal, o por vía intramuscular. Entre otros modos de administración se incluyen la administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas. El médico clínico especializado en el tratamiento de pacientes con trastornos de la coagulación sanguínea puede determinar la vía óptima para la administración de los vectores asociados a adenovirus que comprenden secuencias de ácido nucleico de FVIII basándose en varios criterios, incluyendo, aunque sin limitación: el estado del paciente y el propósito del tratamiento (por ejemplo, una coagulación sanguínea mejorada o reducida).

Los procedimientos y utilidades de la invención pueden combinarse con cualquier compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen o protocolo terapéutico que presente una actividad o efecto terapéutico deseados, beneficiosos, aditivos, sinérgicos o complementarios. Entre las composiciones y tratamientos combinados de ejemplo se incluyen segundos activos, tales como productos biológicos (proteínas), agentes y fármacos. Tales productos biológicos (proteínas), agentes, fármacos, tratamientos y terapias pueden administrarse o llevarse a cabo antes, de manera sustancialmente simultánea, o después de cualquier otro procedimiento o utilización de la invención, por ejemplo, un procedimiento terapéutico de tratamiento de un sujeto para una enfermedad de la coagulación sanguínea, tal como HemA.

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 concurrentemente o en serie o secuencialmente (antes o después) del suministro o administración de un ácido nucleico, vector, vector recombinante (por ejemplo, AAVr), o partícula vírica recombinante. Por lo tanto, la invención proporciona



combinaciones en las que un procedimiento o utilización de la invención se encuentra en una combinación con cualquier compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, procedimiento, remedio o composición, indicado en la presente memoria 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, AAVr), o partícula vírica recombinante de la invención, a un sujeto.

La invención resulta útil en animales, incluyendo aplicaciones médicas humanas y veterinarias. Por lo tanto, entre los sujetos adecuados se incluyen mamíferos, tales como seres humanos, tales 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, tales como pollos y patos, caballos, vacas, cabras, ovejas y cerdos) y animales experimentales (ratones, ratas, conejos y cobayas). Entre los sujetos humanos se incluyen sujetos fetales, neonatales, pediátricos, juveniles y adultos. Entre los sujetos se incluyen modelos animales de enfermedad, por ejemplo, modelos de ratón y otros modelos animales de enfermedades de la coagulación sanguínea, tales como HemA y otros conocidos por el experto en la materia.

Entre los sujetos apropiados para el tratamiento según la invención se incluyen aquellos que presentan o están en riesgo de producir una cantidad insuficiente o que presenta una deficiencia en un producto génico funcional (por ejemplo, proteína FVIII), o producen un producto génico aberrante, parcialmente funcional o no funcional (por ejemplo, proteína FVIII), o producen un producto génico aberrante, parcialmente funcional o no funcional (por ejemplo, proteína FVIII), que puede conducir a 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 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 aberrante, insuficiente o ausente de factor de coagulación sanguínea, tal como hemofílicos (por ejemplo, hemofilia A).

Entre los sujetos apropiados para el tratamiento según la invención se incluyen, además, aquellos que presentan o están en riesgo de producir anticuerpos contra AAV. Los vectores de AAV pueden administrarse o suministrarse en tales sujetos utilizando varias técnicas. Por ejemplo, pueden suministrarse AAV de cápside vacía (es decir, AAV que carecen de un ácido nucleico de FVIII) para la unión a los anticuerpos de AAV en el sujeto, permitiendo de esta manera que el vector de AAV portador del ácido nucleico de FVIII pueda transformar células del sujeto. Las cantidades de AAV de cápside vacía que se deben administrar pueden calibrarse basándose en la cantidad de anticuerpos de AAV producida en un sujeto particular. Las cápsides vacías pueden ser de cualquier serotipo de AAV, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 o AAV-2i8.

Alternativa o adicionalmente, el vector de AAV puede administrarse mediante inyección intramuscular directa (por ejemplo, una o más fibras de contracción lenta de un músculo). En otra alternativa, puede utilizarse un catéter introducido en la arteria femoral para suministrar vectores de AAV en el hígado mediante la arteria hepática. Asimismo pueden utilizarse medios no quirúrgicos, tales como la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) para suministrar vectores de AAV directamente en el hígado, evitando de esta manera el torrente sanguíneo y los anticuerpos de AAV. Otros sistemas ductales, tales como los conductos de la glándula submandibular, asimismo pueden utilizarse como puertas de entrada para suministrar vectores de AAV en el sujeto que produce o presenta anticuerpos anti-AAV preexistentes.

La administración o 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 tales sujetos como candidatos para las composiciones, procedimientos y utilizaciones de la invención. Por lo tanto, tales sujetos incluirían aquellos cribados como positivos para una cantidad insuficiente o una deficiencia en un producto génico funcional (por ejemplo, proteína FVIII) o que producen un producto génico (por ejemplo, proteína FVIII) aberrante, parcialmente funcional o no funcional.

La administración o suministro *in vivo* en un sujeto de acuerdo con los procedimientos y utilizaciones de la invención tal como se da a conocer en la presente memoria puede ponerse en práctica en 1 a 2, 2 a 4, 4 a 12, 12 a 24 o 24 a 72 horas después de identificar que un sujeto presenta la enfermedad diana para el tratamiento, que presenta uno o más síntomas de la enfermedad, o que ha sido 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 los procedimientos y usos de la invención pueden ponerse en práctica 1 a 7, 7 a 14, 14 a 21, 21 a 48 o más días, meses o años después de que haya sido identificado un sujeto como que presenta la enfermedad diana del tratamiento, presente uno o más síntomas de la enfermedad, o haya sido cribado y se haya identificado como positivo tal como se indica en la presente memoria.

La expresión "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 asociada a un portador farmacéutico (excipiente, diluyente, vehículo o agente de relleno), que, al administrarlo en una o más dosis, se calcula que produce un efecto deseado (por ejemplo, un efecto profiláctico o terapéutico). Las formas de dosis unitaria pueden presentarse, por ejemplo, en ampollas y viales, que pueden incluir una composición líquida, o una composición en un estado seco por congelación o liofilizado; puede añadirse un portador líquido estéril, por ejemplo, previamente a la administración o suministro *in vivo*. Las formas de dosis unitaria individuales pueden incluirse en kits o envases multidosis. Las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, AAVr), partículas víricas recombinantes y composiciones farmacéuticas de las mismas, pueden envasarse en forma de dosis unitaria o de múltiples unidades, para facilitar la administración y uniformidad de las dosis.

La invención proporciona kits con material de envasado y uno o más componentes en el mismo. Un kit normalmente incluye una etiqueta o impreso en 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), 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 envasado puede mantener la esterilidad de los componentes, y puede estar realizado en material utilizado habitualmente para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, viales, tubos, etc.).

Las etiquetas o impresos pueden incluir información identificativa de uno o más componentes en el mismo, 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, la ubicación y fecha de fabricación, y las fechas de caducidad. Las etiquetas o los impresos pueden incluir información que identifica los datos del fabricante, los números de lote, la ubicación 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 el sujeto para la utilización de uno o más de los componentes del kit en un procedimiento, 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 procedimientos, 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 puede 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 sobre situaciones en las que no resultaría adecuado el uso de una composición particular. Los efectos secundarios adversos o complicaciones asimismo podrían ocurrir cuando el sujeto toma, tomará o está tomando actualmente otro u otros medicamentos que podrían ser incompatibles con la composición, o el sujeto ha seguido, seguirá o está siguiendo actualmente otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico que sería incompatible con la composición y, por lo tanto, las instrucciones podrían incluir información sobre tales incompatibilidades.

Las etiquetas o impresos incluyen "material impreso", por ejemplo, papel o cartón, o separados o fijos a un componente, kit o material de envasado (por ejemplo, una caja), o adheridos 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 impresa con un código de barras, un disco, un 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, medio FLASH o tarjetas de tipo memoria.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado entendido habitualmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria, en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención, en la presente memoria se describen procedimientos y materiales adecuados.

Anteriormente en la presente memoria se han utilizado diversos términos relacionados con las moléculas biológicas de la invención y asimismo a lo largo de toda la memoria descriptiva y reivindicaciones.

Todas las características dadas a conocer en la presente memoria pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica dada a conocer en la memoria descriptiva puede sustituirse por una característica alternativa que sirva a un propósito igual, equivalente o similar. De esta manera, a menos que se indique expresamente lo contrario, las características dadas a conocer (por ejemplo, variante de ácido nucleico, vector, plásmido, secuencia de vector recombinante (por ejemplo, AAVr), o partícula vírica recombinante) son un ejemplo de un género de características equivalentes o similares.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares “un” o “una”, e “y” o “la” incluye los 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 tales ácidos nucleicos; la referencia a “un vector” incluye una pluralidad de tales vectores, y la referencia a “un virus” o “partícula” incluye una pluralidad de tales virus/partículas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen números enteros comprendidos dentro de tales 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 una identidad de 80 % o superior, 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. y de esta manera sucesivamente.

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

Tal como se utiliza en la presente memoria, todos los valores o intervalos numéricos incluyen fracciones de los valores y números enteros comprendidos dentro de dichos intervalos y fracciones de los números enteros dentro de tales 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. y de esta manera sucesivamente. Por lo tanto, la referencia a un intervalo de 1 a 50 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. y de esta manera sucesivamente.

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, a fin de ilustrar la referencia a una serie de intervalos, por ejemplo, de 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 850, incluyendo intervalos de 1 a 20, 1 a 30, 1 a 40, 1 a 50, 1 a 60, 10 a 30, 10 a 40, 10 a 50, 10 a 60, 10 a 70, 10 a 80, 20 a 40, 20 a 50, 20 a 60, 20 a 70, 20 a 80, 20 a 90, 50 a 75, 50 a 100, 50 a 150, 50 a 200, 50 a 250, 100 a 200, 100 a 250, 100 a 300, 100 a 350, 100 a 400, 100 a 500, 150 a 250, 150 a 300, 150 a 350, 150 a 400, 150 a 450, 150 a 500, etc.

### Ejemplo 1

La hemofilia A (HA) es una enfermedad hemorrágica ligada al cromosoma X caracterizada por deficiencia en factor VIII (FVIII), un componente clave de la cascada de coagulación (Kazazian, H.H., et al. Hemophilia A: Deficiency of coagulation factor VIII, en: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (editores Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. y Valle, D.) 4367-4392 (McCraw-Hill, New York, 2001). El gen de FVIII contiene 26 exones que comprenden 186 kb y se sintetiza en forma de una molécula precursora grande (2332 aminoácidos) (figura 1) (Kaufman, R.J., et al., The biology and genetics of factor VIII deficiency in hemophilia A, en: Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice (editores Colman, R.W., Hirsch, J., Mander, V.J., Clowes, A.W. y George, J.N.) (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998).

Los individuos afectados habitualmente sufren de hemorragias articulares, musculares, así como intracraneales e intraperitoneales que pueden ser mortales. El nivel plasmático normal de FVIII es de 100 a 200 ng/ml, aunque son suficientes pequeñas cantidades de FVIII circulante (~1 a 2 ng/ml) para presentar un efecto sustancial sobre el curso clínico de los pacientes con enfermedad grave. El tratamiento actual para los pacientes de HA es la terapia de sustitución de la proteína utilizando FVIII recombinante o derivado de plasma. Sin embargo, dichos productos solo están disponibles para ~20 % de la población con HA en todo el mundo. La complicación principal de esta terapia es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (inhibidores) de FVIII, que ocurren en 25 % a 30 % de los pacientes con HA grave. Debido a que los inhibidores provocan que la terapia de proteína de FVIII resulte ineficaz, se utilizan agentes de derivación (FVIIa) para conseguir la hemostasia, sin embargo, dichos productos son alternativas muy caras.

En la presente memoria se dan a conocer constructos génicos para la utilización en procedimientos de terapia génica para tratar la hemofilia. Además, dichos constructos génicos de factor VIII (FVIII) pueden resultar útiles *in vitro* en el contexto de los sistemas de expresión de proteínas. Cada constructo génico puede incluir opcionalmente uno o más de un elemento de control de la expresión (por ejemplo, un promotor), gen de factor VIII y otros elementos reguladores requeridos para la expresión del gen, tales como intrones, ITR, codones de parada, señales poli A, etc.

**Ejemplo 2**Optimización de codones de la secuencia de ADN de factor VIII

- 5 Anteriormente se ha descrito que la optimización de codones de la secuencia de ADN puede mejorar la expresión del factor VIII en el contexto de la terapia génica (Ward et al., 2011, Blood 117(3):798-807). La optimización de codones de una secuencia de ADN se basa en el hecho de que cada codón de ADN es una serie de tres nucleótidos que codifica un residuo aminoácido específico en la cadena proteica durante la síntesis de la proteína. Existen 64 codones diferentes, aunque sólo 20 aminoácidos, por lo que existen muchos codones que pueden codificar para el mismo aminoácido. Este sesgo en el uso de los codones observado en diferentes especies refleja un procedimiento de selección para la optimización del proceso de traducción. Cabe destacar que, aunque se modifique la secuencia del ADN en la optimización de los codones, la secuencia de la proteína es idéntica a la secuencia de tipo salvaje.
- 10
- 15 Se llevó a cabo la optimización de los codones para la secuencia de ADNc del factor VIII con eliminación del dominio B (hFVIII-SQ). Se evaluaron cuatro versiones de codones optimizadas del ADNc de factor VIII en ensayos de expresión e inesperadamente varias de las secuencias de ADN expresaron niveles elevados de factor VIII.
- 20 Una de las secuencias no sólo expresaba niveles más altos de factor VIII, sino asimismo presentaba una característica única (SEC ID nº:1). Esta secuencia pudo empaquetarse en un vector vírico adenoasociado (AAV) mejor que otras secuencias de codones optimizados o la secuencia de tipo salvaje. Es decir, el gen del factor VIII, junto con sus elementos reguladores, está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) que proporcionan la señal requerida para empaquetar la secuencia en la cápside vírica del AAV. Los datos sugieren que el tamaño de la secuencia de ADN entre las ITR debe ser similar al tamaño del genoma del virus normal (4.7 Kb) para una eficiencia de empaquetado óptima. En el caso del factor VIII, se dispone de secuencias génicas que presentan una longitud de 5.0 Kb, aunque aparentemente todavía son capaces de empaquetarse; sin embargo, podría no empaquetarse eficientemente como gen completo.
- 25
- 30 Otro factor que podría contribuir a la capacidad de empaquetar un gen particular es la secuencia de ADN misma. Algunas secuencias de ADN podrían presentar una mayor tendencia a sufrir reorganizaciones, o podrían presentar estructuras de plegamiento basadas en la carga que afectan a la capacidad de empaquetarse en la cápside vírica. Es decir, aparentemente no es sólo el tamaño sino asimismo la secuencia de ADN la que afecta a la capacidad de empaquetado de un constructo de transgén. En los estudios de los presentes inventores, se identificaron nuevas secuencias de ADN de factor VIII que no se observan en la naturaleza y que expresan niveles más altos de factor VIII (ver, por ejemplo, las figuras 2, 4A y 6A), sino que asimismo se empaquetan más eficientemente en el vector de AAV. Esta característica de empaquetado mejorado genera rendimientos de vector más altos (tablas 3 a 5) de los diferentes serotipos y permitirá la producción de vector de AAV homogénea que cumpla los estrictos criterios de control de calidad para la utilización en terapia génica en seres humanos.
- 35
- 40 Con el fin de mejorar adicionalmente los niveles de expresión, se generaron constructos de ADNc de FVIII humano de codones optimizados con un promotor de transtiretina (TTR) o TTR mutante (ver la descripción, posteriormente) y una variante del factor VIII que elimina el sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina en las posiciones de aminoácido 1645-1648 (TTRmut-hFVIII-SQ-CO-delP/F) (ver la descripción de las variantes de FVIII posteriormente). Estos constructos de transgén de FVIII se empaquetaron en vectores víricos adenoasociados (AAV9 y se entregaron en ratones con hemofilia A/*knockout* para CD4. Los niveles de expresión de FVIII eran más altos que la expresión a partir de hFVIII-SQ de tipo salvaje, del modo siguiente: TTR-hFVIII-SQ-CO era 5 veces más alta; TTRmut-hFVIII-SQ-CO era 16 veces más alta y TTRmut-hFVIII-SQ-CO-delP/F era 33 veces más alta.
- 45

**Ejemplo 3**Variantes de factor VIII

- 50 Se introdujeron modificaciones en la secuencia de proteína del factor VIII. Las modificaciones introducidas en la secuencia de ADN de codones optimizados cambian un sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina. La modificación de este sitio mejora la estabilidad y actividad biológica de la proteína. Las modificaciones de aminoácidos introducidas en un factor VIII de codones optimizados del sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina se muestran en la tabla 1.
- 55
- 60 Las variantes por eliminación del sitio de reconocimiento de corte de PACE-furina (P/F) en las posiciones de aminoácido 1645 a 1648 se introdujeron en el gen de factor VIII humano (hFVIII) con eliminación de dominio B de tipo salvaje. Se generaron líneas celulares de riñón de hámster neonato (BHK) estables que expresaban cada variante y se purificaron las proteínas recombinantes para el análisis.
- 65 El FVIIIc, factor VIII canino; el hFVIII-RH, una variante que presenta una única sustitución de aminoácido en la posición de aminoácido 1645 de una arginina (R) a una histidina (H) que genera un sitio P/F que es idéntico a la secuencia de FVIIIc;  $\Delta$ 1645, eliminación del residuo R1645;  $\Delta$ 2, eliminación de los residuos R1645 y H1646;  $\Delta$ 3,

eliminación de los residuos R1645, H1646 y Q1647;  $\Delta 4$ , eliminación de los residuos R1645, H1646, Q1647 y R1648, y  $\Delta 1648$ , eliminación del residuo R1648.

