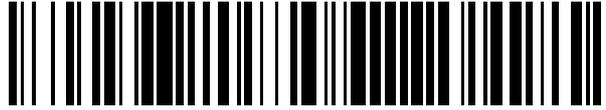


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 877**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2007 E 07798748 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2037892**

54 Título: **Genes de Factor VIII y Factor IX modificados y vectores para la terapia génica**

30 Prioridad:

19.06.2006 US 805171 P

01.09.2006 US 824338 P

26.09.2006 US 847337 P

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

18.05.2015

73 Titular/es:

ASKLEPIOS BIOPHARMACEUTICAL, INC.

(100.0%)

510 MEADOWMOUNT VILLAGE CIRCLE, 112

CHAPEL HILL, NC 27517, US

72 Inventor/es:

SAMULSKI, RICHARD J.

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 535 877 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

Genes de Factor VIII y Factor IX modificados y vectores para la terapia génica

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con genes de Factor IX modificados (FIX), vectores de ácidos nucleicos que incluyen los genes modificados, optimizado cápsidos virales incluyendo los genes modificados; también se divulgan métodos para el uso de los genes modificados en el tratamiento de deficiencias de FIX, tales como la hemofilia A y la hemofilia B.

Discusión de la técnica relacionada

10 La hemofilia es un trastorno de la sangre en el cual la sangre no coagula apropiadamente. La coagulación inadecuada causa sangrado excesivo cuando el hemofílico se lesiona. La hemofilia es un trastorno genético de la coagulación caracterizado por coagulación inadecuada y sangrado excesivo. Varios tipos de hemofilia hereditaria se diferencian por el factor de coagulación afectado. La hemofilia A es causada por una deficiencia en Factor VIII de coagulación sanguínea (FVIII). La hemofilia B es causada por una deficiencia del Factor IX (FIX) en la coagulación de la sangre.

15 La hemofilia B es un trastorno enlazado a X y la condición afecta a aproximadamente 1 en 30 000 hombres. En su forma más severa (aproximadamente del 60% de la población de la hemofilia B) la Hemofilia B puede ser fatal. Hemorragias espontáneas en las articulaciones y los músculos puede conducir a una discapacidad permanente.

20 La terapia génica ha sido propuesta propuesto como modalidad de tratamiento para complementar las deficiencias en los factores de coagulación en hemofílicos. Sin embargo, tal como en muchas áreas de la terapia génica, la teoría es mucho más expedita que la aplicación exitosa y efectiva. Se han encontrado muchas dificultades en los intentos anteriores para diseñar constructos de FVIII y FIX que son adecuados para el tratamiento de los humanos.

25 Por ejemplo, Manno et al. VAA2 informó administración mediada de FIX para el hígado de sujetos humanos en un estudio en Fase I dando como resultado la expresión de los niveles de FIX biológicamente activos (Manno et al., Blood, (2006), pp.). Connelly et al., informó que el tratamiento de ratones deficientes en FVIII con vectores adenovirales que codifican el FVIII humano dieron como resultado la expresión del FVIII humano biológicamente activo (Connelly et al., Blood, Vol. 91, No. 9 (1998), pp. 3273-3281). Sarker et al., informó que el uso del serotipo AAV8 en combinación con FVIII corrigió la actividad del FVIII en plasma en modelos de ratón (Sarker et al., Blood, Vol. 103, No. 4 (2004), pp. 1253-1260).

30 Tanto la US-B-6924365 como la WO-A-02/064799 se relacionan con el ARN mensajero optimizado y divulgan una secuencia sintética de ácido nucleico que codifica una proteína en donde el menos un codón no común o codón menos común es reemplazado por un codón común. La secuencia sintética de ácido nucleico puede incluir un tramo continuo de al menos 90 codones todos los cuales son codones comunes.

35 A.C. Nathwani, J.T. Gray, Catherine Y.C. Ng, Junfang Zhou, Yunyu Spence, Simon N. Waddington, Edward G.D. Tuddenham, Geoffrey Kemball-Cook, Jenny McIntosh, Mariette Boon-Spijker, Koen Mertens and Andrew M. Davidoff, "Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver", Blood, American Society Of Hematology, US, Vol. 107, No. 7, 1 April 2006, pages 2653-2661, anotan que la transducción con los vectores del virus adeno-asociado recombinante (AAV) está limitada por la necesidad de convertir su genoma de cadena sencilla (ss) a formas de doble cadena (ds) transcripcionalmente activas e informan que, para terapia génica de hemofilia B (HB) mediada por AAV, este obstáculo ha sido superado mediante la construcción de un casete de expresión del factor IX mini-humano (hFIX) restringido al hígado que puede ser empaquetado como dímeros complementarios dentro de partículas de AAV individuales. El análisis molecular de hígado murínico transducido con estos vectores auto-complementarios (sc) demostró rápida formación de genomas lineales de ds activos que persistieron de forma estable como círculos concatámeros o monoméricos, de tal manera que se informó de una mejora de 20 veces en la expresión de hFIX en ratones sobre vectores de ssAAV comparables.

45 Sin embargo, tal como en muchas áreas de la terapia génica, la teoría es mucho más expedita que la implementación exitosa y efectiva. Las dificultades en la implementación de técnicas de terapia génica incluyen problemas encontrados en el uso de virus como vectores de genes. Mientras que los virus son efectivos como vectores de genes, puesto que pueden ser utilizados para transducir células que conducen a la expresión de proteínas *in vivo*, las proteínas que recubren la partícula de virus pueden activar el sistema inmune del cuerpo.

Así, existe por lo tanto una necesidad de sistemas que expresen de manera eficiente la proteína objetivo en cantidad suficiente para reducir la dosis requerida del vector viral a niveles tolerables.

Resumen de la invención

5 La presente invención provee genes de Factor IX (FIX) modificado, vectores de ácidos nucleicos que incluyen los genes modificados, cápsidos virales optimizados incluyendo los genes modificados, y el uso de los genes modificados en el tratamiento de deficiencias de FIX, tales como la hemofilia A y la hemofilia B .

En un aspecto, la presente invención provee un gen optimizado aislado modificado para incrementar secuencias CG y reducir los motivos cis con respecto a un gen de FIX de tipo silvestre, en donde el gen optimizado para FIX tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.

10 En otro aspecto, la presente invención provee un vector de virus que comprende el gen optimizado del primer aspecto de la invención. El vector de virus es opcionalmente un vector de virus quimérico que comprende componentes de cápsidos seleccionados de cápsidos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV 5, AAV6, AAV 7 AAV8, AAV9, AAV 10, 11 AAV y AAV12.

Los vectores de virus de la presente invención pueden ser utilizados en métodos para tratar la hemofilia en un sujeto, comprendiendo los métodos:

15 a. proveer al menos un vector de virus recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un gen de FIX modificado; y

b. administrar el vector de virus recombinante al sujeto bajo condiciones de tal manera que dichas secuencias de nucleótidos de FIX son expresadas a un nivel que produce una cantidad terapéuticamente efectiva del FIX en el sujeto.