Tabla 1: variantes de factor VIII humano del sitio de reconocimiento de PACE-furina.

variante de hFVIII	Aminoácidos en el sitio de reconocimiento de PACE-furina						
	1642	1643	1644	1645	1646	1647	1648
hFVIII	V	L	K	R	H	Q	R
hFVIII-RH	V	L	K	H	H	Q	R
$\Delta 4$ : hFVIII-del1645-1648	V	L	K	-	-	-	-
$\Delta 1645$ : hFVIII-del1645	V	L	K	-	H	Q	R
$\Delta 2$ : hFVIII-del1645-1646	V	L	K	-	-	Q	R
$\Delta 3$ : hFVIII-del1645-1647	V	L	K	-	-	-	R
$\Delta 1648$ : hFVIII-del1648	V	L	K	R	H	Q	-

Se purificaron las proteínas variantes recombinantes y se compararon en diferentes ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* para caracterizar la función procoagulante. *In vitro*, las variantes P/F presentan una actividad biológica más alta que el hFVIII de tipo salvaje, en donde  $\Delta 3$  presenta la actividad biológica más alta, seguido de las variantes  $\Delta 4$  y  $\Delta 2$ .

*In vivo*, la totalidad de dichas proteínas hFVIII variantes se infundió en ratones con hemofilia A en un ensayo de reto mediante pinzamiento en la cola para medir la pérdida de sangre después de la lesión. Las variantes  $\Delta 3$  y  $\Delta 4$  mostraron una capacidad mejorada de reducir la pérdida de sangre en este modelo de reto.

La totalidad de las cinco variantes por eliminación P/F se introdujo en un casete de expresión de vector vírico adenoasociado (AAV) que contenía el gen de factor VIII de tipo salvaje (figura 3A). Se administró AAV-hFVIII en ratones con hemofilia A/KO CD4 ( $5 \times 10^{11}$  gv/ratón) y se determinó la expresión de FVIII según antígeno y actividad (Figura 3B). Los niveles de expresión de  $\Delta 3$  fueron 4 veces superiores a los de FVIII-BDD de tipo salvaje, mientras que  $\Delta 4$  y  $\Delta 1645$  fueron dos y tres veces superiores, respectivamente. Las variantes  $\Delta 2$  y  $\Delta 1648$  fueron similares al FVIII de tipo salvaje. Estos resultados apoyan que la introducción de las variantes por eliminación de PACE-furina  $\Delta 3$  y  $\Delta 4$  en los constructos mejorados de FVIII de codones optimizados.

#### Ejemplo 4

##### Promotor TTR

El elemento promotor mejorado que se utilizó en estos estudios fue el promotor de transtiretina (TTR) con cuatro cambios de nucleótidos que mejora la expresión del factor VIII. La caracterización de este promotor fue originalmente descrita en Costa y Grayson 1991, Nucleic Acids Research 19(15):4139-4145. Estos estudios *in vitro* sugieren que una modificación de cuatro nucleótidos incrementa la afinidad del factor de transcripción del factor nuclear de hepatocitos (HNF) para su sitio de unión en la secuencia de ADN. De esta manera, en un nuevo promotor sintético, los presentes inventores introdujeron los cuatro cambios de nucleótido partiendo del nucleótido 67 de la secuencia del promotor de TTR que no es conocido que se encuentre en la naturaleza. Se modificó de TAmGTGTAG a TATTGACTTAG (SEC ID n°:8).

#### Ejemplo 5

##### Comparación de los transgenes de tipo salvaje y de codones optimizados (CO)

Se generaron constructos de transgén de AAV para demostrar la contribución de cada secuencia de FVIII o variante de secuencia a la expresión mejorada del FVIII. Estos constructos contienen los mismos elementos reguladores que el constructo indicado en la figura 2; sin embargo, su secuencia de FVIII es diferente. Basándose en los estudios descritos anteriormente, se introdujeron las variantes por eliminación de PACE-furina ( $\Delta 3$  y  $\Delta 4$ ) de mejor rendimiento en dichos transgenes de hFVIII. Además, la totalidad de dichos transgenes de FVIII son una forma con eliminación del dominio B (BDD). La totalidad de los vectores de AAV en el presente estudio fueron producidos en el Research Vector Core en CCMT y se titularon en paralelo mediante PCR cuantitativa y tinción con plata.

Tabla 2A: muestra las identidades de secuencia de hFVIII entre hFVIII WT y 3 variantes de codones optimizados, indicadas como CO1, CO2 y CO3.

4374 nucleótidos el hFVIII				
Secuencia 1	Secuencia 2	% de identidad	n.º de identidades de NT	n.º de diferencias de NT
WT	CO3	77.34 %	3386	992
WT	CO1	77.14 %	3374	1000

WT	CO2	75.74 %	3315	1062
CO3	CO1	82.20 %	3597	779
CO3	CO2	81.91 %	3590	793

Tabla 2B: muestra las frecuencias de nucleótidos para cada variante de hFVIII de codones optimizados, indicadas como CO1, CO2 y CO3.

	hFVIII WT	CO3	CO2	CO1
Frecuencia de nucleótidos	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)	Frecuencia (%)
A	A: 1.266 28.9 %	A: 1.145 26.2 %	A: 1.072 25.4 %	A: 1.063 24.3 %
C	C: 970 22.2 %	C: 1.108 25.3 %	C: 1.197 27.4 %	C: 1.371 31.3 %
G	G: 964 22.0 %	G: 1.133 25.9 %	G: 1.149 26.3 %	G: 1.191 27.2 %
T	T: 1.174 26.8 %	T: 988 22.6 %	T: 956 21.9 %	T: 749 17.1 %
GC	GC: 1.934 44.2 %	GC 2.241 51.2 %	GC: 2.346 53.6 %	GC: 2.562 58.6 %

En el presente estudio, los cinco transgenes de FVIII humano fueron: (1) FVIII-BDD (hFVIIIwtSQ); (2) FVIII-BDD humano de tipo salvaje con la eliminación de cuatro residuos en la secuencia de reconocimiento de PACE-furina (hFVIIIwtSQ $\Delta$ 4); (3) hFVIII-BDD de codones optimizados (CO) (hFVIII-CO); (4) codones optimizados con eliminación de residuos del sitio de reconocimiento de PACE-furina (hFVIII-CO $\Delta$ 3) y (5) hFVIII de codones optimizados con eliminación de cuatro residuos del sitio de reconocimiento de PACE-furina (hFVIII-CO $\Delta$ 4) (figura 6).

Dichos datos son una mejora respecto a los datos en la figura 2, en los que el constructo de FVIII de tipo salvaje utilizaba un promotor diferente (HCR-hAAT) y no se encontraba en el mismo casete de expresión que los constructos de codones optimizados (CO), dificultando la demostrando de la contribución individual de cada transgén de FVIII. Además, el FVIII de tipo salvaje con la variante de PACE/furina que elimina cuatro residuos aminoácidos en este sitio (hFVIIIwtSQ $\Delta$ 4) está incluido para demostrar la contribución de la eliminación de PACE-furina en el contexto del hFVIII de tipo salvaje (figura 4).

Tal como se describe, se administró AAV-hFVIII en ratones con hemofilia A/KO CD4 ( $1 \times 10^{11}$  gv/ratón). Sin embargo, de un serotipo de AAV diferente que se desarrolló basándose en una variante de AAV indicada como Rh74<sub>vv</sub>. Los datos anteriores se generaron con el serotipo 8 de AAV (AAV8).

Se midió la expresión de hFVIII a partir de los niveles de antígeno (ELISA), así como la actividad (ensayo Coatest). Para Rh74<sub>vv</sub>, los niveles de expresión de hFVIII cuatro semanas después de la administración de vector fueron de  $9.4 \pm 1.5$  ng/ml (6.3 % de los niveles de FVIII normales) para (hFVIIIwtSQ),  $32.4 \pm 13.0$  ng/ml (21.6 %) para (hFVIIIwtSQ $\Delta$ 4),  $42.2 \pm 7.1$  ng/ml (28.1 %) (hFVIII-CO),  $177.8 \pm 8.5$  ng/ml (118.5 %) (hFVIII-CO $\Delta$ 3) y  $114.3 \pm 60.2$  ng/ml (76.2 %) (hFVIII-CO $\Delta$ 4) (figura 6).

Seis semanas después de la administración de vector, se sometieron a ensayo los ratones tras la administración con AAV de constructos de hFVIII de tipo salvaje y de codones optimizados, mediante reto hemostático *in vivo*. Los resultados (figura 7) muestran que la actividad de coagulación en los ratones con hemofilia A, tal como se refleja en una pérdida de sangre reducida, es mayor que para FVIII de codones optimizados (CO) con o sin las eliminaciones P/F, y es comparable a la de los ratones de tipo salvaje.

Debido a que los niveles de expresión de proteína FVIII obtenidos con la variante AAV (Rh74<sub>vv</sub>) son inferiores a los niveles de FVIII con AAV8, los datos se presentan utilizando el factor de diferencia respecto al constructo de FVIII de tipo salvaje. Cabe destacar que las conclusiones globales son las mismas. Los niveles de expresión con la introducción de la variante P/F de  $\Delta$ 4 son aproximadamente 2 a 4 veces superiores en comparación con la secuencia de tipo salvaje por sí sola. El transgén de CO resulta en una expresión que es 5 veces superior a la de hFVIII de tipo salvaje (hFVIIIwtSQ). La introducción de las variantes por eliminación P/F en hFVIII de codones optimizados (hFVIII-CO) resulta en una expresión que es 3 a 4 veces superior ( $\Delta$ 3) o 2 a 3 veces superior ( $\Delta$ 4) que con el transgén de CO por sí solo. De esta manera, el constructo hFVIII-CO $\Delta$ 3 es 16 a 19 veces mejor que hFVIIIwtSQ, que es sustancialmente superior a cualquiera de las variantes por eliminación P/F o la optimización de codones por sí solos.

Es significativo que la contribución de las variantes por eliminación P/F es consistente con las secuencias de hFVIII tanto de tipo salvaje como de codones optimizados (figura 4). Además, esta contribución asimismo se observó utilizando otro casete de expresión (figura 3). Es decir, la variante P/F  $\Delta$ 3 resulta en niveles de expresión 3 a 4 veces superiores y  $\Delta$ 4 resulta en niveles de expresión 2 a 3 veces superiores, con independencia de si se encuentran en la secuencia de ADN de tipo salvaje o en la secuencia de ADN de codones optimizados. Aunque sin restringirse a ninguna teoría en particular, el efecto sinérgico combinado se cree que se debe a los diferentes mecanismos que son responsables de la optimización de los codones (traducción mejorada de la secuencia de ARN) y las variantes de PACE-furina (secreción mejorada y mayor actividad biológica de la proteína).

Tal como se da a conocer (figura 2), el promotor de TTRm incrementa la expresión en 2 veces en comparación con el promotor de TTR por sí solo. Aunque no se ha incluido en el presente estudio, una estimación razonable basada en los demás estudios es que el constructo optimizado (TTRm-hFVIII<sup>CO</sup> $\Delta$ 3) es ~30 a 40 veces mejor que TTR-hFVIIIwtSQ.

### Ejemplo 6

#### Rendimientos con vector de constructos de codones optimizados y de codones no optimizados

Los rendimientos con vector vírico adenoasociado (AAV) para las preparaciones de factor VIII humano se muestran en las tablas 3 a 5. Se muestran los genomas de vector adenoasociado (AAV) por frasco rodante para FVIII-SQ humano (hFVIII) de tipo salvaje (3 preparaciones, indicadas como Prep1 a Prep3) y el FVIII humano de codones optimizados (hFVIII-CO, asimismo denominado CO3) (5 preparaciones separadas de CO3, indicadas como Prep1-Prep5). Todas las preparaciones de vector de FVIII-CO3 se realizaron utilizando el mismo protocolo de producción y esquema de purificación. El rendimiento medio de AAV8-hFVIII-SQ-CO fue de  $4.60 \times 10^{12}$  gv/frasco rodante (13 preparaciones de vector) en comparación con el rendimiento medio de AAV8-hFVIII-SQ, de  $2.77 \times 10^{12}$  gv/frasco rodante (3 preparaciones de vector). Los rendimientos eran 2 veces más altos con la secuencia de FVIII CO que con la secuencia de FVIII de tipo salvaje.

Tabla 3: rendimientos de vector de AAV-8 para preparaciones de factor VIII humano

Transgén de hFVIII	Vector AAV	Genomas de vector/frasco rodante
FIX_h	AAV8-FIX-19_h	$1.00 \times 10^{13}$
Tipo salvaje	AAV8-hFVIII-Prep1	$2.20 \times 10^{12}$
	AAV8-hFVIII-Prep2	$3.66 \times 10^{12}$
	AAV8-hFVIII-Prep3	$2.46 \times 10^{12}$
con optimización de codones	AAV8-hFVIII-CO-Prep1	$4.54 \times 10^{12}$
	AAV8-hFVIII-CO-Prep2	$3.62 \times 10^{12}$
	AAV8-hFVIII-CO-Prep3	$4.71 \times 10^{12}$
	AAV8-hFVIII-CO-Prep4	$5.00 \times 10^{12}$
	AAV8-hFVIII-CO-Prep5	$4.30 \times 10^{12}$

El rendimiento medio de todas las preparaciones con vector de FVIII con la desviación estándar se muestran en las tablas 4 y 5. Nuevamente, aunque las preparaciones con AAV producidas con un núcleo de vector diferente se observó que presentaban un rendimiento inferior, una comparación entre los vectores de tipo salvaje y los vectores CO de un serotipo diferente (Rh74<sub>VV</sub>) muestra que los rendimientos eran consistentemente superiores en un factor de 2. Esto demuestra que el rendimiento de las preparaciones con vector de FVIII es independiente del núcleo del vector y del serotipo del AAV.

Tabla 4: rendimientos de vector de AAV-8 para preparaciones de factor VIII humano con desviación estándar.

Transgén de hFVIII	Vector AAV	Número de preparaciones	Número medio de genomas de vector/frasco rodante
FIX_h	AAV8-FIX-19_h		$1.00 \times 10^{13}$
Tipo salvaje	AAV8-hFVIII	3	$2.67 \times 10^{12} \pm 9.29 \times 10^{11}$
Con optimización de codones	AAV8-hFVIII-CO	13	$4.60 \times 10^{12} \pm 6.85 \times 10^{11}$

Tabla 5: rendimientos de vector de AAV Rh75<sub>VV</sub> para preparaciones de factor VIII humano con desviación estándar.

Transgén de hFVIII	Vector AAV	Número de preparaciones	Número medio de genomas de vector/frasco rodante
Tipo salvaje	Rh74 <sub>VV</sub> -hFVIII	7	$9.58 \times 10^{11} \pm 5.07 \times 10^{11}$
Con optimización de codones	Rh74 <sub>VV</sub> -hFVIII-CO	5	$2.39 \times 10^{12} \pm 6.85 \times 10^{11}$

ADNc de factor VIII de codones optimizados, asimismo conocido como CO/CO3 (SEC ID n°: 1)

ATGCAGATTGAGCTGTCAACITGCTTTTTCTGTGCCTGCTGAGATTTTGTITTTCCGCTACTAGAAG  
ATACTACCTGGGGGCTGTGGAACGTCTTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTGGGAGAGCTGCCAGTGG  
ACGCACGATTTCCACCTAGAGTCCCTAAATCATTCCCTTCAACACCAGCGTGGTCTATAAGAAAACA  
CTGTTCCGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTCAACATCGCTAAGCCTCGGCCACCCTGGATGGGACTGCT  
GGGACCAACAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCCTGGTTCATTACACTGAAAAACATGGCCTCACACC  
CCGTGAGCCTGCAITGCTGTGGGCGTCAGCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGAGAGTATGACGATCAG  
ACTTCCCAGAGAGAAAAAGAGGACGATAAGGTGTTTTCTGGCGGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGT  
CCTGAAAGAGAATGGCCCCATGGCTTCCGACCCTCTGTGCCTGACCTACTCTTATCTGAGTCACGTGG  
ACCTGGTCAAGGACTGAACAGCGGACTGATCGGAGCACTGCTGGTGTGTAGGGAAGGGAGCCTGGCT  
AAGGAGAAAACCCAGACACTGCATAAGTTCATTCTGCTGTTCCGCCGTGTTTGACGAAGGAAAATCATG  
GCACAGCGAGACAAAGAATAGTCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCTTCAGCCAGAGCTTGGCCCCAAA  
TGCACACTGTGAACGGCTACGTCAATCGCTCACTGCCCTGGACTGATCGGCTGCCACCGAAAGAGCGTG  
TATTGGCATGTCTATCGGAATGGGCACCACACCTGAAGTGCACCTCATTTCCTGGAGGGGCATACCTT  
TCTGGTCCGCAACCACCGACAGGCTCCCTGGAGATCTCTCCAATTACCTTCCCTGACAGCTCAGACTC  
TGCTGATGGATCTGGGACAGTTTCTGCTGTTTTGCCACATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAG  
GCCTACGTGAAAGTGGACAGCTGTCCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAACAAATGAGGAAGCTGA  
AGACTATGACGATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGTCCGATTTCGATGACGATAACAGCCCCCT  
CCTTTATCCAGATTAGATCTGTGGCCAAGAAACACCTAAGACATGGGTCCATTACATCGCAGCCGAG  
GAAGAGGACTGGGATTATGCACCACTGGTCTGGCACCAGACGATCGATCCTACAAATCTCAGTATCT  
GAACAATGGACCACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGAGGTTTATGGCTTATACCGATGAAA  
CCTTCAAGACTCGCGAAGCAATCCAGCAGCAGAGCGGGATTCTGGGACCCTGCTGTACGGAGAAGTG  
GGGGACACCCTGCTGATCATTTTAAGAACCAGGCCAGCAGGCTTACAATATCTATCCACATGGAAT  
TACAGATGTGGCCCTCTGTACAGCCGGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTCCCAA  
TCCTGCCCGGGGAAATTTTAAGTATAAATGGACTGTACCCGTGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGAC  
CCTAGGTGCTGACCCGCTACTATTCTAGTTTCTGTGAATATGAAAGGGATCTGGCCAGCCGACTGAT  
CGGCCCACTGCTGATTGTACAAAGAGAGCGTGGATCAGAGAGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGA  
GGAATGTGATTCGTTCAGTGTCTTTGACGAAAACCGGTGATGGTATCTGACCGAGAACATCCAGAGA  
TTCCTGCCTAATCCAGCCGGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTTTCAGGCTTCTAACATCATGCATAG  
TATTAATGGCTACGTGTTTCGACAGTCTGCAGCTGTGAGTGTCTGACAGAGGTGCTTACTGGTATA  
TCCTGAGCATTGGAGCAGACAGACAGATTTCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAGCATAAA  
ATGGTGTATGAGGACACACTGCTCTGTTCCCTTCAGCGGCGAAACCGTGTTCATGTCCATGGAGAA  
TCCCGGGCTGTGGATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTTCAGGAATCGCGGGATGACTGCCCTGCTGA  
AAGTGTCAAGCTGTGACAAGAACACCGGAGACTACTATGAAGATTATACGAGGACATCAGCGCATAT  
CTGCTGTCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTAGTCAGAATCCTCCAGTGTGGAAGAGGCA  
CCAGCGCGAGATCACCCGCACTACCTGTCAGAGTGTATCAGGAAGAGATCGACTACGACGATACAATTT  
CTGTGGAAATGAAGAAAGAGGACTTCGATATCTATGACGAAGATGAGAACCAGAGTCTCTGATCATTC  
CAGAAGAAAACCCGGCATTACTTTATTGCTGCAGTGGAGCGCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAG  
TCCTCAGCTGCTGCGAAATCGGGCCAGTCAGGGAGCGTCCACAGTTCAAGAAAGTGGTCTTCCAGG  
AGTTTACAGACGGATCCTTTACTCAGCCACTGTACCGGGGCGAACTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTG  
  
GGACCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTATGGTCACCTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCC  
TTACAGTTTTTTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGGAGCAGAACCACGAAAAA  
ACTTCGTGAAGCCTAATGAGACCAAAACATACTTTTGGAGGTGCAGCACCATATGGCCCCAACAAAA  
GACGAATTCGATTGCAAGGCTATGGGCTATTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAGGACGTCCACAGTGG  
CCTGATCGGGCACTGCTGGTGTCTATACCTAACACCCTGAATCCCGCACACGGCAGGCAAGGTCACTG  
TCCAGGAATTTCGCCCTGTCTTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCTGGTACTTCACCGAAAAATG  
GAGCGAAATTGCCGGGCTCCATGTAATATTCAGATGGAAGACCCACATTCAAGGAGAACTACCGCTT  
TCATGCCATCAATGGGTATATTATGGATACTCTGCCCGACTGGTTCATGGCTCAGGACCAGAGAATCA  
GGTGGTACCTGCTGAGCATGGGGTCCAACGAGAATATCCACTCAATTCATTTACGCGGACACGTGTTT  
ACTGTCCGGAAGAAAGAGGTATAAATGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGCGTGTTCGAAACCGT  
CGAGTGTCTGCTGACGATGCAAGGAGGATCTGGAGAGTGAATGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCG  
GAATGTCTACCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGACACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACAT  
ATCCGGGATTTCCAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCTAAGCTGGCTAGACTGCA  
CTATTCCGGGTCTATCAACGCTTGGTCCACAAAAGAGCCTTTCTCTGGATTAAAGGTGGACCTGCTGG  
CACCATGATCATTGATGACATCAAACTCAGGGGGCCAGGCAGAACTTCTCTCTCTGTACATCTCA  
CAGTTTATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGCAATAGCACAGGGAC  
TCTGATGGTGTCTTTTGGCAACGTGGACAGTTCAGGGATCAAGCACAACATTTTCAATCCCCCTATCA  
TTGCTAGATACATCAGGCTGCACCCAAACCATTTATCTATTGCAAGTACACTGCGGATGGAAGTGTG  
GGGTGCGATCTGAACAGTTGTTCAATGCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAATCTCTGACGCCAGAT  
TACCGCTAGCTCCTACTTCACTAATATGTTTGCTACCTGGAGCCCTCCAAAGCAGACTGCATCTGC  
AGGGACGAAGCAACGCATGGCGACCACAGGTGAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGCGATTTTTCAG  
AAAATATGAAGGTGACCGGAGTCAAACTCAGGGCGTGAAAGTCTGCTGACCTCAATGTACGTCAA  
GGAGTTCTGATCTCTAGTTTACAGGACCGCCACAGTGGACACTGTTCTTTTCAAGAACGGAAGGTGA  
AAGTCTTCCAGGGCAATCAGGATTCCTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGACT  
CGCTACCTGCGAATCCACCCACAGTCTGGGTGCATCAGATTGCACTGAGAATGGAAGTCTGGGCTG  
CGAGGCCCAGGACCTGTATTGA

ADNc de factor VIII de codones optimizados, asimismo conocido como CO/CO3, con variante R1645H (SEC ID



nº:2)

ATGCAGATTGAGCTGTCAACTTGCTTTTTCTGTGCCTGCTGAGATTTTGTTTTTCCGCTACTAGAAG  
 ATACTACCTGGGGGCTGTGGAACGTCTTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTGGGAGAGCTGCCAGTGG  
 ACGCACGATTTCCACCTAGAGTCCCTAAATCATTCCCCCTTCAACACCAGCGTGGTCTATAAGAAAACA  
 CTGTTTCGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTCAACATCGCTAAGCCTCGGCCACCCTGGATGGGACTGCT  
 GGGACCAACAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCGTGGTCATTACACTGAAAAACATGGCCTCACACC  
 CCGTGAGCCTGCATGCTGTGGGCGTCAGCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCAGAGTATGACGATCAG  
 ACTTCCCAGAGAGAAAAAGAGGACGATAAGGTGTTTCTGGCGGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGT  
 CCTGAAAGAGAATGGCCCCATGGCTTCCGACCCCTCTGTGCCTGACCTACTCTTATCTGAGTCACGTGG  
 ACCTGGTCAAGGATCTGAACAGCGGACTGATCGGAGCACTGCTGGTGTGTAGGGAAGGGAGCCTGGCT  
 AAGGAGAAAAACCCAGACACTGCATAAGTTTCATTCTGCTGTTTCGCCGTGTTTGACGAAGGAAAAATCATG  
 GCACAGCGAGACAAAGAATAGTCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCTTCAGCCAGAGCTTGGCCAAAA  
 TGCACACTGTGAACGGCTACGTCAATCGCTCACTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACCGAAAGAGCGTG  
 TATTGGCATGTCTCGGAATGGGCACACACCTGAAGTGCCTCCATTTTCTGGAGGGGCATACCTT  
 TCTGGTCCGCAACCACCGACAGGCCCTCCCTGGAGATCTCTCCAATTACCTTCCCTGACAGCTCAGACTC  
 TGCTGATGGATCTGGGACAGTTCCCTGCTGTTTTGCCACATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAG  
 GCCTACGTGAAAGTGGACAGCTGTCCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAAACATGAGGAAGCTGA  
 AGACTATGACGATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGTCCGATTTCGATGACGATAACAGCCCCCT  
 CCTTTATCCAGATTAGATCTGTGGCCAAGAAACACCCCTAAGACATGGGTCCATTACATCGCAGCCGAG  
 GAAGAGGACTGGGATTATGCACCACTGGTGTCTGGCACCAGACGATCGATCCTACAAATCTCAGTATCT  
 GAACAATGGACCACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGAGGTTTCATGGCTTATACCGATGAAA  
 CCTTCAAGACTCGCGAAGCAATCCAGCACGAGAGCGGGATTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAAGTG  
 GGGGACACCCTGCTGATCATTTTTTAAGAACAGGCCAGCAGGCCTTACAATATCTATCCACATGGAAT  
 TACAGATGTGCGCCCTCTGTACAGCCGGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTCCCAA  
 TCCTGCCCCGGGAAATTTTTAAGTATAAATGGACTGTCAACCGTCGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGAC  
 CCTAGGTGCCTGACCCGCTACTATTCTAGTTTTCGTGAATATGAAAAGGGATCTGGCCAGCGGACTGAT  
 CGGCCCACTGCTGATTTGTACAAAGAGAGCGTGGATCAGAGAGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGA

GGAATGTGATTCTGTTTCAGTGTCTTTGACGAAAACCGGTTCATGGTATCTGACCGAGAACATCCAGAGA  
 TTCTTGCTTAATCCAGCCGGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTTTCAGGCTTCTAACATCATGCATAG  
 TATTAATGGCTACGTGTTTCGACAGTCTGCAGCTGTCAGTGTCTGTCACGAGGTCGCTTACTGGTATA  
 TCCTGAGCATTGGAGCACAGACAGATTTCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAGCATAAA  
 ATGGTGTATGAGGACAACTGACTCTGTTCCCTTCAGCGGCGAAACCGTGTATGTCCATGGAGAA  
 TCCCGGGCTGTGGATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTTCAGGAATCGCGGGATGACTGCCCTGCTGA  
 AAGTGTCAAGCTGTGACAAGAACACCGGAGACTACTATGAAGATTTCATACGAGGACATCAGCGCATAT  
 CTGCTGTCCAAAAAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTAGTCAGAATCCTCCAGTGTGGAAGCACC  
 CCAGCGCGAGATCACCCGCACTACCCTGCAGAGTGATCAGGAAGAGATCGACTACGACGATACAAATTT  
 CTGTGGAAATGAAGAAAGAGGACTTCGATATCTATGACGAAGATGAGAACCAGAGTCCTCGATCATT  
 CAGAAGAAAACCCGGCATTACTTTATTGCTGCAGTGGAGCGCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAG  
 TCCTCAGTGTCTGCGAAATCGGGCCAGTCAGGGAGCGTCCACAGTTCAAGAAAGTGGTCTTCCAGG  
 AGTTTACAGACGGATCCTTTACTCAGCCACTGTACCGGGGCGAACTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTG  
 GGACCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTATGGTCACCTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCC  
 TTACAGTTTTTTTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGAGCAGAAACCACGAAAA  
 ACTTCGTGAAGCCTAATGAGACCAAAACATACTTTTGAAGGTGCAGCACCATATGGCCCCAACAAAA  
 GACGAATTCGATTGCAAGGCATGGGCCATTTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAGGACGTCCACAGTGG  
 CCTGATCGGGCCACTGCTGGTGTGTACATAACACCCCTGAATCCCGCACACGGCAGGCAGGTCACTG  
 TCCAGGAATTCGCCCTGTTCTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCTGGTACTTCACCGAAAAATG  
 GAGCGAAATTCGGGGCTCCATGTAATATTAGATGGAAGACCCACATTCAAGGAGAACTACCGCTT  
 TCATGCCATCAATGGGTATATTATGGATACTCTGCCCGGACTGGTCATGGCTCAGGACCAGAGAATCA  
 GGTGGTACCTGCTGAGCATGGGGTCCAACGAGAATATCCACTCAATTCATTTAGCGGACACGTGTTT  
 ACTGTCCGGAAGAAAGAGATATAAAATGGCCCTGTACAACTGTATCCCGCGTGTTCGAAACCGT  
 CGAGATGCTGCCTAGCAAGGCAGGATCTGGAGAGTGAATGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCG  
 GAATGTCTACCCCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGACACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACAT  
 ATCCGGGATTTCCAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGGCCCTAAGCTGGCTAGACTGCA  
 CTATTCCGGGTCTATCAACGCTTGGTCCACAAAAGAGCCTTTCTCTTGGATTAAAGGTGGACCTGCTGG  
 CACCAATGATCATTGATGGCATCAAACTCAGGGGGCCAGGCAGAAAGTTCTCCTCTCTGTACATCTCA  
 CAGTTTATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGGCAATAGCACAGGGAC  
 TCTGATGGTGTCTTTGGCAACGTGGACAGTTCAGGGATCAAGCACAACATTTTCAATCCCCCTATCA  
 TTGCTAGATACATCAGGCTGCACCCAACCCATTATTCTATTTCGAAGTACACTGCGGATGGAAGTGTG  
 GGTGGCATCTGAACAGTTGTTCAATGCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAATCTCTGACGCCAGAT  
 TACCGCTAGCTCCTACTTCACTAATATGTTTGGTACCTGGAGCCCTCCAAAGCACGACTGCATCTGC  
 AGGGACGAACCAACGATGGCGACACAGGTGAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGATTTTCAG  
 AAACTATGAAGGTGACCGGAGTCACAACTCAGGGCGTGAAAAGTCTGCTGACCTCAATGTACGTCAA  
 GGAGTTCCTGATCTCTAGTTACAGGACGGCCACCAGTGGACACTGTTCTTTTCAAGACGAAAGGTGA  
 AAGTCTTCCAGGGCAATCAGGATTCCTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGACT  
 CGCTACCTGCGAATCCACCCACAGTCTGGGTGCATCAGATTGCACTGAGAATGGAAGTCTGGGCTG  
 CGAGGCCAGGACCTGTATTGA

ADNc de factor VIII de codones optimizados, asimismo conocido como CO/CO3, variante con eliminación de los aminoácidos 1645 a 1648, Δ4 (SEC ID nº:3)

5

ATGCAGATTGAGCTGTCAACTTGCTTTTTCTGTGCCTGCTGAGATTTGTTTTTCCGCTACTAGAAG  
 ATACTACCTG3GGGCTGTGGAACGTCTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTGGGAGAGCTGCCAGTGG  
 ACGCACGATTTCCACCTAGAGTCCCTAAATCATTCCCTTCAACACCAGCGTGGTCTATAAGAAAAACA  
 CTGTTCTGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTCAACATCGCTAAGCCTCGGCCACCTGGATGGGACTGCT  
 GGGACCAACAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCGTGGTCAATTACACTGAAAAACATGGCCTCACACC  
 CCGTGAGCCTGCATGCTGTGGGCGTCAGCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCAGAGTATGACGATCAG  
 ACTTCCAGAG3AGAAAAAGAGGACGATAAGGTGTTTCTGGCGGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGT  
 CCTGAAAGAGAAATGGCCCATGGCTTCCGACCCTCTGTGCCTGACCTACTCTTATCTGAGTCACGTGG  
 ACCTGGTCAAG3ATCTGAACAGCGGACTGATCGGAGCACTGCTGGTGTGTAGGGAAGGGAGCCTGGCT  
 AAGGAGAAAAACCCAGACACTGCATAAGTTTCTGCTGTTCGCCGTGTTTGACGAAGGAAAAATCATG  
 GCACAGCGAGACAAAGAAATAGTCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCTTCAGCCAGAGCTTGGCCCCAAAA  
 TGCACACTGTGAACGGCTACGTCAATCGCTCACTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACCGAAAGAGCGTG

TATTGGCATGICATCGGAATGGGCACCACACCTGAAGTGCCTCCATTTTCTGGAGGGGCATACCTT  
 TCTGGTCCGCAACCACCGACAGGCCTCCCTGGAGATCTCTCCAATTACCTTCTGACAGCTCAGACTC  
 TGCTGATGGATCTGGGACAGTTCTGTGTTTTGCCACATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAG  
 GCCTACGTGAAAGTGGACAGCTGTCCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAAGCTGA  
 AGACTATGACATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGTCCGATTGATGACGATAACAGCCCCT  
 CCTTTATCCAGATTAGATCTGTGGCCAAGAAACACCTAAGACATGGGTCCATTACATCGCAGCCGAG  
 GAAGAGGACTGGGATTATGCACCACTGGTGCTGGCACCAGACGATCGATCCTACAAATCTCAGTATCT  
 GAACAATGGACCACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGAGGTTTCATGGCTTATACCGATGAAA  
 CCTTCAAGACTCGCGAAGCAATCCAGCACGAGAGCGGGATTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAAGTG  
 GGGGACACCCIGCTGATCATTTTTAAGAACCAGGCCAGCAGGCCTTACAATATCTATCCACATGGAAT  
 TACAGATGTGCGCCCTCTGTACAGCCGGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTCCCAA  
 TCCTGCCCCGGGAAATTTTTAAGTATAAATGGACTGTCACCGTCGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGAC  
 CCTAGGTGCCIGACCCGCTACTATTCTAGTTTTCTGTAATATGGAAGGGATCTGGCCAGCGGACTGAT  
 CGGCCCCTGCTGATTTGTTACAAAGAGAGCGTGGATCAGAGAGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGA  
 GGAATGTGATTCGTTCAGTGTCTTTGACGAAAACCGGTCATGGTATCTGACCGAGAACATCCAGAGA  
 TTCCTGCCTAATCCAGCCGGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTTTCAGGCTTCTAACATCATGCATAG  
 TATTAATGGCTACGTGTTTCGACAGTCTGCAGCTGTCAGTGTGTCTGCACGAGGTGCTTACTGGTATA  
 TCCTGAGCATTTGGAGCACAGACAGATTTCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAGCATAAA  
 ATGGTGTATGAGGACACACTGACTCTGTTCCCTTTCAGCGGCGAAACCGTGTTCATGTCCATGGAGAA  
 TCCCCGGGCTGIGGATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTTCAGGAATCGCGGGATGACTGCCCTGCTGA  
 AAGTGTCAAGCTGTGACAAGAACACCGGAGACTACTATGAAGATTCATACGAGGACATCAGCGCATAT  
 CTGCTGTCCAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTAGTCAGAATCCTCCAGTGCTGAAGGAGAT  
 CACCCGCACTACCCTGCAGAGTGTATCAGGAAGAGATCGACTACGACGATACAATTTCTGTGGAAATGA  
 AGAAAGAGGACTTCGATATCTATGACGAAGATGAGAACCAGAGTCCCTCGATCATTCCAGAAGAAAACC  
 CGGCATTACTTTATTGCTGCAGTGGAGCGCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCTCAGCTGCT  
 GCGAAATCGGGCCCAGTCAGGGAGCGTCCACAGTTCAAGAAAGTGGTCTTCCAGGAGTTTACAGACG  
 GATCCTTTTACICAGCCACTGTACCGGGGCGAACTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTGGGACCCATATC  
 AGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTATGGTCACCTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCCTTACAGTTTTTA  
 TTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGGAGCAGAACCACGAAAAAACTTCGTGAAGC  
 CTAATGAGACCAAAACATACTTTTGAAGGTGCAGACCATATGGCCCCAACAAAAGACGAATTCGAT  
 TGCAAGGCATGGGCCTATTTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAGGACGTCCACAGTGGCCTGATCGGGCC  
 ACTGCTGGTGTGTCATACTAACACCCTGAATCCCGCACACGGCAGGCGAGTCACTGTCCAGGAATTGC  
 CCCTGTTCTTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAGCTGGTACTTCACCGAAAACATGGAGCGAAATTGC  
 CGGGCTCCATGTAATATTAGATGGAAGACCCACATTCAGGAGAACTACCGCTTTCATGCCATCAA  
 TGGGTATATTATGGATACTCTGCCCGGACTGGTTCATGGCTCAGGACCAGAGAATCAGGTGGTACCTGC  
 TGAGCATGGGGTCCAACGAGAATATCCACTCAATTCATTTTCAGCGGACACGTGTTTACTGTCCGGAAG  
 AAAGAAGAGTATAAATGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGCGTGTTCGAAACCGTCGAGATGCTGCC  
 TAGCAAGGCAGGGATCTGGAGAGTGAATGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCGGAATGTCTACCC  
 TGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGACACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACATATCCGGGATTTT  
 CAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCCCTAAGCTGGCTAGACTGCACTATTCCGGGTC  
 TATCAACGCTTGGTCCACAAAAGAGCCTTTCTCTTGGATTAAGGTGGACCTGCTGGCACCAATGATCA  
 TTCATGGCATCAAAACTCAGGGGGCCAGGCAGAAAGTTCTCCTCTCTGTACATCTCACAGTTTATCATC  
 ATGTACAGCCITGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGGCAATAGCACAGGGACTCTGATGGTGT  
 CTTTGGCAACSTGGACAGTTTCAGGGATCAAGCACAAACATTTTCAATCCCCCTATCATTGCTAGATACA  
 TCAGGCTGCACCAACCCATTATTCTATTCTGAAGTACACTGCGGATGGAAGTATGAGGGTGGATCTG  
 AACAGTTGTTCAATGCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAATCTCTGACGCCAGATTACCGCTAGCTC  
 CTACTTCACTAATATGTTTGCTACCTGGAGCCCCCTCCAAAGCACGACTGCATCTGCAGGGACGAAGCA  
 ACGCATGGCGACCACAGGTGAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGATTTTCAGAAAATATGAAG  
 GTGACCGGAGTCACAACTCAGGGCGTGAAAAGTCTGCTGACCTCAATGTACGTCAAGGAGTTCCTGAT  
 CTCTAGTTTACAGGACGGCCACAGTGGACACTGTTCTTTTCAAGACGGAAAGGTGAAAGTCTTCCAGG  
 GCAATCAGGATTCCCTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGACTCGCTACCTGCGA  
 ATCCACCCACAGTCTGGGTGCATCAGATTGCCTGAGAATGGAAGTCTGGGCTGCGAGGCCAGGA  
 CCTGTATTGA