20 La transferencia de genes tiene uso potencial sustancial en la comprensión y el suministro de terapia para estados de enfermedad. Hay una serie de enfermedades hereditarias en las que se conocen y se han clonados los genes defectuosos. En general, los estados de las enfermedades anteriores caen dentro de dos clases: los estados de deficiencia, usualmente de enzimas, que generalmente son heredados de manera recesiva, y los estados de desequilibrio, que pueden involucrar proteínas reguladoras o estructurales, y que son típicamente heredados de manera dominante. Para las enfermedades de estado de deficiencia, la transferencia génica podría usarse para llevar un gen normal en los tejidos afectados para terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando mutaciones antisentido. Para estados de desequilibrio de enfermedades, la transferencia génica podría usarse para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que podría entonces utilizarse en esfuerzos para contrarrestar el estado de enfermedad. Así, los productos de la presente invención permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. Tal como se utiliza aquí, un estado de enfermedad se trata remediando parcial o totalmente la deficiencia o desequilibrio que causa la enfermedad o la hace más severa.

30 Así, las terapias para tratar la hemofilia pueden incluir: terapia génica basada en la administración de secuencia de nucleótidos que codifican genes de FIX optimizados.

En una realización, la presente invención provee un vector de virus quimérico que comprende componentes cápsidos seleccionados de los cápsidos de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV12 y que incluyen la secuencia del cápsido de AAV2 2.5 (SEQ ID. NO 17).

35 En un aspecto todavía adicional, la presente invención contempla un proceso para expresar un péptido FIX optimizado que comprende;

a. transfectar una célula con polinucleótido de SEQ ID NO: 7 que codifica el péptido FIX del mismo para producir una célula anfitriona transformada en donde el polinucleótido ha sido modificado para incrementar secuencias CG y reducir motivos cis con respecto a un gen de tipo silvestre; y

40 b. mantener la célula anfitriona transformada bajo condiciones biológicas suficientes para la expresión del péptido.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del gen de FIX optimizado de la presente invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hemofilia.

La presente invención también provee una composición farmacéutica que comprende una mezcla de un ácido nucleico aislado o purificado que comprende la secuencia de: SEQ ID NO: 7; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Otras características y ventajas de la invención y los antecedentes para la misma serán evidentes a partir de la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones siguientes.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la transducción de GFP *in vitro* de 530,000 células en HPMC 1×10^9 vg (genomas virales).

La figura 2 muestra la respuesta *in vitro* a la dosis en la proteína fluorescente verde del genoma de cadena sencilla y doble.

La Figura 3 muestra el nivel de expresión de la línea celular primaria y del músculo esquelético humano primario.

5 La Figura 4 muestra lisado *in vitro* en HPMC de APTT a partir de 1×10^9 vg /infección del título 24 horas después de la infección.

La Figura 5 muestra la expresión de lisado celular en HPMC *in vitro* del hFIX

La figura 6 muestra los datos *in vivo* de FIX del modelo R333Q 6 semanas después de la inyección para ssBNP2.5 vs. ssAAV2 (6A (1, 2, y 3)) y dsBNP2.5 vs. ssAAV2 (6B (1, 2 y 3)).

10 La Figura 7 muestra los resultados de la administración de la vena porta en C57Blk6 utilizando ssAAV2, dsBNP-1.1 y dsBNP2.5 que llevan el transgén de FIX.

La Figura 8 muestra la secuencia de codón de un hFIX optimizado.

La Figura 9 muestra la expresión *in vitro* de secuencia de codificación de hFIX tipo silvestre vs optimizado.

15 La Figura 10 muestra la expresión de hFIX y la comparación del virus Avigen (4×10^{11} vg/kg) vs dshFIX de AAV2 y hFIX optimizado.

La Figura 11 muestra la expresión de hFIX que compara el virus Aviagen (8×10^{10} vg/kg) vs dsFIX de AAV2 y hFIX optimizado.

La Figura 12 muestra el nivel del título de anticuerpos neutralizantes *in vitro* usando AAV1, AAV2 y BNP-2,5.

La Figura 13 muestra el nivel del título de anticuerpos neutralizantes *in vitro* usando AAV1, AAV2 y BNP-2.5.

20 La Figura 14 muestra un vector preferido de la presente invención.

La Figura 15 muestra la secuencia del vector (SEQ ID NO 1) de la figura 14 y que muestra mayúsculas Cursiva Negrita: ITR mutante izquierda (SEQ ID NO: 2); minúsculas Negrita: promotor TTR (SEQ ID NO: 3); minúsculas normal: secuencia de relleno (SEQ ID NO: 4); minúsculas Subrayado Negrita: intrón de MVM (SEQ ID NO: 5); minúsculas normal: secuencia de relleno (SEQ ID NO: 6); mayúsculas Subrayado Cursiva Negrita: ADNc de hFIX optimizado (SEQ ID NO: 7); Minúsculas en negrita: la hormona bovina polyA ((SEQ ID NO: 8) y en mayúsculas Cursiva Negrita: ITR derecha (SEQ ID NO: 9)

25

La Figura 16 muestra el porcentaje de codones de la secuencia que caen en una cierta clase de calidad relativa a la SEQ ID NO: 19 (no optimizado) y SEQ ID NO: 12 (optimizado).

La Figura 17 muestra la calidad potenciada del codón de SEQ ID NO: 12 con relación al no optimizado (SEQ ID NO: 19).

30 La Figura 18 muestra un incremento en el contenido de GC de 44% (SEQ ID NO: 19) no optimizado a 60% optimizado (SEQ ID NO: 12).

La Figura 19 muestra la calidad del codón con relación al SEQ ID NO: 15.

La Figura 20 muestra un gráfico de calidad codón para SEQ ID NO: 19.

La Figura 21 muestra el gráfico de contenido de GC para SEQ ID NO: 15 modificado que es 62%.

35 La Figura 22 muestran la secuencia de nucleótidos para el gen de FVIII modificado de SEQ ID NO: 10, incluyendo SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 (ADNc de FVIII modificado) y SEQ ID NO: 13.

La Figura 23 muestra la secuencia de nucleótidos para el gen de FVIII modificado de SEQ ID NO: 14, incluyendo SEQ ID NO: 15 (ADNc de FVIII modificado) y SEQ ID NO: 16.

La Figura 24 muestra la comparación en contenido de CG entre la secuencia de FIX de tipo silvestre (SEQ ID NO: 18) (Línea de consulta en Blast) y la secuencia optimizada (SEC ID NO: 7) Línea del asunto en Blast) de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el significado comúnmente entendido por una persona de experiencia normal en la técnica a la cual pertenece esta invención. La terminología utilizada aquí es con el propósito de describir solamente realizaciones particulares y no pretenden ser limitantes de la invención. Tal como se utiliza en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" también pretenden incluir las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Los siguientes términos tienen los significados dados:

"AAV Cap" significa proteínas Cap de AAV, VP1, VP2 y VP3 y análogos de las mismas.

"AAV Rep" significa proteínas Rep de AAV y análogos de las mismas.

"AAV TR" significa una secuencia palindrómica, que comprende secuencias complementarias en su mayoría, dispuestas simétricamente, e incluye análogos de TRs de AAV nativos y análogos de los mismos.

15 "Biológicamente efectivo" con respecto a una cantidad de un vector viral es una cantidad que es suficiente para dar como resultado una infección (o transducción) y expresión del transgén en una célula objetivo.

Los "motivos cis" incluyen secuencias conservadas tales como los encontrados en o cerca de los terminales de la secuencia genómica y reconocidos para la iniciación de la replicación; promotores crípticos o secuencias en las posiciones internas probablemente utilizados para la iniciación o terminación de la transcripción.

20 "Quimérico" significa, con respecto a un cápsido viral o partícula, que el cápsido o partícula incluye secuencias de diferentes parvovirus, preferiblemente diferentes serotipos de AAV, como se describe en Rabinowitz et al., Patente de Estados Unidos 6,491,907, titulada "Recombinant parvovirus vectors and method of making", concedida el 10 de diciembre de 2002, cuya divulgación se incorpora aquí en su totalidad como referencia. Un cápsido viral quimérico particularmente preferido es el cápsido de AAV2.5, que tiene la secuencia del cápsido de AAV2 con las siguientes mutaciones: 263 Q → A; inserción T de 265; 705 N → A; 708 V → A; y 716 T → N. en donde la secuencia de nucleótidos que expresa tales cápsidos se define como SEQ ID NO: 17. Cápsidos virales quiméricos preferidos adicionales se describen en la Solicitud PCT No. PCT/US07/01668, cuya divulgación se incorpora aquí en su totalidad como referencia.

30 "Flanqueado," con respecto a una secuencia que está flanqueada por otros elementos, indica la presencia de uno o más de los elementos que flanquean corriente arriba y/o corriente abajo, esto es, 5' y/o 3', con respecto a la secuencia. El término "flanqueado" no pretende indicar que las secuencias son necesariamente contiguas. Por ejemplo, puede haber secuencias interpuestas entre el ácido nucleico que codifica el transgén y un elemento de flaqueo. Una secuencia (por ejemplo, un transgén) que está "flanqueada" por otros dos elementos (por ejemplo, TRs), indica que un elemento está localizado en 5' hacia la secuencia y el otro está situado en 3' hacia la secuencia; sin embargo, puede haber secuencias de intervención entre ellos.

35 "Polinucleótido" significa una secuencia de nucleótidos conectados por enlaces fosfodiéster. Los polinucleótidos se presentan aquí en la dirección desde la dirección 5' hasta la 3'. Un polinucleótido de la presente invención puede ser una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) o molécula de ácido ribonucleico (ARN). Cuando un polinucleótido es una molécula de ADN, esa molécula puede ser un gen o una molécula de ADNc. Las bases de nucleótidos se indican aquí por un código de una letra individual: adenina (a), guanina (G), timina (T), citosina (C), inosina (I) y uracilo (U). Un polinucleótido de la presente invención se puede preparar usando técnicas estándar bien conocidas por un experto en la técnica.

"Transducción" de una célula por un virus significa que hay transferencia de ADN o ARN de la partícula de virus a la célula.

"Transfección" de una célula significa que el material genético es introducido en una célula con el propósito de la modificación genética de la célula. La transfección puede ser lograda mediante una variedad de medios conocidos en la técnica, tales como transducción o electroporación.

45 "Polipéptido" abarca tanto péptidos como proteínas, a menos que se indique otra cosa.

- 5 "Transgén" se utiliza en un sentido amplio para significar cualquier secuencia de nucleótidos heterocigotos incorporada en un vector viral para la expresión en una célula objetivo y secuencias de control de expresión asociadas, tales como promotores. Es apreciado por los expertos en la técnica que las secuencias de control de expresión serán seleccionadas basándose en la capacidad para promover la expresión del transgén en la célula objetivo. Un ejemplo de un transgén es un ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico.
- "Vector", significa un plásmido o virus recombinante que comprende un polinucleótido que se introduce en una célula anfitriona, bien sea *in vitro* o *in vivo*.
- 10 "Recombinante" significa una entidad genética distinta de la que generalmente se encuentran en la naturaleza. Tal como se aplica a un polinucleótido o gen, esto significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción y/o ligazón, y otros procedimientos que dan como resultado la producción de una construcción que es distinta de un polinucleótido encontrado en la naturaleza.
- 15 "Homología sustancial" o "similitud sustancial", significa, cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando está óptimamente alineado con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 95 a 99% de la secuencia.
- "Vector viral recombinante" significa un vector polinucleótido recombinante que comprende una o más secuencias heterólogas (esto es, la secuencia de polinucleótido de origen no viral). En el caso de vectores de parvovirus recombinantes, el polinucleótido recombinante está flanqueado por al menos uno, preferiblemente dos, secuencias repetidas en terminales invertidas (ITRs).
- 20 "Serotipo" con respecto al vector o el cápsido del virus, está definido por un perfil inmunológico distinto basado en las secuencias de la proteína del cápsido y la estructura del cápsido.
- "Péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan de manera intercambiable para referirse a un polímero de secuencia de al menos dos aminoácidos enlazados covalentemente mediante un enlace amida.
- 25 "Homólogo" usado con referencia a péptidos, se refiere a la similitud de secuencia de aminoácido entre dos péptidos. Cuando una posición de aminoácido en ambos de los péptidos está ocupada por aminoácidos idénticos, que son homólogas en esa posición. Así por "sustancialmente homóloga" significa una secuencia de aminoácidos que es en gran medida, pero no completamente, homóloga, y que retiene la mayor parte o la totalidad de la actividad como la secuencia a la que es homóloga. Tal como se usa aquí, "sustancialmente homóloga", significa que una secuencia es al menos 50% idéntica, y preferiblemente al menos 75% y más preferiblemente 95% de homología con el péptido de referencia. Están incluidas las modificaciones adicionales de la secuencia de péptidos, tales como variaciones menores, eliminaciones, sustituciones o derivaciones de la secuencia de aminoácidos de las secuencias divulgadas aquí, siempre que el péptido tenga sustancialmente la misma actividad o función que los péptidos no modificados. Los derivados de un aminoácido pueden incluir, pero no se limitan a trifluoroleucina, hexafluoroleucina, 5,5,5-trifluoroisoleucina, 4,4,4-trifluorovalina, p-fluorofenilalanina, o-fluorotirosina, m-fluorotirosina, 2,3-difluorotirosina, 4-fluorohistidina, 2-fluorohistidina, 2,4-difluorohistidina, fluoroprolina, fluoroprolina, 4-hidroxiprolina, selenometionina, telurometionina, selenocisteína, selenatriptófano, 4-aminotriptófano, 5-aminotriptófano, 5-hidroxitriptófano, 7-azatriptófano, 4-fluorotriptófano, 5-fluorotriptófano, 6-fluorotriptófano, homoalilglicina, homopropargilglicina, 2- butinilglicina, cis-crotilglicina, alilglicina, deshidroleucina, deshidroprolina, ácido 2-amino-3- metil-4-pentenoico, azidohomoalanina, azidoalanina, azidonorleucina, p-etinilfenilalanina, p-azidofenilalanina, p-bromofenilalanina, p-acetilfenilalanina y benzofuranilalanina. De manera notable, un péptido modificado retendrá la actividad o función asociada con el péptido no modificado, el péptido modificado tendrá generalmente una secuencia de aminoácidos "sustancialmente homóloga" con la secuencia de aminoácidos de la secuencia no modificada.
- 30
- 35
- 40
- 45 La invención provee ácidos nucleicos modificado que codifican el FIX. La invención también provee constructos de ácidos nucleicos que incluyen como parte de sus secuencias el ácido nucleico modificado que codifica el FIX. Se divulgan plásmidos y/u otros vectores que incluyen la secuencia de FIX modificada junto con otros elementos, tales como elementos reguladores, junto con un vehículo de administración génica empaquetada, tal como un cápsido viral, incluyendo la secuencia de FIX modificada. La invención también incluye métodos de expresión de FIX mediante la administración de la secuencia modificada en una célula junto con los elementos requeridos para promover la expresión en la célula. También se describen métodos de terapia génica en que se administra la secuencia de FIX modificada a un sujeto, por ejemplo, como un componente de un vector y/o empaquetado como un componente de un vehículo de administración de genes virales. El tratamiento puede, por ejemplo, ser afectado para potenciar la coagulación en un sujeto y/o para tratar una deficiencia de FIX en el sujeto. Cada uno de estos temas se discute adicionalmente en las secciones que siguen.
- 50

Ácido nucleico modificado para la expresión de FIX

La invención provee una secuencia modificada que codifica el FIX. La secuencia modificada incluye la secuencia nativa de FIX incluyendo una o más modificaciones de optimización. Los ejemplos de modificaciones de optimización incluyen la eliminación de uno o más motivos que actúan en cis y la introducción de una o más secuencias de Kozak de tal manera que, por ejemplo, se eliminan uno o más motivos que actúan en cis y se introducen una o más secuencias de Kozak.