ADNc de factor VIII de codones optimizados, asimismo conocido como CO/CO3, variante con eliminación del aminoácido 1645, Δ1645 (SEC ID nº:4)

ATGCAGATTGAGCTGTCAACTTGCTTTTTCTGTGCCTGTGAGATTTTGTTTTTCCGCTACTAGAAG  
ATACTACCTGGGGGCTGTGGAAGTGTCTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTGGGAGAGCTGCCAGTGG  
ACGCACGATTTCCACCTAGAGTCCCTAAATCATTCCCCCTCAACACCAGCGTGGTCTATAAGAAAACA  
CTGTTCTGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTCAACATCGTAAGCCTCGGCCACCCTGGATGGGACTGCT  
GGGACCAACAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCGTGGTCATTACACTGAAAAACATGGCCTCACACC  
CCGTGAGCCTGCATGCTGTGGGCGTCAGTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCAGAGTATGACGATCAG  
ACTTCCCAGAGAGAAAAAGAGGACGATAAGGTGTTTCTGGCGGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGT  
CCTGAAAGAGAATGGCCCCATGGCTTCCGACCCCTGTGTGCCTGACCTACTCTTATCTGAGTCACGTGG  
ACCTGGTCAAGGATCTGAACAGCGGACTGATCGGAGCACCTGCTGGTGTGTAGGGAAGGGAGCCTGGCT  
AAGGAGAAAACCCAGACACTGCATAAGTTCATTCTGCTGTTTCGCCGTGTTTGACGAAGGAAAATCATG  
GCACAGCGAGACAAAGAATAGTCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCTTCAGCCAGAGCTTGGCCAAAA  
TGCACACTGTGAACGGCTACGTCAATCGCTCACTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACCGAAAGAGCGTG  
TATTGGCATGTCTCGGAATGGGCACCACACCTGAAGTGCCTCCATTTTCTGGAGGGGCATACCTT  
TCTGGTCCGCAACCACCGACAGGCCCTCCCTGGAGATCTCTCCAATTACCTTCTTGACAGCTCAGACTC  
TGCTGATGGATTGGGACAGTTCTGTGCTGTTTGGCACATCAGCTCCACCAGCATGATGGCATGAG  
GCCTGATGTGAAAGTGGACAGCTGTCCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAAGCTGA  
AGACTATGACGATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGTCCGATTGATGACGATAACAGCCCCCT  
CCTTTATCCAGATTAGATCTGTGGCCAAGAAACACCCTAAGACATGGGTCCATTACATCGCAGCCGAG  
GAAGAGGACTGGGATTATGCACCACCTGGTGTGGCACCAGACGATCGATCCTACAAATCTCAGTATCT  
GAACAATGGACCACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGAGGTTCATGGCTTATACCGATGAAA  
CCTTCAAGACTCGCGAAGCAATCCAGCACGAGAGCGGGATTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAAGTG  
GGGACACCCCTGCTGATCATTTTTAAGAACAGGCGAGCAGGCCCTTACAATATCTATCCACATGGAAT  
TACAGATGTGCGCCCTCTGTACAGCCGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTCCCAA  
TCCTGCCCGGGGAAATTTTAAGTATAAATGGACTGTCAACCGTCCGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGAC  
CCTAGGTGCCTGACCCGCTACTATTCTAGTTTCTGTGAATATGGAAGGGATCTGGCCAGCGGACTGAT  
CGGCCCACTGCTGATTTGTACAAAGAGAGCGTGGATCAGAGAGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGA  
GGAATGTGATTCTGTTCACTGTCTTTGACGAAAACCGGTCTGTTATCTGACCGAGAACATCCAGAGA  
TTCTTGCCCTAATCCAGCCGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTTTCAGGCTTCTAACATCATGCATAG  
TATTAATGGCTACGTGTTTCGACAGTCTGCAGCTGTCTGATGTGTCTGCACGAGGCTCGCTTACTGGTATA  
TCCTGAGCATTGGAGCACAGACAGATTTCCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAGCATAAA  
ATGGTGTATGAGGACACACTGACTCTGTTCCCTTTCAGCGCGCAAACCGTGTATTATGTCCATGGAGAA  
TCCCGGGCTGTGGATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTCAGGAATCGCGGGATGACTGCCCTGCTGA  
AAGTGTCAAGCTGTGACAAGAACACCGGAGACTACTATGAAGATTTCATACGAGGACATCAGCGCATAT  
CTGCTGTCCAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTAGTCAGAATCCTCCAGTGCTGAAGCACCA  
GCGCGAGATCACCCGCACTACCCTGCAGAGTGATCAGGAAGAGATCGACTACGACGATAACAATTTCTG  
TGAAATGAAGAAGAGGACTTCGATACTATGACGAAGATGAGAACCAGAGTCTCGATCATTCCAG  
AAGAAACCCGGCATTACTTTATTGCTGCACTGGAGCGCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCC  
TCACGTGCTGCGAAATCGGGCCAGTCAAGGAGCGTCCCACAGTTCAAGAAAGTGGTCTTCCAGGAGT  
TTACAGACGGATCCTTTACTCAGCCACTGTACCGGGGCGAACTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTGGGA  
CCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTATGGTCACTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCCTTA  
CAGTTTTTATTCAAGCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGGAGCAGAACCACGAAAAAAT  
TCGTGAAGCCTAATGAGACCAAAACATACTTTTGAAGGTGCAGCACCATATGGCCCCAACAAAAGAC  
GAATTCGATTGCAAGGCATGGGCCCTATTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAGGACGTCCACAGTGGCCT  
GATCGGGCCACTGCTGGTGTGTCTATACTAACCCCTGAATCCCGCACACGGCAGGCAGGTCACTGTCC  
AGGAATTCGCCCTGTTCTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCTGGTACTTCACCGAAAACATGGAG  
CGAAATTCGCGGGCTCCATGTAATATTCAGATGGAAGACCCACATTCAAGGAGAACTACCGCTTTCA  
TGCCATCAATGGGTATATTATGGATACCTGCCCCGACTGGTCTGAGGCTCAGGACCAGAGAATCAGGT  
GGTACCTGCTGAGCATGGGGTCCAACGAGAATATCCACTCAATTCATTTAGCGGACACGTGTTTACT  
GTCCGGAAGAAAGAAGAGTATAAAATGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGGCGTGTTCGAAACCGTCGA  
GATGCTGCCTAGCAAGGCAGGGATCTGGAGAGTGGAATGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCGGAA  
TGCTACCCCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACATATC  
CGGGATTTCCAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCTAAGCTGGCTAGACTGCACTA  
TTCCGGGTCTATCAACGCTTGGTCCACAAAAGAGCCTTTCTCTTGGATTAAAGGTGGACCTGCTGGCAC  
CAATGATCATTGATGGCATCAAAACTCAGGGGGCCAGGCAGAAAGTTCTCCTCTCTGTACATCTCACAG  
TTTATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGGCAATAGCACAGGGACTCT  
GATGGTGTCTTTTGGCAACGTGGACAGTTCAGGGATCAAGCACAACATTTTCAATCCCCCTATCATTG  
CTAGATACATCAGGCTGCACCAACCCATTATTCTATTGGAAGTACACTGCGGATGGAAGTATGGGG  
TGCGATCTGAACAGTTGTTCAATGCCCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAATCTCTGACGCCAGATTAC  
CGCTAGCTCCTACTTCACTAATATGTTTGCTACCTGGAGCCCCCTCCAAGACGAGCTGCATCTGCAGG  
GACGAAGCAACGATGGCGACCAAGGTGAACAATCCAAGGAGTGGCTGCAGGTTCGATTTTCAGAAA  
ACTATGAAGGTGACCGGAGTCACAACTCAGGGCGTGAAGGTCTGCTGACCTCAATGTACGTCAAGGA  
GTTTCTGATCTCTAGTTTACAGGACGGCCACCAGTGGACACTGTTCTTTTCAAGACGGAAGGTGAAAG  
TCTTCCAGGGCAATCAGGATTCTTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGACTCGC  
TACCTGCCAATCCACCCACAGTCTGGGTGCATCAGATTGCACTGAGAATGGAAGTCTGGGGCTGCGA  
GGCCAGGACCTGTATTGA

ADNc de factor VIII de codones optimizados, asimismo conocido como CO/CO3, variante con eliminación de los aminoácidos 1645 y 1646, Δ2 (SEC ID nº:5)

ATGCAGATTGAGCTGTCAACTTGCTTTTCTGTGCCTGCTGAGATTTTGTTTTTCCGCTACTAGAAG  
ATACTACCTGGGGCTGTGGAACGTCTTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTGGGAGAGCTGCCAGTGG  
ACGCACGATTTCCACCTAGAGTCCCTAAATCATTTCCCTTCAACACCAGCGTGGTCTATAAGAAAAACA  
CTGTTCTGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTCAACATCGCTAAGCCTCGGCCACCCTGGATGGGACTGCT  
GGGACCAACAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCGTGGTCACTTACACTGAAAAACATGGCCTCACACC  
CCGTGAGCCTGCTGCTGTGGGCGTCAGCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCAGAGTATGACGATCAG  
ACTTCCAGAGAGAAAAAGAGGACGATAAGGTGTTTCTGGCGGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGT  
CCTGAAAGAGAATGGCCCCATGGCTTCCGACCCCTCTGTGCCTGACCTACTCTTATCTGAGTCACGTGG  
ACCTGGTCAAGATCTGAACAGCGGACTGATCGGAGCACTGCTGGTGTGTAGGGAAGGGAGCCTGGCT  
AAGGAGAAAACCCAGACACTGCATAAGTTTCTGCTGTTTCCCGTGTGTTGACGAAGGAAAAATCATG  
GCACAGCGAGACAAAGAATAGTCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCTTACGCCAGAGCTTGGCCCCAAA  
TGCACACTGTGAACGGCTACGTCAATCGCTCACTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACCGAAAGAGCGTG  
TATTGGCATGTGATCGGAATGGGCACACACCTGAAGTGCACCTCCATTTCTGGAGGGGCATACCTT  
TCTGGTCCGCAACCACCGACAGGCTCCCTGGAGATCTCTCCAATTACCTTCTGACAGCTCAGACTC  
TGCTGATGGATCTGGGACAGTTTCTGCTGTTTGGCACATCAGCTCCACCCAGCATGATGGCATGGAG  
GCCTACGTGAAAGTGGACAGCTGTCCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAAGCTGA  
AGACTATGACATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGTCCGATTGATGACGATAACAGCCCCCT  
CCTTTATCCAGATTAGATCTGTGGCCAAAGAAACACCCCTAAGACATGGGTCCATTACATCGCAGCCGAG  
GAAGAGGACTGGGATTATGCACCACTGGTGTGGCACCAGACGATCGATCCTACAAAATCTCAGTATCT  
GAACAATGGACACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGAAGTTTATGGCTTATACCGATGAAA  
CCTTCAAGACTCGCGAAGCAATCCAGCACGAGAGCGGGATTCTGGGACCCTGCTGTACGGAGAAGTG  
GGGACACCCCTGCTGATCATTTTAAAGAACCGGCCAGCAGGCTTACAATATCTATCCACATGGAAT  
TACAGATGTGCGCCCTCTGTACAGCCGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTCCCAA  
TCCTGCCCGGGGAAATTTTAAAGTATAAATGGACTGTACCCGTCGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGAC  
CCTAGGTGCCCGACCCGCTACTATTTCTAGTTTCTGTAATATGGAAAGGGATCTGGCCAGCGGACTGAT  
CGGCCCACTGCTGATTTGTTACAAAGAGAGCGTGGATCAGAGAGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGA  
GGAATGTGATTCGTGTTCACTGTCTTTGACGAAAACCGGTCATGGTATCTGACCGAGAACATCCAGAGA  
TTCTGCTTAATCCAGCCGGAGTGCAGCTGGAAGATCTGAGTTTCAAGCTTCTAACATCATGCATAG  
TATTAATGGCTACGTGTTGCAGAGTCTGCAGCTGTCACTGTGTCTGCACGAGGTGCTTACTGGTATA  
TCCTGAGCATTTGGAGCACAGACAGATTTCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAAGCATAAA  
ATGGTGTATGAGGACACACTGACTCTGTTCCCTTTCAGCGCGGAAACCGTGTTTATGTCCATGGAGAA  
TCCCGGGCTGTGGATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTTCAAGAAATCGCGGATGACTGCCCTGCTGA  
AAGTGTCAAGCTGTGACAAGAACACCGGAGACTACTATGAAGATTATACGAGGACATCAGCGCATAT  
CTGCTGTCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTAGTCAGAATCCTCCAGTGCTGAAGCAGCG  
CGAGATCACCCGCACTACCTGACAGAGTGATCAGGAAGAGATCGACTACGACGATACAATTTCTGTGG  
AAATGAAGAAAGAGGACTTCGATATCTATGACGAAGATGAGAACAGAGTCTTCGATCATTCCAGAAG  
AAAACCCGGCATTAATTTATTTGCTGCACTGGAGCGCCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCCTCA  
CGTGCTGCGAAATCGGGCCAGTCAGGGAGCGTCCACAGTTCAAGAAAGTGGTCTTCCAGGAGTTTA

5

CAGACGGATCCTTTACTCAGCCACTGTACCGGGGCGAACTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTGGGACCC  
TATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTATGGTCACTTACAGAAATCAGGCATCTAGGCCCTTACAG  
TTTTTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGGAGCAGAACCACGAAAAAACTTCG  
TGAAGCCTAATGAGACCAAAACATACTTTTGAAGGTGCAGACCATATGSCCCCAACAAAAGACGAA  
TTCGATTGCAAGGCATGGGCCTATTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAGGACGTCCACAGTGGCCTGAT  
CGGGCCACTGTGGTGTGTCTATCACTAACACCTGAATCCCGCACACGGCAGGCAGGTCACTGTCCAGG  
AATTGCGCCTGTTCTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCTGGTACTTCAACGAAAACATGGAGCGA  
AATTGCCGGGCTCCATGTAATATTAGATGGAAGACCCACATTCAGGAGAACTACCGCTTTCATGC  
CATCAATGGGTATATTATGGATACTCTGCCCGGACTGGTCACTGGCTCAGGACCAGAGAATCAGGTGGT  
ACCTGCTGAGCATGGGGTCCAACGAGAATATCCACTCAATTCATTTACGCGGACACGTGTTTACTGTGTC  
CGGAAGAAAGAGAGTATAAAATGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGGGCTGTTTGAACCGTTCGAGAT  
GCTGCCTAGCAAGGCAGGGATCTGGAGAGTGAATGCCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCGGAATGT  
CTACCCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGACACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACATATCCGG  
GATTTCCAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCCCTAAGCTGGCTAGACTGCATATTC  
CGGGCTATCAACGCTTGGTCCACAAAAGAGCCTTTCTTTGGATTAAAGTGGACCTGCTGGCACCAA  
TGATCATTCATGGCATAAACTCAGGGGGCCAGGCAGAAAGTTCTCCTCTCTGTACATCTCACAGTTT  
ATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGGCAATAGCACAGGGACTCTGAT  
GGTGTCTTTTGGCAACGTGGACAGTTTCAAGGATCAAGCACAACTTTTCAATCCCCCTATCATTGCTA  
GATACATCAGGCTGCACCAACCCATTATTTCTATTGAAAGTACACTGCGGATGGAATGATGGGGTGC  
GATCTGAACAGTTTGTTCATGTGCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAATCTCTGACGCCAGATTACCGC  
TAGCTCCTACTTCACTAATATGTTTGTACCTGGAGCCCTCCAAAGCACGACTGCATCTGCAGGGAC  
GAAGCAACGATGGCGACCACAGGTGAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGATTTTTCAGAAAAC  
ATGAAGGTGACCGAGTCAAACTCAGGGCGTGAAGAGTCTGCTGACCTCAATGTACGTCAAGGAGTT  
CCTGATCTCTAGTTTACAGGACGGCCACAGTGGACACTGTTCTTTTCAAGACGGAAAGGTGAAGTCT  
TCCAGGGCAATCAGGATTTCTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGACTCGCTAC  
CTGCGAATCCACCCACAGTCTGGGTGCATCAGATTGCACTGAGAATGGAAGTCTGGGCTGCGAGGC  
CCAGGACCTGTATTGA