5 Ejemplos de motivos que actúan en cis que pueden ser eliminados incluyen cajas TATA internas; sitios chi; sitios de entrada ribosómicas; tramos de secuencias ricas en AT y/o ricas en GC; elementos de la secuencia ARE, INS, y/o CRS; secuencias repetidas y/o estructuras secundarias de ARN; (críptico) sitios donantes y/o aceptores de empalme, puntos de ramificación; y Sall. Preferiblemente, se eliminan el contenido de GC es potenciado en relación al Factor FIX de tipo silvestre y uno o más
10 motivos que actúan en cis. El contenido de GC es preferiblemente al menos 30 a 90% mayor, lo más preferiblemente 40% mayor, que el gen de tipo silvestre. Adicionalmente, el índice de adaptación del codón es preferiblemente > 75, > 80, > 85, > 90, o > 95.

La secuencia de FIX modificado también puede incluir sitios de restricción flanqueantes para facilitar la subclonación en el vector de expresión.

15 La invención incluye fragmentos de la secuencia de SEQ ID NO 7 que codifican un fragmento funcionalmente activo de FIX. Además, la invención incluye versiones modificadas de SEQ ID NO: 7, que codifican un análogo de FIX que tiene actividad de coagulación de FIX.

La invención incluye un vector de ácido nucleico que incluye la secuencia de FIX modificada y diversos elementos reguladores. La naturaleza precisa de elementos reguladores útiles para la expresión génica variará de organismo a organismo. En general, incluyen un promotor que dirige la iniciación de la transcripción del ARN en la célula de interés. El
20 promotor puede ser constitutivo o regulado. Los promotores constitutivos son aquellos que causan que un gen enlazado operativamente sea expresado esencialmente en todo momento. Los promotores regulados son aquellos que pueden ser activados o desactivados. Los promotores regulados incluyen promotores inducibles, que están usualmente "apagados", pero que pueden ser inducidos a "encenderse" y "promotores "reprimibles", que están usualmente "encendidos", pero que pueden ser "apagados". Muchos reguladores diferentes son conocidos, incluyendo la temperatura, hormonas, citoquinas, metales pesados y proteínas reguladoras. Las distinciones no son absolutas; un promotor constitutivo puede ser
25 frecuentemente regulado hasta cierto grado. En algunos casos, se puede utilizar una ruta endógena para proveer regulación de la expresión transgénica, por ejemplo, utilizando un promotor que es subregulado naturalmente cuando mejora la condición patológica.

30 Ejemplos de promotores adecuados incluyen promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal de adenovirus; promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor del virus sincicial respiratorio; el promotor del Virus del Sarcoma de Rous (RSV); el promotor de albúmina; promotores inducibles, tales como el promotor del Virus del Tumor Mamario de Ratón (MMTV); el promotor de la metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor α -1-antitripsina; el promotor de antígeno de superficie de la hepatitis B; el promotor de la transferrina; el promotor de la apolipoproteína A-1; promotores de FVIII humanos; y promotores de FIX humanos. El promotor puede ser un
35 promotor específico de tejido, tal como el promotor de albúmina de ratón, que se activa en las células del hígado, así como el promotor de transtiretina (TTR).

Secuencia empaquetada de FIX modificado

40 La secuencia de FIX modificado también puede ser provista como un componente de un vector viral empaquetado. En general, los vectores virales empaquetados incluyen un vector viral empaquetado en un cápsido. Los vectores virales y los cápsidos virales se discuten en las secciones siguientes.

Vector viral

45 El componente de vector viral de los vectores virales empaquetados producidos de acuerdo con los métodos divulgados incluye al menos una secuencia de FIX modificado y secuencias de control de expresión asociadas para controlar la expresión de la secuencia de FIX modificado. El vector viral puede incluir funciones que actúan en cis suficientes para permitir la persistencia como formas episomales o por mecanismos que incluyen la integración de la secuencia de FIX modificado en el genoma de una célula objetivo.

50 El vector viral puede incluir una porción de un genoma de parvovirus, tal como un genoma de AAV con rep y cap eliminados y sustituidos por la secuencia de hFIX modificado y sus secuencias de control de expresión asociadas. La secuencia de FIX modificada se inserta típicamente adyacente a uno o dos elementos de TRs de AAV o TR adecuados (esto es, flanqueado por) para la replicación viral; Xiao et al, J Virol 71; 2: 941-948 (1997),. en lugar de los ORF rep y cap virales. También

pueden ser incluidas otras secuencias reguladoras adecuadas para uso en facilitar la expresión específica de tejido de la secuencia de hFIX modificado en la célula objetivo.

El vector viral puede ser cualquier constructo de ácido nucleico adecuado, tal como un constructo de ADN o ARN y puede ser de cadena sencilla, de doble cadena, o dúplex.

5 Cápsido viral

10 El componente cápsido viral de los vectores virales empaquetados puede ser un cápsido de parvovirus, tales como cápsidos de AAV Cap y quiméricos. Ejemplos de componentes adecuados del cápsido viral de parvovirus son componentes del cápsido de la familia Parvoviridae, tales como un parvovirus autónomo o un Dependovirus. Por ejemplo, el cápsido viral puede ser un cápsido de AAV (por ejemplo, cápsidos de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 AAV 9, AAV10, AAV11 o AAV12; un experto en la técnica sabrá que hay probablemente otras variantes aún no identificadas que realizan la misma o similar función), o puede incluir componentes de dos o más cápsidos de AAV. Se puede proveer un complemento total de proteínas de AAV Cap incluye VP1, VP2 y VP3. El ORF que comprende secuencias de nucleótidos que codifican proteínas del cápsido AAV VP puede comprender menos de un complemento completo de proteínas de AAV Cap o el complemento completo de las proteínas de AAV Cap.

15 Una o más de las proteínas AAV Cap puede ser una proteína quimérica, incluyendo secuencias AAV Caps de aminoácidos a partir de dos o más virus, preferiblemente dos o más AAV, como se describe en Rabinowitz et al., Patente de los Estados Unidos 6,491,907, titulada "Recombinant parvovirus vectors and method of making", otorgada el 10 de diciembre de 2002. Por ejemplo, el cápsido del virus quimérico puede incluir una proteína o subunidad de AAV1 Cap y al menos una AAV2 Cap o subunidad. El cápsido quimérico puede incluir por ejemplo, un cápsido de AAV con una o más subunidades de B19 Cap, por ejemplo, una proteína o subunidad de AAV Cap puede ser reemplazada por una proteína o subunidad de B19 Cap. Por ejemplo, la subunidad Vp3 del cápsido de AAV puede ser reemplazada por la subunidad Vp2 de B19.

Producción de vector viral empaquetado

25 Se pueden cultivar células de empaque para producir vectores virales empaquetados de la invención. Las células de empaque generalmente incluyen células con funciones del vector viral heterólogo (1), funciones de empaque (2), y funciones de ayuda (3). Cada una de estas funciones de los componentes se discute en las secciones siguientes.

Funciones de vector viral

30 Las células de empaque incluyen funciones de vector viral, junto con funciones de empaque y de vector. Las funciones de vector viral incluyen típicamente una porción de un genoma de parvovirus, tal como un genoma de AAV, con rep y cap eliminados y reemplazados por la secuencia de FIX modificado y sus secuencias de control de expresión asociadas. Las funciones de vector viral incluyen secuencias de control de expresión suficientes para dar como resultado la replicación del vector viral para el empaque. Típicamente, el vector viral incluye una porción de un genoma de parvovirus, tal como un genoma de AAV con rep y cap eliminados y reemplazados por el transgén y sus secuencias de control de expresión asociadas. El transgén está típicamente flanqueado por dos TRs de AAV, en lugar de las ORF de rep y cap virales eliminadas. Se incluyen las secuencias de control de expresión apropiadas, tal como un promotor específico de tejido y otras secuencias reguladoras adecuadas para usar en facilitar la expresión específica de tejido del transgén en la célula objetivo. El transgén es típicamente una secuencia de ácido nucleico que puede expresarse para producir un polipéptido terapéutico o un polipéptido marcador. El vector viral puede ser cualquier constructo de ácido nucleico adecuado, tal como un constructo de ADN o ARN y puede ser de cadena sencilla, de doble cadena, o dúplex.

40 Las funciones de vectores virales pueden ser provistos de manera adecuada como plantillas de vector dúplex, tal como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2004/0029106 para Samulski et al. Los vectores dúplex son polinucleótidos diméricos auto-complementarios (sc) (típicamente, ADN). Por ejemplo, el ADN de los vectores dúplex puede seleccionarse con el fin de formar una estructura en horquilla de doble cadena debido al apareamiento de bases intracadenas. Ambas cadenas de los vectores de ADN dúplex pueden ser empaquetados dentro de un cápsido viral. El vector dúplex provee una función comparable a vectores de virus de ADN de doble cadena y puede aliviar la necesidad de la célula objetivo para sintetizar ADN complementario al genoma de cadena sencilla convertido en cápsido normalmente por el virus.

45 Los TR(s) (resolubles y no resolubles) seleccionados para usar en los vectores virales son preferiblemente secuencias de AAV, con los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, siendo preferido. Los TRs de AAV resolubles no necesitan tener una secuencia TR de tipo silvestre (por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre puede ser alterada por mutaciones de inserción, eliminación, truncamiento o de sentido equivocado), siempre y cuando el TR medie las funciones deseadas, por ejemplo, el empaquetado de virus, integración, y/o rescate de provirus, y similares. Las TRs pueden ser secuencias sintéticas que

funcionan como repeticiones de terminales invertidas de AAV, tales como la "secuencia D doble" como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,478,745 a Samulski et al. Típicamente, pero no necesariamente, las TRs son del mismo parvovirus, por ejemplo, ambas secuencias de TR son de AAV2

5 Las funciones de empaque incluyen componentes del cápsido. Los componentes del cápsido son preferiblemente de un cápsido parvoviral, tales como un cápsido de AAV o una función del cápsido de AAV quimérica. Ejemplos de componentes adecuados del cápsido viral de parvovirus son componentes del cápsido viral de la familia Parvoviridae, tales como un parvovirus autónomo o un Dependovirus. Por ejemplo, los componentes del cápsido se pueden seleccionar de cápsidos de AAV, por ejemplo, AAV1- AAV 12 y otros cápsidos novedosas, como aún no identificadas o a partir de fuentes de primates no humanos. Los componentes del cápsido pueden incluir componentes de dos o más cápsidos de AAV.

10 Una o más de las proteínas del cápsido de VP puede ser una proteína quimérica, que comprende secuencias de aminoácidos de dos o más virus, preferiblemente dos o más AAVs, como se describe en Rabinowitz et al., Patente de los Estados Unidos 6,491,907, titulada " Recombinant parvovirus vectors and method of making", otorgada el 10 de diciembre de 2002.

15 Por ejemplo, el cápsido de virus quimérico puede incluir una región del cápsido de un virus adeno-asociado y al menos una región del cápsido de un virus B19. El cápsido quimérico puede incluir por ejemplo, un cápsido de AAV con uno o más subunidades del cápsido B19, por ejemplo, una subunidad del cápsido de AAV puede ser reemplazado por una subunidad del cápsido B19. Por ejemplo, en una realización preferida, la subunidad VP1, VP2 o VP3 del cápsido de AAV puede ser reemplazado por la subunidad VP1, VP2 o VP3 de B19. Como otro ejemplo, el cápsido quimérico puede incluir un cápsido tipo 2 de AAV en la que la subunidad VP1 tipo 2 ha sido reemplazada por la subunidad VP1 de un cápsido tipo 1, 3, 4, 5, o 6 de AAV, preferiblemente un cápsido tipo 3, 4, o 5. Alternativamente, el parvovirus quimérico tiene un cápsido tipo 2 de AAV en la que la subunidad VP2 tipo 2 ha sido reemplazada por la subunidad VP2 de un cápsido tipo 1, 3, 4, 5, o 6 de AAV, preferiblemente un cápsido tipo 3, 4, o 5. De la misma forma, se prefieren los parvovirus quiméricos en los que la subunidad VP3 de un AAV tipo 1, 3, 4, 5 o 6 (más preferiblemente, tipo 3, 4 o 5) es sustituida por la subunidad VP3 de un cápsido tipo 2 de AAV. Como una alternativa adicional, se prefieren los parvovirus quiméricos en los que dos de las subunidades tipo 2 de AAV son reemplazadas por las subunidades de un AAV de un serotipo diferente (por ejemplo, AAV tipo 1, 3, 4, 5 o 6). De acuerdo con esta realización, en los parvovirus quiméricos de ejemplo, las subunidades VP1 y VP2, o VP1 y VP3, o VP2 y VP3 de un cápsido tipo 2 de AAV son reemplazadas por las subunidades correspondientes de un AAV de un serotipo diferente (por ejemplo, AAV de tipo 1, 3, 4, 5 o 6). De la misma forma, en otras realizaciones preferidas, el parvovirus quimérico tiene un cápsido de tipo de 1, 3, 4, 5 o 6 de AAV (preferiblemente el cápsido de tipo 2, 3 o 5) en la que uno o dos subunidades han sido reemplazadas con los de un AAV de un serotipo diferente, como se describió anteriormente para AAV de tipo 2.

35 El vector viral empaquetado incluye generalmente la secuencia de FIX modificado y las secuencias de control de expresión flanqueadas por elementos de TR suficientes para dar como resultado el empaque del ADN del vector y la expresión subsecuente de la secuencia de FIX modificado en la célula transducida. Las funciones del vector viral pueden, por ejemplo, ser suministrados a la célula como un componente de un plásmido o un amplicón. Las funciones del vector viral pueden existir de extracromosómicamente dentro de la línea celular y/o pueden estar integradas en el ADN cromosómico de las células.

40 Se puede emplear cualquier método para introducir la secuencia de nucleótidos que lleva las funciones del vector viral en un anfitrión celular para replicación y empaque, incluyendo, pero no limitado a, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, liposomas catiónicos o aniónicos y liposomas en combinación con una señal de localización nuclear. En realizaciones en donde las funciones del vector viral se proveen por transfección utilizando un vector de virus; se pueden usar métodos estándar para producir infección viral.