ADNc de factor VIII de codones optimizados, asimismo conocido como CO/CO3, variante con eliminación de los aminoácidos 1645 a 1647, Δ3 (SEC ID nº:6)

ATGCAGATTGAGCTGTCAACTTGGCTTTTCTGTGCTGCTGAGATTTGTTTTCCGCTACTAGAAG  
ATACTACCTGGGGGCTGTGGAAGTGTCTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTGGGAGAGCTGCCAGTGG  
ACGCACGATTTCCACCTAGAGTCCCTAAATCATTCCCTTCAACACCAGCGTGGTCTATAAGAAAACA  
CTGTTTCGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTCAACATCGCTAAGCCTCGGCCACCCTGGATGGGACTGCT  
GGGACCAACAATCCAGGCGAGAGGTGTACGACACCGTGGTCACTGAAACATGGCCTCACACC  
CCGTGAGCCTGCATGCTGTGGGCGTCAGCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCAGAGTATGACGATCAG  
ACTTCCAGAGAGAAAAAGAGGACGATAAGGTGTTTCTGGCGGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGT  
CCTGAAAGAGAAATGGCCCATGGCTTCCGACCTCTGTGCTGACCTACTCTTATCTGAGTCACGTGG  
ACCTGGTCAAGGATCTGAACAGCGGACTGATCGGAGCACTGCTGGTGTGTAGGGAAGGGAGCCTGGCT  
AAGGAGAAAACCCAGACACTGCATAAGTTTATTCTGCTGTTTCGCCGTGTTTGACGAAGGAAAATCATG  
GCACAGCGAGACAAAGAAATAGTCTGATGCAGGACCGGATGCCGCTTCCAGCCAGAGCTTGGCCCCAAA  
TGCACACTGTGAACGGCTACGTCAATCGCTCACTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACCAGAAAGAGCGTG  
TATTGGCATGTGATCGGAATGGGCACACACCTGAAGTGCACCTCATTTCCTGGAGGGGCATACCTT  
TCTGGTCCGCAACCCAGGAGGCTCCCTGGAGATCTCTCCAATTACCTTCTGACAGCTCAGACTC  
TGCTGATGGATCTGGGACAGTTTCTGCTGTTTTGCCACATCAGCTCCCACCAGCATGATGGCATGGAG  
GCCTACGTGAAAGTGGACAGCTGTCCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAAACATGAGGAAGCTGA  
AGACTATGACGATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGTCCGATTTCGATGACGATAACAGCCCT  
CCTTTATCCAGATTAGTCTGTGGCCAAAGAAACACCTAAGACATGGGTCCATTACATCGCAGCCGAG  
GAAGAGGACTGGGATTATGCACCACTGGTGTGTCACCAAGAGCATCGATCCTACAAATCTCAGTATCT  
GAACAATGGACCACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGAGGTTTATGCTTATACCGATGAAA  
CCTTCAGACTCGCGAAGCAATCCAGCACAGAGCGGGATTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAAGTG  
GGGGACACCTGCTGATCATTTTTAAGAACCAGGCCAGCAGGCTTACAATATCTATCCACATGGAAT  
TACAGATGTGCGCCCTCTGTACAGCCGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTCCCAA  
TCCTGCCCGGGAAATTTTAAAGTATAAATGGACTGTCACCGTCGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGAC

5

CCTAGGTGCCTGACCCGCTACTATTCTAGTTTCGTGAATATGGAAAGGGATCTGGCCAGCGGACTGAT  
CGGCCCACTGCTGATTTGTACAAAGAGAGCGTGGATCAGAGAGGCAACCAGATCATGTCCGACAAGA  
GGAATGTGATTTCTGTTCACTGTCTTTGACGAAAACCGGTCAATGGTATCTGACCGAGAATCCAGAGA  
TTCTGCTCAATCCAGCCGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTTTCAGGCTTCAACATCATGCGATAG  
TATTAATGGCTACGTGTTCCAGACTCTGCAGCTGTGCTGTGCTGCACGAGGTGCTTACTGGTATA  
TCCTGAGCATTGGAGCACAGACAGATTTCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAGCATAAAA  
ATGGTGTATGAGGACACACTGACTCTGTTCCCTTTCAGCGGCGAAACCGTGTTTATGTCCATGGAGAA  
TCCCGGGCTGTGGATCTGGGATGCCACAACAGCGATTTCAGGAATCGCGGGATGACTGCCCTGCTGA  
AAGTGTCAAGCTGTGACAAGAACACCGGAGACTACTATGAAGATTTCATACGAGGACATCAGCGCATAT  
CTGCTGTCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTAGTCAGAATCCTCCAGTGCTGAAGCGCGA  
GATCACCCGCACTACCCTGCAGAGTATCAGGAAGAGATCGACTACGACGATACAATTTCTGTGGAAA  
TGAAGAAAGAGGACTTCGATATCTATGACGAAGATGAGAACCAGAGTCTCGATCATTCCAGAAGAAA  
ACCCGGCATTACTTTATTGCTGCAGTGGAGCGCCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCTCAGCT  
GCTGCGAAATCGGGCCCACTGTCAGGAGCGTCCCACAGTTTCAAGAAAGTGGTCTTCCAGGAGTTTACAG  
ACGGATCCTTTACTCAGCCACTGTACCGGGCGAACTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTGGGACCCTAT  
ATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTATGTCACCTCAGAAATCAGGCATCTAGGCCTTACAGTTT  
TTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGGAGCAGAACCCAGAAAAAATCTCGTGA  
AGCCTAATGAGACCAAAACATACTTTTGAAGGTGCAGCACCATATGGCCCCAACAAAAGACGAATTC  
GATTGCAAGGCATGGGCTATTTTTCTGACGTGGATCTGAGAGAGGACGTCACAGTGGCCTGATCGG  
GCCACTGCTGGTGTGTACTACTAACACCTGAATCCCGCACACGGCAGGCAGGTCACTGTCCAGGAAT  
TCGCCCTGTTCTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAAGCTGGTACTTCACCGAAAAACATGGAGCGAAAT  
TGCCGGGCTCCATGTAATATTAGATGGAAGACCCACATTCAAGGAGAACTACCGCTTTTCATGCCAT  
CAATGGGTATATTATGGATACTCTGCCCGACTGGTCAATGGCTCAGGACCAGAGAATCAGGTGGTACC  
TGCTGAGCATGGGGTCCAACGAGAATATCCACTCAATTCATTTCAGCGGACACGTGTTTACTGTCCGG  
AAGAAAGAGAGTATAAAATGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGCGTGTTCGAAACCGTCGAGATGCT  
GCCTAGCAAGGCAGGGATCTGGAGAGTGGAATGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCGGAATGTCTA  
CCCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGACACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACATATCCGGGAT  
TTCCAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCTAAGCTGGCTAGACTGCACATTTCGGG  
GTCTATCAACGCTTGGTCCACAAAAGAGCCTTTCTCTTGGATTAAAGTGGACCTGCTGGCACCATGA  
TCATTTCATGGCATCAAACTCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCTCCTCTCTGTACATCTCACAGTTTATC  
ATCATGTACAGCCTGGATGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGCAATAGCACAGGGACTCTGATGGT  
GTTCTTTGGCAACGTGGACAGTTTCAGGGATCAAGCACAACTTTTCAATCCCCCTATCATTGCTAGAT  
ACATCAGGCTGCACCCAAACCCATTATTTCTATTCGAAGTACACTGCGGATGGAACATGATGGGTGCGAT  
CTGAACAGTTGTTCAATGCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAATCTCTGACGCCAGATTACCGCTAG  
CTCCTACTTCACTAATATGTTTGCTACCTGGAGCCCTCCAAAGCACGACTGCATCTGCAGGGACGAA  
GCAACGATGGCGACCACAGGTGAACAATCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGATTTTCAGAAAACATATG  
AAGGTGACCGGAGTCAACACTCAGGGCGTGAAGTCTGCTGACCTCAATGTACGTCAAGGAGTTCTCT  
GATCTCTAGTTTACAGGACCGGCCACCACTGGACACTGTTCTTTCAGAACGGAAAGGTGAAGTCTTCC  
AGGGCAATCAGGATTCTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGACTCGTACCTG  
CGAATCCACCCACAGTCTGGGTGCATCAGATTGCACTGAGAATGGAAGTCTGGGCTGCAGGCCCCA  
GGACCTGTATTGA

ADNc de FVIII de codones optimizados, asimismo conocido como CO/CO3, variante con eliminación del aminoácido

1648, Δ1648 (SEC ID nº:7)

5

ATGCAGATTGAGCTGTCAACTTGCTTTTTCTGTGCCTGCTGAGATTTTGTITTTCCGCTACTAGAAG  
ATACTACCTGGGGGCTGTGGAAGTGTCTTGGGATTACATGCAGAGTGACCTGGGAGAGCTGCCAGTGG  
ACGCACGATTTCCACCTAGAGTCCCTAAATCATTCCCTTCAACACCAGCGTGGTCTATAAGAAAAACA  
CTGTTTCGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTCAACATCGCTAAGCCTCGGCCACCTGGATGGGACTGCT  
GGGACCAACAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCGTGGTCATTACACTGAAAAACATGGCCTCACACC  
CCGTGAGCCTGCATGCTGTGGGCGTCAGCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCAGAGTATGACGATCAG  
ACTTCCCAGAGAGAAAAAGAGGACGATAAGGTGTTTCCGTGGCGGGTCTCATACCTATGTGTGGCAGGT  
CCTGAAAGAGAATGGCCCCATGGCTTCCGACCCCTCTGTGCCTGACCTACTCTTATCTGAGTCACGTGG  
ACCTGGTCAAGGATCTGAACAGCGGACTGATCGGAGCACTGCTGGTGTGTAGGGAAGGGAGCCTGGCT  
AAGGAGAAAAACCCAGACACTGCATAAGTTCATTCTGCTGTTCGCCGTGTTTGACGAAGGAAAAATCATG  
GCACAGCGAGACAAAGAATAGTCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCTTCAGCCAGAGCTTGGCCCCAAA  
TGCACACTGTGAACGGCTACGTCAATCGCTCAGTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACCGAAAGAGCGTG  
TATTGGCATGTCTATCGGAATGGGCACCACACCTGAAGTGCATCCATTTTCTGGAGGGGCATACCTT  
TCTGGTCCGCAACCCAGCAGGCTCCCTGGAGATCTCTCCAATTACCTTCTGACAGCTCAGACTC  
TGCTGATGGATCTGGGACAGTTCTGCTGTTTTGCCACATCAGCTCCACCAGCATGATGGCATGGAG  
GCCTACGTGAAAGTGCAGGCTGTCTCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAAGCTGA  
AGACTATGACGATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGTCCGATTGATGACGATAACAGCCCCCT  
CCTTTATCCAGATTAGATCTGTGGCCAAGAAACACCCTAAGACATGGGTCCATTACATCGCAGCCGAG  
GAAGAGGACTGGGATTATGCACCACTGGTGTGGCACCAGACGATCGATCTACAAATCTCAGTATCT  
GAACAATGGACCACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGAGGTTCATGGCTTATACCGATGAAA  
CCTTCAAGACTCGCGAAGCAATCCAGCAGAGAGCGGGATTCTGGGACCACTGCTGTACGGAGAAGTG  
GGGACACCCCTGCTGATCATTTTTTAAGAACCAGGCGCAGCGGCTTACAATATCTATCCACATGGAAT  
TACAGATGTGGCCCTCTGTACAGCCGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAGGACTTCCCAA  
TCCTGCCCGGGGAAATTTTTAAGTATAAATGGACTGTCACCGTCGAGGATGGCCCCACTAAGAGCGAC  
CCTAGGTGCCGTGACCCGCTACTATICTAGTTTCGTGAATATGAAAGGGATCTGGCCAGCGGACTGAT  
CGGCCCACTGCTGATTGTGTACAAAGAGAGCGTGGATCAGAGAGGCAACCAGATCAITGCCACAAGA  
GGAATGTGATTCTGTTTCAGTGTCTTTGACGAAACCGGTATGGTATCTGACCGAGAACATCCAGAGA  
TTCTGCTCAATCCAGCCGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTTTCAGGCTTCTAACATCATGCATAG  
TATTAATGGCTACGTGTTTCGACAGTCTGCAGCTGTGAGTGTCTGACAGGTCGCTTACTGGTATA  
TCCTGAGCATTGGAGCACAGACAGATTTCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTTTAAGCATAAA  
ATGGTGTATGAGGACACCTGACTCTGTTCCCTTTCAGCGGCGAAACCGTGTATGTCCATGGAGAA  
TCCCGGGCTGTGGATCTGGGATGCCACACAGCGATTTTCAGGAATCGCGGATGACTGCCCTGCTGA  
AAGTGTCAAGCTGTGACAAGAACACCGGAGACTACTATGAAGATTCATACGAGGACATCAGCGCATAT  
CTGCTGTCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTAGTCAGAATCCTCCAGTGTGAAGAGGCA  
CCAGGAGATCACCCGCACTACCTGACAGAGTGATCAGGAAGAGATCGACTACGACGATACAAATTTCTG  
TGGAAATGAAGAAAGAGGACTTCGATATCTATGACGAAGATGAGAACCAGAGTCTCTCGATCATCCAG  
AAGAAACCCCGCATTACTTTATTGCTGCAGTGGAGCGCTGTGGGATTATGGCATGTCTCTAGTCC  
TCACGTGCTGCGAAATCGGGCCAGTCAAGGAGCGTCCACAGTTCAAGAAAGTGGTCTCCAGGAGT  
TTACAGACGGATCTTTACTCAGCCACTGTACCGGGCGAACTGAACGAGCACCTGGGGCTGCTGGGA  
CCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTATGGTCACCTTCAGAAATCAGGCATCTAGGCCTTA  
CAGTTTTTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGGAGCAGAACCACGAAAAAACT  
TCGTGAAGCCTAATGAGACCAAAACATACTTTTGGAGGTGCAGCACCATATGGCCCCAACAAAAGAC  
GAATGCGGTGTCAGGATGGCCATGTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAGGACGTCCACAGTGGCCT  
GATCGGGCCACTGCTGGTGTGTCTACTAATACACCCCTGAATCCCGCACACGGCAGGCAGGTCACTGTCC  
AGGAATTCGCCCTGTTCTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAGCTGGTACTTCACCGAAAACATGGAG  
CGAAATTCGCCGGGCTCCATGTAATATTGATGGAAGACCCACATTCAAGGAGAACTACCGCTTTCA  
TGCCATCAATGGGTATATTATGGATACTCTGCCCGGACTGGTTCATGGCTCAGGACCAGAGAATCAGGT  
GGTACCTGCTGAGCATGGGGTCCAACGAGAATATCCACTCAATTCATTTACCGGACACGTGTTTACT  
GTCCGGAAGAAAGAGATATAAAATGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGCGCTGTTGAAACCGTCGA  
GATGCTGCCTAGCAAGGCAGGGATCTGGAGAGTGGAAATGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCCGGAA  
TGTCIACCTGTTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGACACACCCCTGGGGATGGCTTCCGGACATATC  
CGGGATTTCAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCTAAGCTGGCTAGACTGCACTA  
TTCCGGGTCTATCAACGCTTGGTCCACAAAAGAGCCTTTCTCTTGGATTAAAGTGGACCTGCTGGCAC  
CAATGATGATGTCATCAAACTCAGGGGCGCAGGCAGAAAGTCTCTCTCTGTACATCTCACAG  
TTTATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGCAATAGCACAGGGACTCT  
GATGGTGTCTTTTGGCAACGTGGACAGTTCAGGGATCAAGCACAAACATTTTCAATCCCCCTATCATTG  
CTAGATACATCAGGCTGCACCAACCCATTATTCTATTCTGAAGTACACTGCGGATGGAACCTGATGGGG  
TGCGATCTGAACAGTTGTTCAATGCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAATCTCTGACGCCCAGATTAC  
CGCTAGCTCCTACTTCAATATATGTTTGTACCTGGAGCCCTCCAAAGCACGACATGATCTGCAGG  
GACGAAGCAACGCATGGCGACCAAGGTGAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGATTTTCAGAAA  
ACTATGAAGGTGACCGGAGTCAAACTCAGGGCGTGAAAAGTCTGCTGACCTCAATGTACGTCAAGGA  
GTTCTGATCTCTAGTTTACAGGACGGCCACAGTGGACACTGTTCTTTTCAAGACGGAAGGTGAAAG  
TCTTCCAGGGCAATCAGGATTCTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGGACCCACCCCTGCTGACTCGC  
TACCTGCGAATCCACCCACAGTCTGGGTGCATCAGATTGCACTGAGAAIGGAAGTCTGGGCTGCGA  
GGCCAGGACCTGTATTGA

Promotor TTR con mutación de 4 nucleótidos (TTRm), SEC ID nº:8

GTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCGGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTGA  
CTTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTT  
GGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCAC  
ACAGATCCACAAGCTCCT

5

Se proporciona la secuencia de ADN del constructo de factor VIII de longitud completa entero, incluyendo el promotor de TTR con la mutación de cuatro nucleótidos, intrón sintético, ADNc de factor VIII de codones optimizados y secuencia de señal de poliadenilación (Poli A) (SEC ID nº:9). Asimismo se resaltan en SEC ID nº:9 los codones que codifican el sitio de escisión PACE/furina de 4 aminoácidos, en el que 1, 2, 3 o la totalidad de los 4 aminoácidos se eliminan opcionalmente.