Funciones de empaquetado

45 Las funciones de empaque incluyen genes para la replicación y empaque del vector viral y. Así, por ejemplo, las funciones de empaque pueden incluir, según sea necesario, las funciones necesarias para la expresión génica viral, la replicación del vector viral, el rescate del vector viral desde el estado integrado, la expresión génica viral, y el empaque del vector viral en una partícula viral. Las funciones de empaque pueden ser suministradas juntas o por separado a la célula de empaque utilizando un constructo genético tal como un plásmido o un amplicón. Las funciones de empaque pueden existir extracromosómicamente dentro de la célula de empaque, pero se integran preferentemente en el ADN cromosómico de la célula. Los ejemplos incluyen genes que codifican proteínas de AAV Rep y Cap.

Funciones auxiliares

5 Las funciones auxiliares incluyen elementos de virus auxiliares necesarios para el establecer la infección activa de la célula de empaque, que se requiere para iniciar el empaque del vector viral. Los ejemplos incluyen funciones derivadas de adenovirus, baculovirus y/o virus herpes suficientes para dar como resultado en el empaque del vector viral. Por ejemplo, las funciones auxiliares de adenovirus incluirán típicamente componentes de adenovirus E1a, E1b, E2a, E4, y ARN de VA. Las funciones de empaque pueden ser suministradas por la infección de la célula de empaque con el virus requerido. Las funciones de empaque pueden ser suministradas juntas o por separado a la célula de empaque utilizando un constructo genético tal como un plásmido o un amplicón. Las funciones de empaque pueden existir extracromosómicamente dentro de la célula de empaque, pero se integran preferiblemente en el ADN cromosómico de la célula.

10 Se puede emplear cualquier función adecuada de virus auxiliar. Por ejemplo, cuando las células de empaque son células de insectos, los baculovirus pueden servir como un virus auxiliar. El virus herpes también puede ser utilizado como un virus auxiliar en los métodos de empaque de AAV. Los virus de herpes híbrido que codifican las proteínas de AAV Rep pueden facilitar ventajosamente para esquemas más escalables de producción de vector de AAV.

15 Se puede emplear cualquier método para introducir la secuencia de nucleótidos que lleva las funciones auxiliares en un anfitrión celular para replicación y empaque, incluyendo, pero no limitado a, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, liposomas catiónicos o aniónicos y liposomas en combinación con una señal de localización nuclear. En realizaciones en donde las funciones auxiliares se proveen por transfección utilizando un vector de virus o infección usando un virus auxiliar; se pueden usar métodos estándar para producir infección viral.

Célula de empaque

20 Cualquier célula permisiva o de empaque adecuada conocida en la técnica se puede emplear en la producción del vector viral empaquetado. Se prefieren las células de mamífero o células de insecto. Ejemplos de células útiles para la producción de células de empaque en la práctica de la invención incluyen, por ejemplo, las líneas celulares humanas, tales como células VERO, WI38, MRC5, A549, 293T, B-50 o cualesquier otras células HeLa, líneas celulares HepG2, SAOS-2, Huh7 y HT1080.

25 Las líneas celulares preferidas para uso como células de empaque son líneas celulares de insecto. Se puede utilizar de acuerdo con la presente invención cualquier célula de insecto que permita la replicación de AAV y que pueda mantenerse en cultivo. Los ejemplos incluyen *Spodoptera frugiperda*, tal como las líneas celulares Sf9 o Sf21, líneas celulares de *Drosophila* spp., o líneas celulares de mosquitos, por ejemplo, líneas celulares derivadas de *Aedes albopictus*. Una línea celular preferida es la línea celular Sf9 de *Spodoptera frugiperda*. Las siguientes referencias se incorporan aquí por sus enseñanzas que conciernen al uso de células de insecto para la expresión de polipéptidos heterólogos, métodos para introducir ácidos nucleicos en tales células, y métodos de mantenimiento de tales células en cultivo: *Methods in Molecular Biology*, ed. Richard, Humana Press, NJ (1995); O'Reilly et al., *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Oxford Univ. Press (1994); Samulski et al., *J. Vir.* 63:3822-8 (1989); Kajigaya et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 88: 4646-50 (1991); Ruffing et al., *J. Vir.* 66:6922-30 (1992); Kimbauer et al., *Vir.* 219:37-44 (1996); Zhao et al., *Vir.* 272:382-93 (2000); y Samulski et al., U.S. Pat. No. 6,204,059.

35 Durante la producción, las células de empaque generalmente incluyen una o más funciones del vector viral junto con funciones auxiliares y funciones de empaque suficientes para dar como resultado la replicación y el empaque del vector viral. Estas diversas funciones pueden ser suministradas juntas o por separado a la célula de empaque utilizando un constructo genético tal como un plásmido o un amplicón, y pueden existir extracromosómicamente dentro de la línea celular o integrada en los cromosomas de la célula.

40 Las células pueden ser suministradas con una cualquiera o más de las funciones establecidas ya incorporadas, por ejemplo, una línea celular con una o más funciones vectoriales incorporadas extracromosómicamente o integradas en el ADN cromosómico de la célula, una línea celular con una o más funciones de empaque incorporadas extracromosómicamente o integradas en el ADN cromosómico de la célula, o una línea celular con funciones auxiliares incorporadas extracromosómicamente o integradas en el ADN cromosómico de la célula.

45 Métodos de tratamiento

50 El gen de FIX modificado puede ser utilizado para la terapia génica de trastornos asociados al FIX, tales como hemofilia A o B. Un individuo puede estar en necesidad de terapia génica, puesto que, como resultado de una o más mutaciones en la región reguladora y/o la secuencia de codificación del gen de FIX, el FIX está expresado de manera inapropiada, por ejemplo, tiene una secuencia incorrecta de aminoácidos, o está expresado en los tejidos equivocados o en el momento equivocado, está subexpresado o sobreexpresado. El gen de FIX modificado puede ser utilizado como terapia génica para potenciar la coagulación en un sujeto en necesidad de potenciar la coagulación.

- Las células objetivo de los vectores de la presente invención son células capaces de expresar polipéptidos con actividad de FIX, tales como las del sistema hepático de un mamífero, células endoteliales y otras células con la maquinaria celular adecuada para procesar el precursor para producir proteína con actividad de FIX. En una realización, las células son células normales cultivadas *in vitro*. Las células objetivo pueden ser, por ejemplo, células humanas y células de otros mamíferos, especialmente primates no humanos y mamíferos del orden Rodenta (ratones, ratas, conejos y hámsteres), Carnivora (gatos y perros) y Artiodactyla (vacas, cerdos, ovejas, cabras y caballos). Cualquier tipo de célula puede ser direccionada. En algunos casos, cualquier tipo de célula puede ser direccionada excepto las células musculares.
- En realizaciones particulares, la presente invención provee una composición farmacéutica que comprende un vector de la presente invención que incluye un gen modificado de FIX en un portador farmacéuticamente aceptable y/u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, diluyentes, etc. Para inyección, el vehículo será típicamente un líquido. Para otros métodos de administración, el vehículo puede ser bien sea sólido o líquido. Para la administración por inhalación, el vehículo será respirable, y estará preferiblemente en forma de partículas sólidas o líquidas. Como medio de inyección, se prefiere usar agua que contiene los aditivos habituales para soluciones de inyección, tales como agentes estabilizantes, sales o solución salina, y/o reguladores.
- Vehículos farmacéuticamente aceptables de ejemplo incluyen, agua estéril, libre de pirógenos y estéril, solución salina estéril regulada con fosfato libre de pirógenos. Vehículos fisiológicamente aceptables incluyen vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son aquellos que no son biológicamente o de otro modo indeseables, esto es, el material puede administrarse a un sujeto sin causar efectos biológicos indeseables que superen los efectos biológicos ventajosos de la material.
- Una composición farmacéutica puede ser utilizada, por ejemplo, en la transfección de una célula *ex vivo* o en la administración de un vector viral o célula directamente a un sujeto.
- Vectores de virus recombinantes que comprenden el gen modificado de FIX son administrados preferiblemente a la célula en una cantidad biológicamente efectiva. Si el vector de virus es administrado a una célula *in vivo* (por ejemplo, el virus es administrado a un sujeto como se describe a continuación), una cantidad biológicamente efectiva del vector del virus es una cantidad que es suficiente para dar como resultado la transducción y expresión del transgén en una célula objetivo.
- Las células transducidas con un vector viral son administradas preferiblemente al sujeto en una "cantidad terapéuticamente efectiva" en combinación con un vehículo farmacéutico. Los expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando se provea algún beneficio al sujeto.
- Las dosificaciones de las células para administrar a un sujeto variarán con la edad, la condición y la especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico que se expresa por la célula, el modo de administración, y similares. Típicamente, al menos aproximadamente de 102 a aproximadamente 108, preferiblemente de aproximadamente 103 a aproximadamente 108 células, serán administradas por dosis. Preferiblemente, las células se administrarán en una cantidad terapéuticamente efectiva.
- El vector que contiene genes modificados puede ser usado en métodos para tratar sujetos *in vivo*. La administración del vector a un sujeto humano o un animal en necesidad del mismo puede ser por cualquier medio conocido en la técnica para la administración de vectores de virus.
- Ejemplos de modos de administración incluyen la administración rectal, transmucosa, tópica, transdérmica, por inhalación, parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular e intraarticular), y similares, así como inyección directa al tejido u órganos, alternativamente, inyección intratecal, intramuscular directa, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, o intraoculares. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, bien sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Alternativamente, se puede administrar el virus de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación sostenida.
- En otros métodos, el vector de la invención que comprende el gen de FIX modificado es administrado por vía intramuscular, más preferiblemente por inyección intramuscular o por administración local. Los vectores divulgados aquí pueden ser administrados a los pulmones de un sujeto por cualquier medio adecuado, pero son administrados preferiblemente administrando una suspensión en aerosol de partículas respirables compuestas por los vectores de parvovirus de la invención, los cuales inhala el sujeto. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores de parvovirus de la invención pueden ser producidos por cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador de aerosol impulsado por presión o un nebulizador ultrasónico, tal como es conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4,501,729.

Las dosificaciones del vector de virus de la invención con el gen de FIX modificado dependerán del modo de administración, la enfermedad o condición a ser tratada, la condición individual del sujeto, el vector viral en particular y el gen a ser administrado, y pueden ser determinados de una de manera rutinaria. Las dosis de ejemplo para lograr efectos terapéuticos son titulaciones de virus de al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 1015 unidades de transducción o más, preferiblemente de aproximadamente 10^8 - 10^{13} unidades de transducción, aún más preferiblemente 10^{12} unidades de transducción.

Los genes de FIX modificados pueden ser administrados como componentes de una molécula de ADN que tiene elementos reguladores apropiados para la expresión en las células objetivo. Los genes de FIX modificados pueden ser administrados como componentes de plásmidos virales, tales como vectores de rAAV. Las partículas virales pueden ser administradas como partículas virales solas, ya sea como una administración directa *in vivo* a la vasculatura de la porta o como un tratamiento *ex vivo* que comprende administrar las partículas virales del vector *in vitro* a las células desde el animal que recibe tratamiento seguido por la introducción de las células transducidas de nuevo en el donante.

Ejemplos y Experimentos

Los resultados de este estudio de factibilidad en roedores confirman la superioridad de tanto los vectores de doble cadena como de la terapia génica del hígado mediada por FIX a dosis de 10 a 100 veces por debajo de las establecidas como seguras en ensayos clínicos humanos utilizando AAV2.

AAV2 y BNP2.5 infectan el músculo esquelético humano primario

La figura 1 muestra la transducción de GFP *in vitro* de 530,000 células en HPMC 1×10^9 vg utilizando los diferentes vectores, incluyendo el AAV2 y vector del virus quimérico BNP2.5 que tiene la secuencia definida en la SEQ ID NO. 17. Las células primarias del músculo esquelético humano fueron probadas por inmunofluorescencia para vWF/Factor IX, alfa-actina de músculo liso y miosina sarcomérica para asegurar la pureza (esto es, neg., neg., & positivo respectivamente). Solamente las células que fueron negativas para bacterias, hongos, micoplasmas, ADN del VIH, y ADN de Hepatitis B y C fueron consideradas para la transducción del vector. Estas células fueron establecidas en condiciones de cultivo de tejido en pozos trans después del segundo paso de aislamiento para promover el músculo estriado bien diferenciado. 60 a 80% de monocapas confluentes fueron infectadas usando escalamiento de dosis de MOI de 1 a 100/célula (total de 1×10^4) y transgén informador de GFP (Figura 1).

La figura 2 muestra la respuesta *in vitro* a la dosis en GFP del genoma de cadena sencilla vs. doble. Las células fueron monitorizadas con el tiempo y el porcentaje positivo tabulado comparado para control. Estos resultados en GFP son comparados con células primarias esqueléticas de ratón transducidas bajo condiciones idénticas como las de control positivo. La transducción positiva indicada aquí (Figura 2) muestra que las células de músculo esqueléticas humanas son permisivas a la infección por el vector.

Secreciones transgénicas expresadas en el vector del músculo esquelético humano primario

La clave para estos estudios es la capacidad para determinar si el transgén de FIX humano puede ser secretado a partir de músculo esquelético humano primario. Se han empleado dos métodos para determinar si el transgén de FIX humano es secretado exitosamente de células objetivo después de la administración del vector. Se utilizó ELISA para determinar la cantidad total de antígeno de FIX, y el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) para determinar la actividad funcional. En las células de cultivo de tejidos transformados, se determinó que el pico de expresión de FIX ocurra 24 horas después de la transducción del vector. Se retiró el medio celular y se analizó para FIX cada 24 horas hasta la meseta de expresión del transgén.

Se compararon los niveles de expresión del sobrenadante de la línea celular músculo esquelética primaria de ratón y humano primarios (Figura 3) y se midió la actividad funcional del transgén. (Figura 4). Estos resultados positivos apoyan la conclusión de que el músculo esquelético humano puede secretar transgén de FIX derivado del vector.

La Figura 4 muestra lisado *in vitro* en HPMC de APTT a partir de 1×10^9 vg/infección del título 24 horas después de la infección. BNP2.5 expresa 2 veces niveles más altos de FIX secretado a partir de músculo esquelético humano primario.

La Figura 5 muestra la expresión *in vitro* de lisado celular en HPMC de hFIX. El BNP2.5 se evaluó con ELISA cada 24 horas probadas para la expresión incrementada de transgén de FIX humano a partir del músculo esquelético humano después de la transducción del vector (Figura 5) como se describió anteriormente. Estos resultados positivos muestran que el músculo esquelético humano puede secretar transgén de FIX derivado del vector y que BNP2.5 es más eficiente que AAV2 tanto en las células primarias humanas como de ratón.