10

Constructo de longitud completa que incluye promotor de TTR con mutación de 4 nucleótidos (TTRm), intrón sintético, ADNc de factor VIII de codones optimizados (PACE/furina subrayado), poli A (SEC ID nº:9)

GTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCGGATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTga  
ctTAGGTTACTTATTCTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTT  
GGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTCAC  
ACAGATCCACAAGCTCCTGCTAGCAGGTAAGTGCCGTGTGTGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACG  
GGTTATGGCCCTTGGCTGCCTTGAATTACTGACACTGACATCCACTTTTTCTTTTCTCCACAGGTTT  
AAACGCCACCATGCAGATTGAGCTGTCAACTTGCTTTTTCCTGTGCTGCTGAGATTTTGTTTTCCG  
CTACTAGAAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAAGTGTCTTGGGATTACATGCAGACTGACCTGGGAGAG  
CTGCCAGTGGACGCACGATTTCCACCTAGAGTCCCTAAATCATTCCCTTCAACACCAGCGTGGTCTA  
TAAGAAAACACTGTTTCGTGGAGTTTACTGATCACCTGTTCAACATCGCTAAGCCTCGGCCACCCTGGA  
TGGGACTGCTGGGACCAACAATCCAGGCAGAGGTGTACGACACCGTGGTCATTACACTGAAAAACATG  
GCCTCACACCCCGTGAGCCTGCATGCTGTGGGCGTCAGCTACTGGAAGGCTTCCGAAGGGGCACAGTA  
TGACGATCAGACTTCCAGAGAGAAAAAGAGGACGATAAGGTGTTTCTGGCGGGTCTCATACCTATG  
TGTGGCAGGTCCTGAAAGAGAATGGCCCCATGGCTTCCGACCCCTGTGTGCTGACCTACTCTTATCTG  
AGTCACGTGGACCTGGTCAAGGATCTGAACAGCGGACTGATCGGAGCACTGCTGGTGTGTAGGGAAGG  
GAGCCTGGCTAAGGAGAAAAACCCAGACACTGCATAAGTTTCTTCTGCTGTTCCCGTGTGTTGACGAAG  
GAAAATCATGGCACAGCGAGACAAAGAATAGTCTGATGCAGGACCGGGATGCCGCTTCAGCCAGAGCT  
TGGCCCAAAATGCACACTGTGAACGGCTACGTCAATCGCTCACTGCCTGGACTGATCGGCTGCCACCG  
AAAGAGCGTGTATTGGCATGTATCGGAATGGGCACCACACCTGAAGTGCATCCATTTTCTGGAGG  
GGCATACTTTCTGGTCCGCAACCACCGACAGGCTCCCTGGAGATCTCTCCAATTACCTTCCCTGACA  
GCTCAGACTCTGCTGATGGATCTGGGACAGTTCTGCTGTTTTGCCACATCAGCTCCCACCAGCATGA  
TGGCATGGAGGCCTACGTGAAAGTGGACAGCTGTCCCGAGGAACCTCAGCTGAGGATGAAGAACAAATG  
AGGAAGCTGAAGACTATGACGATGACCTGACCGACTCCGAGATGGATGTGGTCCGATTTCGATGACGAT  
AACAGCCCCCTCCTTTATCCAGATTAGATCTGTGGCCAAGAAACACCCCTAAGACATGGGTCCATTACAT  
CGCAGCCGAGGAAGAGGACTGGGATTATGCACCACTGGTGTGGCACCAGACGATCGATCCTACAAAT  
CTCAGTATCTGAACAATGGACCACAGCGGATTGGCAGAAAGTACAAGAAAGTGAGGTTTCATGGCTTAT  
ACCGATGAAACCTTCAAGACTCGCGAAGCAATCCAGCACGAGAGCGGGATTCTGGGACCACTGCTGTA  
CGGAGAAGTGGGGGACACCCTGCTGATCATTTTTAAGAACCAGGCCAGCGCCTTACAATATCTATC  
CACATGGAATTACAGATGTGCGCCCTCTGTACAGCCGGAGACTGCCAAAGGGCGTCAAACACCTGAAG  
GACTTCCCAATCCTGCCCCGGGAAATTTTTAAGTATAAATGGACTGTCAACCGTCGAGGATGGCCCCAC  
TAAGAGCGACCCCTAGGTGCCTGACCCGCTACTATTCTAGTTTCTGTAATATGGAAAGGGATCTGGCCA  
GCGGACTGATCGGCCCACTGCTGATTTGTTACAAAGAGAGCGTGGATCAGAGAGGCAACCAGATCATG  
TCCGACAAGAGGAATGTGATTCTGTTTCAAGTGTCTTTGACGAAAACCGGTCATGGTATCTGACCGAGAA  
CATCCAGAGATTCTGCCTAATCCAGCCGGAGTGCAGCTGGAAGATCCTGAGTTTCAGGCTTCTAACA  
TCATGCATAGTATTAATGGCTACGTGTTTCGACAGTCTGCAGCTGTCAGTGTGCTGCACGAGGTGCT  
TACTGGTATATCCTGAGCATTGGAGCACAGACAGATTTCTGAGCGTGTCTTTTCCGGCTACACTTT  
TAAGCATAAAATGGTGTATGAGGACACACTGACTCTGTTCCCTTCAGCGGCGAAACCGTGTATTATGT

15



CCATGGAGAATCCCGGGCTGTGGATCCTGGGATGCCACAACAGCGATTTTCAGGAATCGCGGGATGACT  
 GCCCTGCTGAAAGTGTCAAGCTGTGACAAAGAACACCGGAGACTACTATGAAGATTTCATACGAGGACAT  
 CAGCGCATATCTGCTGTCCAAAAACAATGCCATTGAACCCAGGTCTTTTAGTCAGAATCCTCCAGTG  
 TGAAGAGGCACCGCGGAGATCACCCGCACTACCTGCAGAGTGATCAGGAAGAGATCGACTACGAC  
 GATACAATTTCTGTGGAAATGAAGAAAGAGGACTTCGATATCTATGACGAAGATGAGAACCAGAGTCC  
 TCGATCATTCCAGAAGAAAACCCGGCATTACTTTATTGCTGCAGTGGAGCGCCTGTGGGATTATGGCA  
 TGTCTCTAGTCCTCAGTGCTGCGAAATCGGGCCAGTCAGGGAGCGTCCCACAGTTCAAGAAAGTG  
 GTCTTCCAGGAGTTTACAGACGGATCCTTTACTCAGCCACTGTACCGGGCGAACTGAACGAGCACCT  
 GGGGCTGCTGGGACCCTATATCAGAGCTGAAGTGGAGGATAACATTATGGTCACCTTCAGAAATCAGG  
 CATCTAGGCCCTTACAGTTTTTATTCAAGCCTGATCTCTTACGAAGAGGACCAGAGGCAGGGAGCAGAA  
 CCACGAAAAAACTTCGTGAAGCCTAATGAGACCAAAACATACTTTTGAAGGTGCAGCACCATATGGC  
 CCCAACAAAAGACGAATTCGATTGCAAGGCATGGGCCTATTTTCTGACGTGGATCTGGAGAAGGACG  
 TCCACAGTGGCCTGATCGGGCCACTGCTGGTGTGTCTACTAACACCCTGAATCCCGCACACGGCAGG  
 CAGGTCACTGTCCAGGAATTCGCCCTGTTCTTTACCATCTTTGATGAGACAAAAGCTGGTACTTCAC  
 CGAAAAACATGGAGCGAAATTCGCCGGCTCCATGTAATATTCAGATGGAAGACCCACATTCAAGGAGA  
 ACTACCGCTTTTCATGCCATCAATGGGTATATTATGGATACTCTGCCCGGACTGGTCATGGCTCAGGAC  
 CAGAGAATCAGGTGGTACCTGCTGAGCATGGGGTCCAACGAGAATATCCACTCAATTTCATTTACGCGG  
 ACACGTGTTTACTGTCCGGAAGAAAGAGAGTATAAAATGGCCCTGTACAACCTGTATCCCGGCGTGT  
 TCGAAACCGTCGAGATGCTGCCAGCAAGGCAGGGATCTGGAGAGTGAATGCCTGATTGGGGAGCAC  
 CTGCATGCCGGAATGTCTACCCTGTTTCTGGTGTACAGTAATAAGTGTGACACACCCCTGGGGATGGC  
 TTCCGGACATATCCGGGATTTCCAGATTACCGCATCTGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCTTAAGCTGG  
 CTAGACTGCACTATTCCGGGTCTATCAACGCTTGGTCCACAAAAGAGCCTTTCTCTTGGATTAAAGTG  
 GACCTGCTGGCACCATGATCATTTCATGGCATCAAACTCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCTCTCTCTCT  
 GTACATCTCAGTTTTATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAGACATACCGCGGCAATA  
 GCACAGGGACTCTGATGGTGTCTTTGGCAACGTGGACAGTTCAGGGATCAAGCACAACATTTTCAAT  
 CCCCCATCATTGCTAGATACATCAGGCTGCACCCAACCCATTATTCTATTTCGAAGTACACTGCGGAT  
 GGAATCGATGGGGTGGCATCTGAACAGTTGTTCAATGCCCTGGGAATGGAGTCCAAGGCAATCTCTG  
 ACGCCAGATTACCGCTAGCTCCTACTTCACTAATATGTTTGCTACCTGGAGCCCTCCAAAGCACGA  
 CTGCATCTGCAGGGACGAAGCAACGCATGGCGACCACAGGTGAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAGGT  
 CGATTTTCAGAAAACATGAAGGTGACCGGAGTCACAACCTCAGGGCGTGAAGAGTCTGCTGACCTCAA  
 TGTACGTCAAGGAGTTCCTGATCTCTAGTTCACAGGACGGCCACCAGTGGACACTGTTCTTTCAGAAC  
 GGAAAGGTGAAGTCTTCCAGGGCAATCAGGATTCCCTTTACACCTGTGGTCAACTCTCTGACCCACC  
 CCTGCTGACTCGCTACCTGCGAATCCACCCACAGTCTGGGTGCATCAGATTGCACTGAGAATGGAAG  
 TCCTGGGCTGCGAGGCCAGGACCTGTATTGAGCGGCCCAATAAAAGATCAGAGCTCTAGAGATCTG  
 TGTGTTGGTTTTTTTGTGT

ADNc de factor VIII de codones optimizados, asimismo conocido como CO1 (SEC ID nº:10)

ATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCTGTGCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCAGACG  
 GTACTATCTGGGCGCCGTGGAACCTGAGCTGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAGCTGCCCGTGG  
 ATGCCAGATTCCCTCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCTTCAACACCTCCGTGGTGTACAAGAAAACC  
 CTGTTCTGTGAATTCACCGACACCTGTTCAATATCGCCAAGCCAGACCCCCCTGGATGGGCTGCT  
 GGGACCTACAATTCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTCTGTATCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACC  
 CCGTGTCTCTGCATGCCGTGGGAGTGTCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAG  
 ACCAGCCAGCGCGAGAAAAGAGGACGACAAGGTGTTCCCTGGCGGCAGCCACACCTACGTGTGGCAGGT  
 GCTGAAAGAAAACGGCCCATGACCCTCTGTGCCTGACATACAGCTACCTGAGCCACGTGG  
 ACCTCGTGAAGGACCTGAACAGCGGCTGATCGGAGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAGGGCAGCCTGGCC  
 AAAGAGAAAACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTCGCCGTGTTTCGACGAGGGCAAGAGCTG  
 GCACAGCGAGACAAAGAACAGCCTGATGCAGGACCGGGACGCCGCTCTGCTAGAGCCTGGCCAAAAA  
 TGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCCGGACTGATCGGCTGCCACCGGAAGTCTGTG  
 TACTGGCAGCTGATCGGCATGGGCACACCCCTGAGGTGCACAGCATCTTCTGGAAGGACACACCTT  
 TCTCGTGCAGAACACCGGCAGGCCAGCCTGGAATCAGCCCTATCACCTTCTGACCGCCAGACAC  
 TGCTGATGGACCTGGGCCAGTTTCTGCTGTTCTGCCACATCAGCTCCACACGACGACGGCATGGAA  
 GCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCGAGGAACCCAGCTGCGGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGA  
 GGACTACGACGACGACCTGACCGACAGCGAGATGGACGTGGTGCCTTCGACGACGATAACAGCCCCA

GCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCATATATCGCCGCCGAG  
 GAAGAGGACTGGGATTACGCCCTCTGGTGCTGGCCCCGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCT  
 GAACAATGGCCCCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGGGTTCATGGCCTACACCGACGAGA  
 CATTCAAGACCAGAGAGGCCATCCAGCACGAGAGCGGCATCCTGGGCCCTCTGCTGTATGGCGAAGTG  
 GCGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGACCCTACAACATCTACCCTCACGGCAT  
 CACCGACGTGCGGCCCTGTACTCTAGAAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAACACCTGAAGGACTTCCCA  
 TCCTGCCCCGGCGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAAGATGGCCCCACCAAGAGCGAC  
 CCCAGATGCCGTGACACGGTACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGGGACCTGGCCTCCGGCCTGAT  
 TGGCCCACTGCTGATCTGCTACAAAGAAAGCGTGGACCAGCGGGGCAACCAGATCATGAGCGACAAGC  
 GGAACGTGATCCTGTTTTAGCGTGTTCGATGAGAACCAGGTCTCTGGTATCTGACCGAGAATATCCAGCGG  
 TTCTGCCCCAACCTGCGCGCTGTCAGCTGGAAGATCCTGAGTTCAGGCCTCCAACATCATGCACTC  
 CATCAATGGCTATGTGTTCCGACAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCTGCACGAGGTGGCCTACTGGTACA  
 TCCTGAGCATCGGGGCCAGACCGACTTCTGTCCGTGTTCTTCTCCGGCTACACCTTCAAGCACAAAG  
 ATGGTGTACGAGGATACCTGACCCTGTTCCCTTTAGCGGCGAAACCGTGTTTCATGAGCATGGAAAA  
 CCCCCGCCCTGTGGATCCTGGGCTGCCACAACAGCGACTTCCGGAACAGAGGCATGACCGCCCTGCTGA  
 AGGTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTATGAGGACATCAGCGCCTAC  
 CTGCTGAGCAAGAACAATGCCATCGAGCCCAAGAGCTTCAGCCAGAACCCCCCGTGCTGAAGCGGCA  
 CCAGAGAGAGATCACCCGGACCAACCTGCAGTCCGACAGGAAGAGATCGATTACGACGACACCATCA  
 GCGTGGAAATGAAGAAAGAAGATTTGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCCGTCTTT  
 CAGAAAAAGACCCGGCACTACTTCATTGCCGCTGTGGAACGGCTGTGGGACTACGGCATGAGCAGCAG  
 CCTCACGTGCTGAGAAACAGGGCCAGAGCGGCGAGCGTGCCCCAGTTCAGAAAGTGGTGTTCAGG  
 AATTACAGACGGCAGCTTCACCCAGCCTCTGTACCGCGGCGAGCTGAATGAGCACCTGGGACTGCTG  
 GGCCCTATATCAGAGCCGAAGTGAAGATAACATCATGGTCACCTTCCGGAATCAGGCCTCCCGGCC  
 CTACAGCTTCTACAGCTCCCTGATCAGCTACGAAGAGGACAGAGACAGGGCGCTGAGCCCCGGAAGA  
 ACTTCGTGAAGCCCAACGAGACTAAGACCTACTTTTGAAGGTGCAGCACCACATGGCCCTACAAAG  
 GACGAGTTCGACTGCAAGGCCCTGGGCCTACTTCTCCGATGTGGACCTGGAAAAGGACGTGCACTCTGG  
 GCTGATCGGCCCTGCTCGTGTGCCACACCAACACCCTGAATCCCGCCACGGCAGACAAGTGACAG  
 TGCAGGAATTCGCCCTGTTCTTACCATCTTCGACGAAACAAAGAGCTGGTACTTCACCGAAAACATG  
 GAAAGAACTGCCGGGCTCCCTGCAACATCCAGATGGAAGATCCACCTTCAAAGAGAACTACCGGTT  
 CCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACACTGCCCGGCCCTCGTGATGGCTCAGGATCAGCGGATCC  
 GGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCTCCAACGAGAATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTT  
 ACCGTGCGGAAAAAAGAGTACAAAATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGGGTGTTCGAGACAGT  
 GGAAATGCTGCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCGGGTGAATGTCTGATCGGCGAGCATCTGCACGCTG  
 GGATGAGCACACTGTTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACACCTCTGGGCATGGCCTCTGGCCAC  
 ATCCGGGACTTTCAGATCACAGCCAGCGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCAAACTGGCCAGACTGCA  
 CTACAGCGGCAGCATCAACGCCTGGTCCACCAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGG  
 CTCCCATGATCATCCACGGAATCAAGACCCAGGGCGCCAGACAGAAGTTTCAGCAGCCTGTACATCAGC  
 CAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGCAATAGCACCGGCAC  
 CCTGATGGTGTCTTCGGCAACGTGGACTCCAGCGGCATTAAGCACAAACATCTTCAACCCCCCATCA  
 TTGCCCGGTACATCCGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCCGGTCCACCCTGAGAATGGAAGTGTG  
 GGCTGCGACCTGAACCTCTGCAGCATGCCCCGGGGATGGAAGCAAGGCCATCTCCGACGCCAGAT  
 CACCGCCTCCAGCTACTTCACCAACATGTTCCGCCCTGGTCCCATCCAAGGCCGGCTGCATCTGC  
 AGGGCAGAAGCAATGCTTGGAGGCCCAAGTGAACAACCCCAAGAATGGCTGCAGGTGGACTTCCAG  
 AAAACCATGAAAGTGACCGGCTGACCAACAGGGCGTGAAGTCTCTGCTGACCTCTATGTACGTGAA  
 AAGTGTTCAGGGGAACAGGACTCCTTACCCCCGTCGTGAATAGCCTGGACCTCCACTGCTGACC  
 AGATACCTGCGGATCCACCCTCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCTCTGCGGATGGAAGTGTGGGATG  
 CGAGGCCAGGACCTGTACTGA

ADNc de factor VIII de codones optimizado, asimismo conocido como CO2 (SEC ID nº:11)

ATGCAGATCGAGCTGTCTACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTTAGCGCTACTAGACG  
 CTACTACCTGGGCGCGTGGAACTGAGCTGGGACTATATGCACTCAGACCTGGGCGAGCTGCCCGTGG  
 ACGCTAGATTCCACCTAGAGTGCCCTAAGAGCTTCCCTTTAACACCTCCGTGGTCTATAAGAAAACC  
 CTGTTCTGTCGAGTTACCGATCACCTGTTAATATCGCTAAGCCTAGACCCCTGGATGGGCCCTGCT

GGGCCCTACTATTACAGGCCGAGGTCTACGACACCGTCGTGATCACCCCTGAAGAATATGGCTAGTCACC  
 CCGTCAGCCTGCACGCCCTGGGCGTCACTACTGGAAGGCTAGCGAGGGCGCCGAGTACGACGATCAG  
 ACTAGTCAGCGCGAGAAAGAGGACGACAAAGTCTTTCTGGCGGCTCTCACACCTACGTGTGGCAGGT  
 CCTGAAAGAAAACGGCCCTATGGCTAGCGACCCCTGTGCCTGACCTATAGCTACCTGAGTCACGTGG  
 ACCTGGTCAAGGACCTGAATAGCGGCCGTGATCGGCGCCCTGCTCGTGTGTAGAGAGGGCTCACTGGCT  
 AAAGAGAAAACCTCAGACCCTGCACAAGTTTATCCTGCTGTTTCGCCGTGTTTCGACGAGGGCAAGAGCTG  
 GCACTCAGAGACTAAGAATAGCCTGATGCAGGATAGGGACGCCGTAGCGCTAGAGCCTGGCCTAAGA  
 TGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGATCACTGCCCGGACTGATCGGCTGTACCGGAAGTCCGTC  
 TACTGGCACGTGATCGGAATGGGCACTACCCCGAGGTGCACTCTATCTTTCTGGAAGGCCACACCTT  
 CCTCGTCAGAAATCACCGGCAGGCTAGCCTCGAGATTAGCCCTATCACCTTCTGACCGCTCAGACAC  
 TGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCTGCTGTTTTGTGTCACATTAGCTCTCACACGACGACGGGATGGAA  
 GCCTACGTGAAAGTGGATAGCTGCCCCGAGGAACCTCAGCTGAGAATGAAGAACACGAGGAAGCCGA  
 GGATTACGACGACGACCTGACCGATAGCGAGATGGACGTCGTGATTCGACGACGATAAATCACCTA  
 GCTTTATTAGATTAGATCAGTGGCTAAGAAGCACCCCTAAGACCTGGGTGCACTATATCGCCGCCGAG  
 GAAGAGGACTGGGACTACGCCCTCTGGTGTGCTGGCCCCGACGATAGAAGCTATAAGTCTCAGTACCT  
 GAACAACGGCCCTCAGCGGATCGGCCGGAAGTATAAGAAAGTGGGTTTATGGCCTACCCGACGAAA  
 CCTTCAAGACTAGAGAGGCTATTACGACGAGTCAAGGATCCTGGGCCCCCTGCTCTACGGCGAAGTG  
 GCGGACACCCCTGCTGATTATCTTTAAGAATCAGGCTAGTAGGCCCTATAATATCTACCCCCACGGAAT  
 CACCGACGTGCGGCCCTCTACTCTAGACGGCTGCCTAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCTA  
 TTCTGCCCGGCGAGATCTTTAAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGAAGGACGCGCCCTACTAAGTCCGAC  
 CCTCGGTGCTGACTAGGTACTACTCTAGCTTCGTGAATATGGAACGGGACCTGGCTAGCGGACTGAT  
 TGGCCCTCTGCTGATCTGCTACAAAGAATCAGTGGATCAGCGGGGCAATCAGATTATGAGCGATAAGC  
 GGAACGTGATCCTGTTTACTGTGTTTGACGAGAATAGGTCCTGCTGATCTGACCGAGAATATCAGCGG  
 TTCTGCTTAACCTGCGGCGTGCAGCTGGAAGATCCCGAGTTTCAGGCTAGCAATATTATGCACTC  
 TATTAACGGATACGTGTTTCGATAGCCTGCAGCTGAGCGTGTGCCTGCACGAGGTGGCCTACTGGTATA  
 TCCTGTCTATCGGCGCTCAGACCGACTTCCTGAGCGTGTCTTTAGCGGCTACACCTTTAAGCACAAAG  
 ATGGTCTACGAGGATACCCCTGACCCCTGTTCCCTTTAGCGGCGAAACCGTGTATTATGTCTATGAAAA  
 CCCCCGCTGTGGATCCTGGGGTGTACAATAGCGACTTTAGGAATAGAGGAATGACCGCCCTGCTGA  
 AAGTGTCTAGCTGCGATAAGAACACCGGCGACTATTACGAGGACTCTTACGAGGATATTAGCGCCTAC  
 CTGCTGTCTAAGAACAACGCTATCGAGCCTAGAAGCTTCAGTCAGAACCCCCCGTGTGAAGCGGCA  
 CCAGAGAGAGATCACTAGAATACCCCTGCAGAGCGACAGGAAGAGATCGACTACGACGACACTATTA  
 CGCTCGAGATGAAGAAAGAGGATTTTCGATATCTACGACGAGGACGAGAACCAGTCACCTAGATCCTTC  
 CAGAAGAAAACCTAGGCACTACTTTATTGCCGCGCTCGAGCGGCTGTGGGACTACGGAATGAGTTCTAG  
 CCCTCACGTGCTGAGAAATAGGGCTCAGTCAGGCTCAGTGCCTCAGTTCAAGAAAGTGGTGTTCAGG  
 AATTCACCGACGGCAGCTTCACTCAGCCCTCTATAGGGGCGAGCTGAACGAGCACCTGGGACTGCTG  
 GGAGCTTATTAGAGCCGATATATTATGGACACCCCTGCCCGCCTCGTGATGGCTCAGGATCAGCGGATTA  
 CTACAGCTTCTACTCTAGCCTGATCAGCTACGAGGAAGATCAGCGGCAGGGGGCCGAACCTAGAAAGA  
 ACTTCGTGAAGCCTAACGAGACTAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCATGCCCCCTACTAAG  
 GACGAGTTCGACTGTAAAGCCTGGGCCTACTTTAGCGAGCTGGACCTCGAGAAGGACGTGCACTCAGG  
 GCTGATCGGACCTCTGCTCGTCTGTCACTAACACCCCTGAACCCCGCTCACGGCCGCGAGGTACAG  
 TGCAGGAATTCGCCCTGTTCTTCACTATCTTCGACGAACTAAGAGCTGGTACTTCACAGAGAATATG  
 GAAAGAACTGTAGGGCCCCCTGTAATATTAGATGGAAGATCCTACCTTTAAAGAGAACTATAGGTT  
 TCACGCTATTAAACGGCTATATTATGGACACCCCTGCCCGCCTCGTGATGGCTCAGGATCAGCGGATTA  
 GGTGGTATCTGCTGTCTATGGGCTCTAACGAGAATATTCACTCTATTCACTTTAGCGGCCACGTGTTT  
 ACCGTCCGGAAGAAAGAGATATAAGATGGCCCTCTATAACCTCTACCCCGCGCTGTTTCGAGACAGT  
 GGAAATGCTGCCTAGTAAAGCCGGAATCTGGCGGGTCAAGTGTCTGATCGGCGAGCACCTCCACGCCG  
 GAATGAGCACCTGTTTCTGGTCTACTCTAACAAGTGTGACCCCTCTGGGAATGGCTAGCGGCCAC  
 ATTAGAGACTTTCAGATCACCGCTAGCGGACAGTACGGCCAGTGGGCCCCCTAAGCTGGCTAGACTGCA  
 CTATAGCGGATCTATCAACGCCCTGGTCTACCAAAGAGCCCTTTAGCTGGATTAAGTGGACCTGCTGG  
 CCCCTATGATTATTACCGGATTAAGACTCAGGGCGCTAGGCAGAAGTTTAGTAGCCTCTATATTAGT  
 CAGTTTATCATTATGTATAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAGACCTATAGAGGCAATAGCACCGGCAC  
 CCTGATGGTGTCTTCGGCAACGTGGACTCTAGCGGGATCAAGCACAAATATCTTTAACCCCTTATTA  
 TCGCTAGATATATTAGGCTGCACCCCTACTCACTACTCTATTAGGTCTACCCCTGAGGATGGAAGTGTG  
 GGCTGCGATCTGAATAGCTGCTCTATGCCCTGGGGATGGAATCTAAGGCTATTAGCGACGCTCAGAT  
 CACAGCCTCTAGCTACTTCACTAATATGTTTCGCTACCTGGTCCCCTAGCAAGGCCCGGCTGCACCTCC

AGGGCAGATCTAACGCTTGGCGGCCTCAGGTCAACAACCCCTAAAGAGTGGCTGCAGGTGCACTTTTCA  
 AAACTATGAAGGTACCGGCGTGACCACTCAGGGCGTGAAATCACTGCTGACCTCTATGTACGTGAA  
 AGAGTTCCCTGATTAGCTTAGCCAGGACGGCCACCACTGGACCCCTGTTCTTTAGAACGGCAAAGTGA  
 AAGTGTTCAGGGCAATCAGGATAGCTTCAACCCCGTGGTCAATAGCCTGGATCCCCACTGCTGACT  
 AGATACCTGAGAATTCACCCCTCAGTCTTGGGTGCACCAAGATCGCCCTGAGAATGGAAGTCTGGGCTG  
 TGAAGCTCAGSACCTCTACTAA

Determinadas definiciones/abreviaturas utilizadas

SQ y BDD: FVIII con eliminación del dominio B.

TTRm: promotor de TTR con 4 mutaciones, de TAmGTGTAG a TATTGACTTAG

5 CO y CO3: variante de ácido nucleico de FVIII de codones optimizados, expuesto como SEC ID nº:1

CO1: variante de ácido nucleico de FVIII de codones optimizados, expuesto como SEC ID nº:10

CO2: variante de ácido nucleico de FVIII de codones optimizados, expuesto como SEC ID nº:11

Las designaciones "Prep" en la tabla 3 se refieren a 5 preparaciones de vector separadas de CO/CO3.

hFVIII-RH: sustitución Arg a His en la posición 1645 del FVIII humano.

10 Δ4: eliminación de los aminoácidos 1645 a 1648 del FVIII.

Δ1645: eliminación del aminoácido 1645 (Arg) del FVIII.

Δ2: eliminación de los aminoácidos 1645 y 1646 del FVIII.

Δ3: eliminación de los aminoácidos 1645 a 1647 del FVIII.

Δ1648: eliminación del aminoácido 1648 del FVIII.

15 Aunque se han descrito determinadas formas de realización de la invención y se han proporcionado ejemplos específicos anteriormente, no se pretende que la invención se considere limitada a tales formas de realización. Pueden introducirse diversas modificaciones en las mismas sin apartarse del alcance y espíritu de la invención, tal como se expone en las reivindicaciones siguientes.

20

## REIVINDICACIONES

1. Variante de ácido nucleico que codifica el factor VIII (FVIII), en la que el FVIII codificado por dicha variante de ácido nucleico

(a) muestra una mayor expresión cuando se compara con la expresión del FVIII de tipo salvaje codificado por el número de acceso de secuencia en GenBank NG 011403.1 o

(b) comprende una eliminación de dominio B y muestra una mayor expresión cuando se compara con la expresión del FVIII de tipo salvaje codificado por el número de acceso de secuencia en GenBank NG 011403.1 que comprende una eliminación de dominio B;

en la que dicha variante de ácido nucleico presenta uno o más codones de leucina cambiados a CTG en comparación con TTA, TTG, CTT, CTC o CTA en dicho FVIII de tipo salvaje, presenta un contenido de GC de 45.2 % a 59.2 % y es por lo menos 94 % idéntico a la secuencia de SEC ID n°:1.

2. Variante de ácido nucleico que codifica FVIII como se reivindica en la reivindicación 1, en la que

(a) dicha variante de ácido nucleico se empaqueta más eficazmente en un vector de virus adenoasociado (AAV) en comparación con el empaquetado de dicho FVIII de tipo salvaje; o

(b) dicho FVIII codificado por dicha variante de ácido nucleico muestra una actividad biológica mayor cuando se compara con dicho FVIII de tipo salvaje o cuando se compara con dicho FVIII de tipo salvaje que comprende una eliminación de dominio B.

3. Variante de ácido nucleico que codifica FVIII como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, en la que

(a) 2-5, 5-10, 10-20, 20-50, 50-100, 100-250, 250-500, 500-750 o 750-850 de los codones de leucina son codones de leucina CTG;

(b) por lo menos 85 % de los codones de leucina son codones de leucina CTG;

(c) la totalidad de los codones de leucina son codones de leucina CTG;

(d) uno o más codones de lisina son codones de lisina AAG; o

(e) dicha variante de ácido nucleico presenta entre 50-59 %, o 50-56 % o 50-53 % de contenido de GC.

4. Variante de ácido nucleico que codifica FVIII como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha variante de ácido nucleico es por lo menos 75 % idéntica a dicho ácido nucleico de FVIII humano de tipo salvaje o dicho ácido nucleico de FVIII humano de tipo salvaje que comprende una eliminación del dominio B.

5. Variante de ácido nucleico que codifica FVIII como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha variante de ácido nucleico

(a) es el FVIII humano, y/o en la que dicho FVIII de tipo salvaje o dicho FVIII de tipo salvaje que comprende una eliminación de dominio B es el FVIII humano; o

(b) comprende cualquiera de las SEC ID n°: 1-7 y 9.

6. Variante de ácido nucleico que codifica FVIII como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que

(a) 1, 2, 3 o la totalidad de los 4 codones que codifican el sitio de escisión PACE/furina han sido eliminados; o

(b) 1, 2, 3 o la totalidad de los 4 codones que codifican el sitio de escisión PACE/furina presentados como HHQR o RHQR desde las posiciones 1645-1648 han sido eliminados.

7. Vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende la variante de ácido nucleico que codifica FVIII, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Vector de AAV según la reivindicación 7, que comprende además un intrón, un elemento de control de la expresión, una o más repeticiones terminales invertidas (ITR) de virus adenoasociado (AAV) y/o una secuencia polinucleotídica de llenado.

9. Vector de AAV según la reivindicación 8, en el que el intrón está dentro o flanquea el FVIII variante, o en el que

el elemento de control de la expresión está ligado funcionalmente a la variante de ácido nucleico que codifica FVIII, o en el que la(s) ITR de AAV flanquea(n) el extremo 5' o 3' de la variante de ácido nucleico que codifica FVIII, o en el que la secuencia polinucleotídica de relleno flanquea el extremo 5' o 3' de la variante de ácido nucleico que codifica FVIII.

10. Vector de AAV según la reivindicación 8, en el que

(a) el elemento de control de la expresión comprende un elemento de control constitutivo o regulable, o un elemento de control de la expresión o promotor específico de tejido;

(b) el elemento de control de la expresión comprende un elemento que confiere expresión en el hígado;

(c) el elemento de control de la expresión comprende un promotor de TTR o promotor de TTR mutante; o

(d) el promotor de TTR mutante comprende SEC ID n°:8.

11. Vector de AAV según la reivindicación 8, en el que la ITR comprende una o más ITR de cualquiera de: los serotipos de AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8, o una combinación de los mismos.

12. Célula hospedadora que comprende la variante de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de AAV según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.

13. Vector de AAV según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que el vector de AAV comprende

(a) una secuencia de cápside VP1, VP2 y/o VP3 que presenta una identidad de secuencia de 75 % o más respecto a las secuencias de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8; o

(b) una secuencia de cápside VP1, VP2 y/o VP3 seleccionada de entre cualquiera de: los serotipos de AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 y AAV-2i8.

14. Composición farmacéutica que comprende la variante de ácido nucleico que codifica FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de AAV según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 o 13 en un portador o excipiente biológicamente compatible, que incluye opcionalmente AAV de cápside vacía.

15. Variante de ácido nucleico que codifica FVIII según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o vector de AAV según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 o 13 para la utilización en un procedimiento de tratamiento de un mamífero con necesidad de factor VIII.

16. Variante de ácido nucleico que codifica el factor VIII (FVIII) según SEC ID n°:1, SEC ID n°:2, SEC ID n°:3, SEC ID n°:4, SEC ID n°:5, SEC ID n°:6, SEC ID n°:7, SEC ID n°:9, SEC ID n°:10 o SEC ID n°:11.

Fig. 1

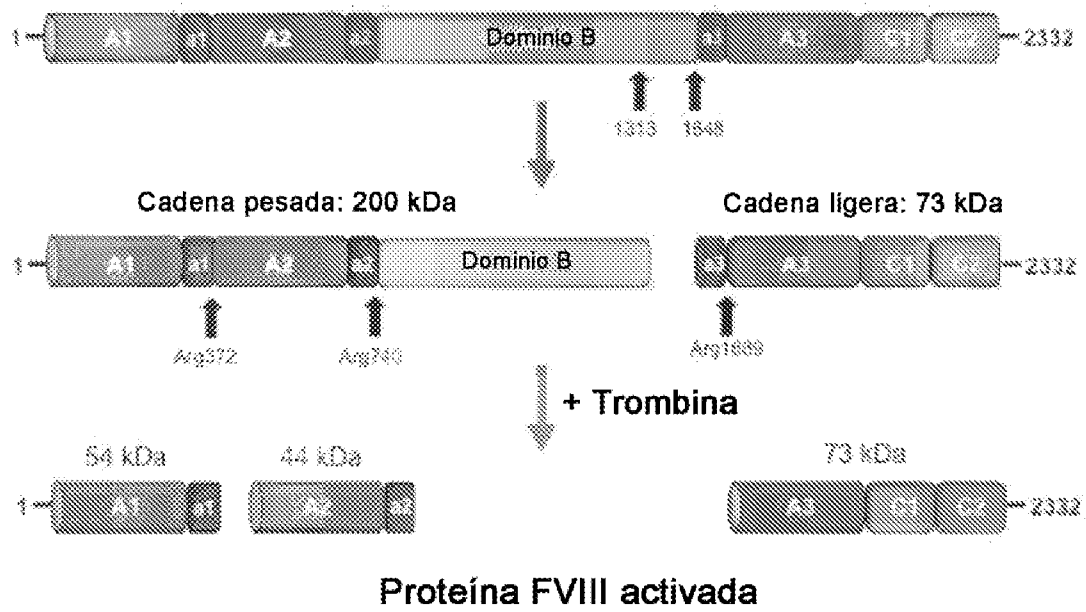


Fig. 2

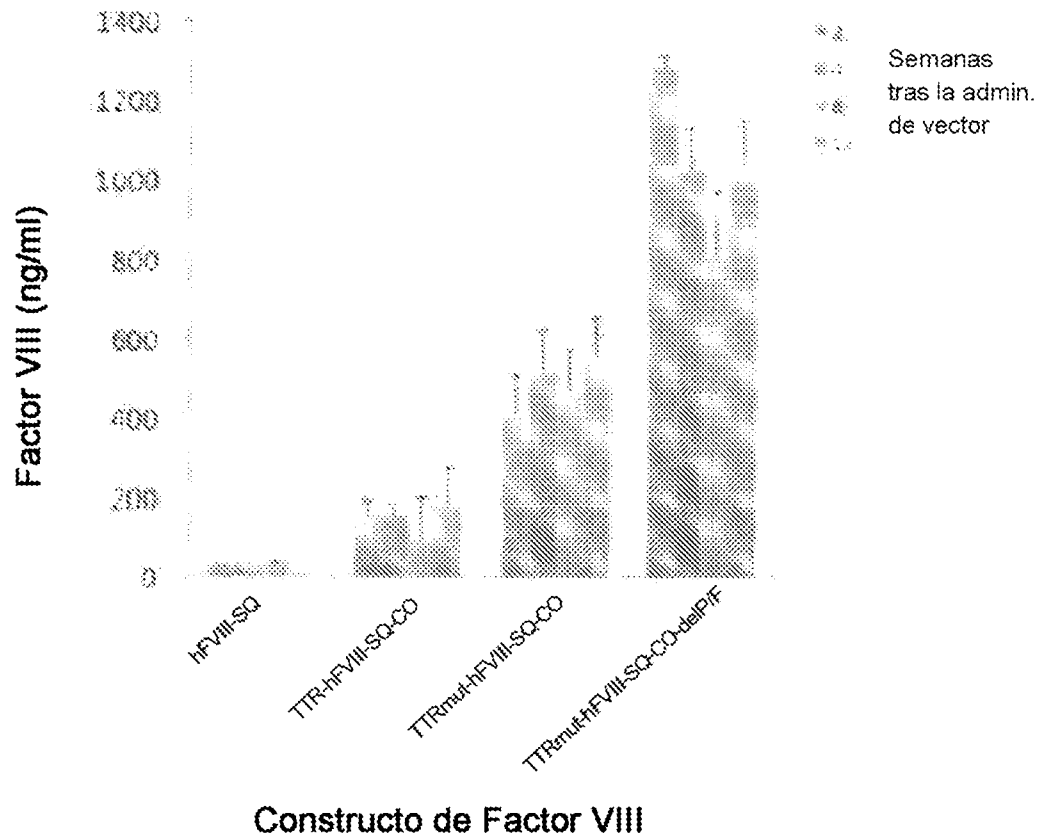




Fig. 3A

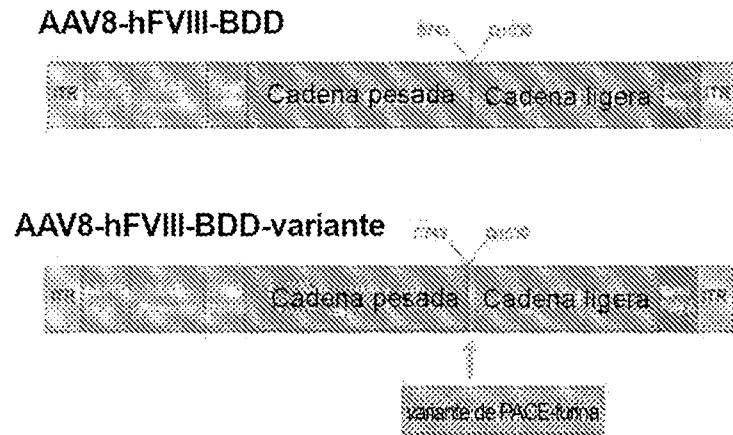


Fig. 3B

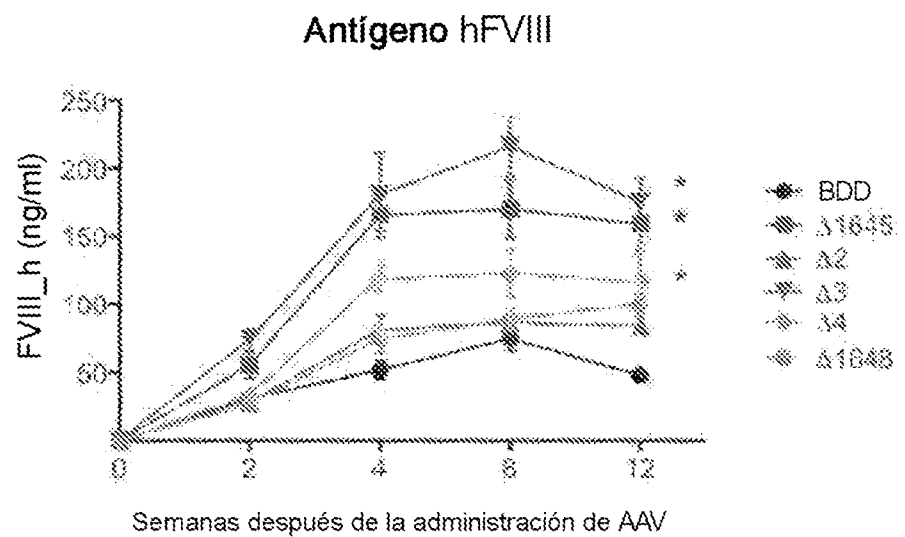


Fig. 4A

HCR/HAAT-hFVIIIwESQ



TTR-hFVIII CO



Fig. 4B

Administración en AAV de hFVIII en ratones con hemofilia A/cd4 KO

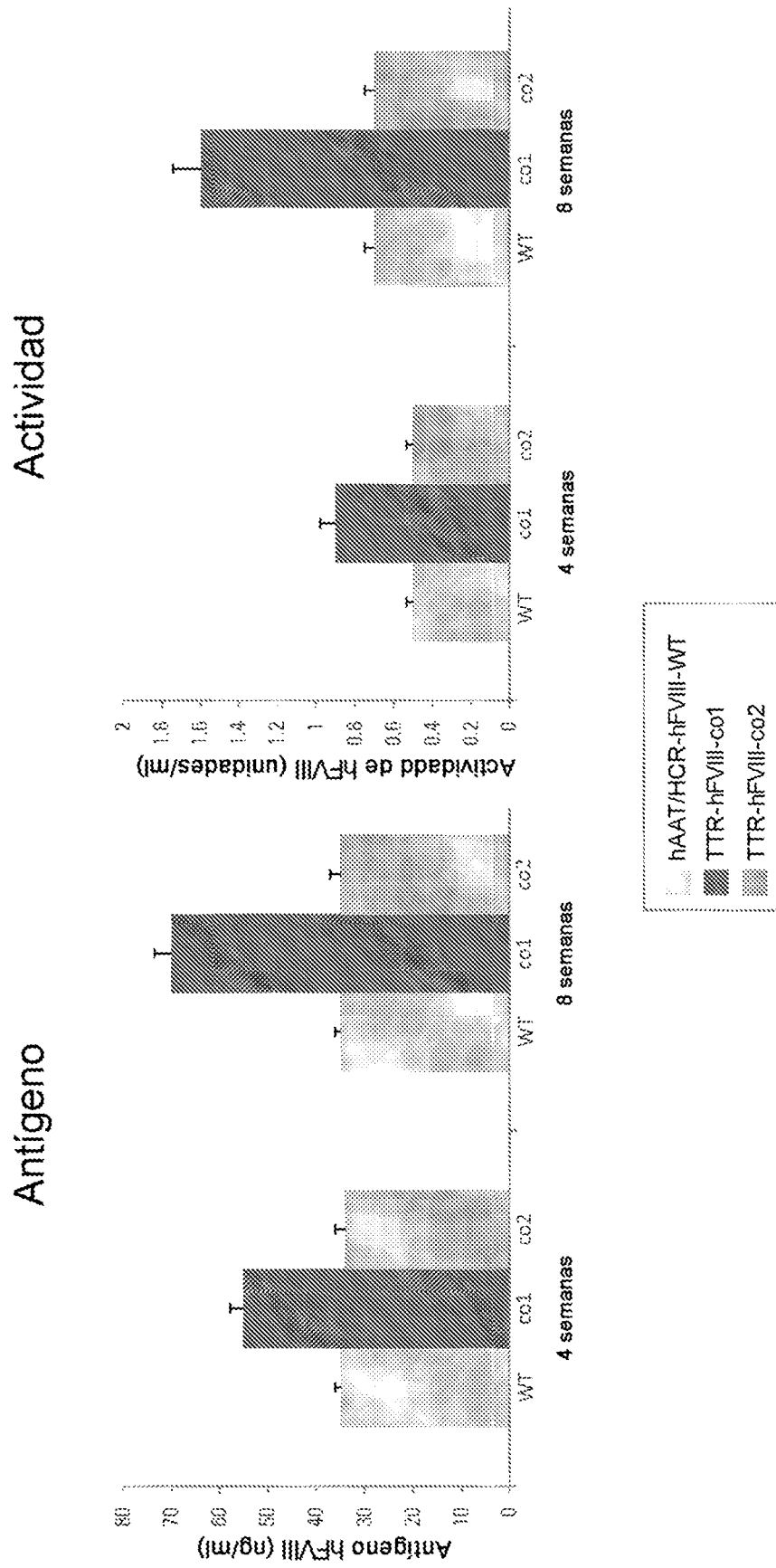


Fig. 4C

Administración en AAV de hFVIII en ratones con hemofilia A/CD4 KO

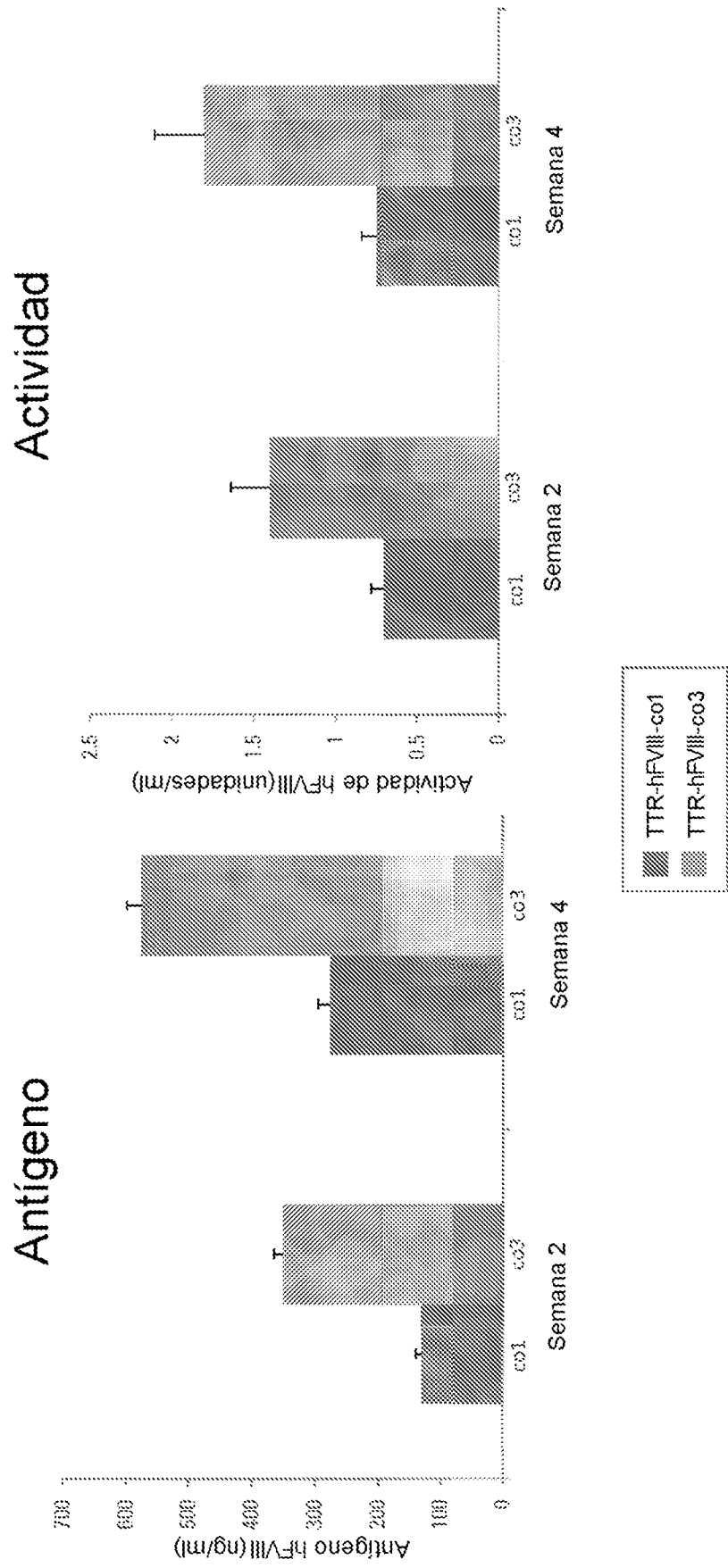


Fig. 5A

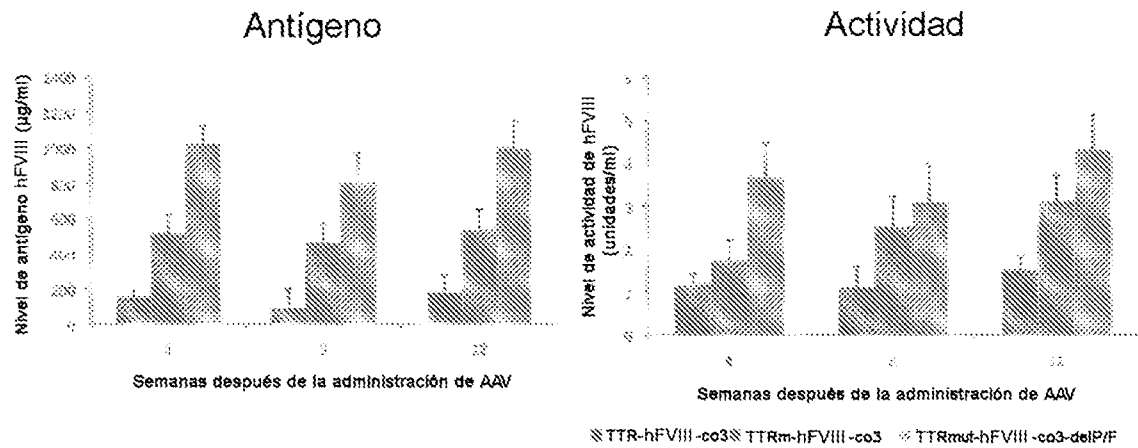


Fig. 5B

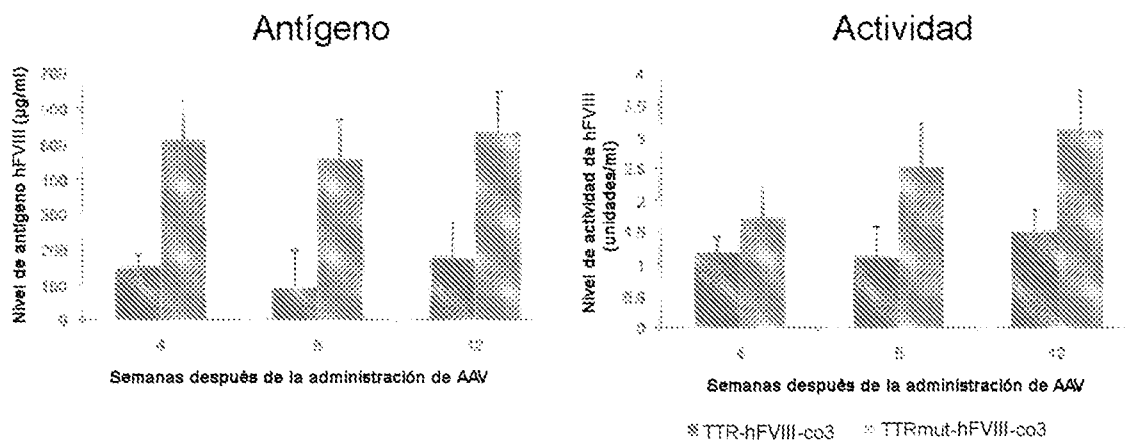




Fig. 6B

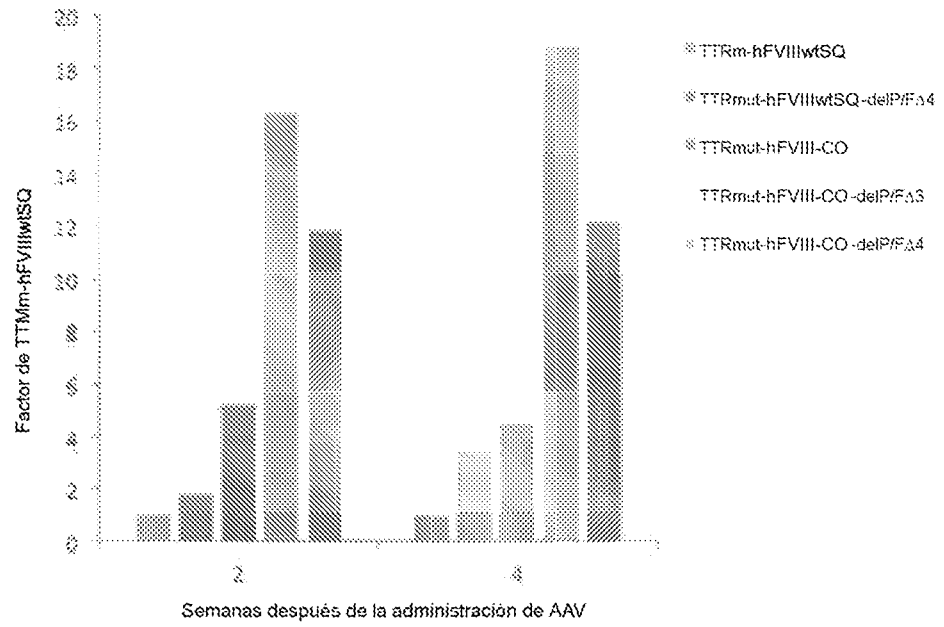


Fig. 7