VAA2 vs. BNPdsFIX en Modelo de Ratón Hemofílico R333Q para el nivel y duración de la expresión transgénica

El reciente desarrollo de modelos de ratones anulados con hemofilia B (ratón FIXKO) ha reproducido el fenotipo de hemorragia de hemofilia B humana, pero debido a que estos modelos no producen FIX, fallan para reproducir el fenotipo humano dominante. Además, el tratamiento de estos modelos con vectores que expresan el transgén de FIX resulta típicamente en el desarrollo de anticuerpos que hacen imposible estudios de eficacia a largo plazo. El reciente desarrollo de modelo de ratón de FIX humano R333Q-FIX en la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill ha dado como resultado un modelo que imita la mutación observada en los humanos (mutación de sentido equivocado). Estos animales expresan transcritos de ARNm y FIX humano en circulación detectable durante todo el desarrollo, pero con la actividad de FIX de menos de 1%. La mutación R333Q fue escogida porque los datos se han reportado en varios pacientes con hemofilia B severa que exhibe esta mutación. Además, estos pacientes CRM+ tienen niveles casi normales de antígeno de FIX y su actividad de coagulación es usualmente menos de 1%. Los ratones R333Q-hFIX no son morfológicamente diferentes de ratones de tipo silvestre. Ellos sobreviven bien si no se produce lesión y tienen camadas de 4-8 crías con una relación de sexo de aproximadamente 1:1. Estos animales exhiben fenotipo de sangrado idéntico al observado en los humanos, que los hace modelos ideales para el estudio de metodología de la terapia génica para la deficiencia de la hemofilia B. Además el gen de FIX R333Q humano se expresó como la forma de la alanina del dimorfismo Ala 148 Thr. Debido a que el anticuerpo A-1 se enlaza bien a la FIX con la treonina en el residuo 148 y débilmente a la isoforma alanina, los vectores que expresan la isoforma treonina pueden ser fácilmente detectados.

Se han utilizado para este estudio animales de 8-10 semanas de edad (Figura 6), en el que se han probado tres dosis de vectores. Se inyectaron IM ratones R333Q ($n = 5$ /cohorte) y animales de padres normales C57BL6 con AAV2 y BNP2.5ds que expresan hFIX (Figura 6). Una cohorte de BNP2.5(ss)-FIJE-CMV se ha agregado al diseño para evaluar el significado de tropismo del cápsido del vector. Los niveles de actividad de la expresión y el transgén de la proteína de FIX se midieron con el tiempo como se describe por Jin et. al., Blood 2004. Se llevaron a cabo mediciones de los puntos de tiempo cada dos semanas después de la administración del vector pasadas seis semanas. El ensayo de APTT se ha utilizado para determinar la actividad del transgén administrado al vector y comparado con el control. La falta de formación de anticuerpos como se indica por ensayo de inhibición de Bethesda se ha llevado a cabo en un sub-conjunto de animales.

La Figura 6 muestra los datos *in vivo* de la expresión de FIX del modelo R333Q 6 semanas después de la inyección para ssBNP2.5 vs. ssAAV2 (Figura 6A (1, 2, y 3)) y dsBNP2.5 vs. ssAAV2 (Figura 6B (1, 2 y 3)).

Determinación del rendimiento de FIX en BNP después de la transducción del hígado

Aunque el objetivo principal original de este estudio de factibilidad fue determinar la transducción de BNP en el músculo esquelético para la expresión de FIX, estudios clínicos de Fase I similares que muestran la transducción de AAV2 en el hígado han producido resultados provocativos. El vector AAV2 es seguro en dosis que varían desde 8×10^{10} a 4×10^{11} /kg pero sin niveles terapéuticos de la expresión del transgén. Los niveles terapéuticos de FIX pueden obtenerse en 2×10^{12} /kg, pero la expresión del transgén es transiente (4 semanas). Mientras que no se obtuvo entendimiento formal para los niveles transientes de proteína de FIX en hígado transducido, la especulación implica que altas dosis de vector pueden provocar la respuesta inmune para transducir las células del hígado, apoyando una conclusión de que la invención provee una dosis segura de la transferencia génica de FIX (dosis 10^{10} o 10^{11}) que también es eficaz (niveles de 10 - 15% de FIX) mediante el uso de vectores de AAV usando plantillas del vector de doble cadena (Figura 7). Se llevaron a cabo estudios en ratones usando BNP en ratones w/C57B16 *in vivo*. Estos experimentos emplearon 3 cohortes con 4 animales/cohorte; probando (ss)AAV2, (ds)BNP-1.1 y (ds)BNP-2.5 portando transgén de FIX, administrado al hígado a través de la administración de la vena porta y monitorizado para los niveles de FIX a más de cuatro semanas. Los datos derivados de estos experimentos apunta a una conclusión de que (i) (ds)BNP es significativamente más eficiente en comparación con el tradicional vector ssAAV2, ((ii) la eficiencia hepática en la transducción de vector y la expresión de FIX es mejorada significativamente en el músculo (resultados tanto en mioblastos humanos primarios en cultivo como en R333Q *in vivo*), (iii) y estos reactivos novedosos son idealmente adecuados para permitir una dosis incluso más baja que la transferencia del gen de FIX mediada por el músculo para alcanzar niveles similares de expresión de proteínas.

Datos adicionales del Hígado (transgén optimizado)

Los datos del hígado de factibilidad de FIX en ratones C57B16 sugieren que las dosis seguras y eficaces de transferencia génica de doble cadena administradas en el hígado pueden ser terapéuticas en niveles de vectores mostrados previamente en pacientes como seguras, pero no expresan suficiente hFIX. Para elaborar más sobre este punto hemos completado un estudio adicional, en el que desarrollamos y utilizamos un hFIX optimizado de codón de transgén. Cuando se aplicó programa de ordenador para uso óptimo de codones al gen de hFIX "tipo silvestre", observamos un gran número de codones raros en la secuencia de codificación (Figura 8). Además, el gen de hFIX contiene bajo contenido de GC (Figura 9), una característica conocida para facilitar el retorno de ARNm. Por otra parte, se encontraron varios motivos que actúan

negativamente en cis, lo que puede obstaculizar la expresión en mamíferos. Como tal, se sintetizó un gen de hFIX en el que se ha revisado el uso del codón para más sesgo casi aproximado de codón óptimo de los mamíferos (Figura 8).

Con base en el análisis por ordenador, eliminamos los elementos que actúan negativamente en cis (tales como los sitios de empalme, señales poli(A) no deseadas, etc.), que pueden influir negativamente en la expresión de proteínas. Además, se incrementó el contenido de GC para prolongar la vida media del ARNm (Figura 8). El uso de codón se adaptó al sesgo del Homo sapiens que da como resultado un alto valor del Índice de Adaptación del Codón (CAI). Con base en estas modificaciones, predijimos que el gen optimizado permitiría tasas de expresión superiores y más estables en células de mamíferos. Utilizando AAV2 que porta código de secuencia de hFIX optimizado vs. tipo silvestre, se llevó a cabo el análisis de expresión lado a lado *in vitro* (Figura 9). Con base en estos estudios, está claro que el gen de FIX optimizado expresa significativamente más producto de proteína/célula cuando se compara con la secuencia de codificación de tipo silvestre cuando es administrado a la misma dosis.

Tras la optimización del codón se condujo una comparación lado a lado de la expresión *in vivo* del vector de ensayo clínico de hígado mediada por AAV2 vs. doble cadena y doble cadena + casete de transgén de codón optimizado en ratones C57BL6. La dosis escogida se demostró en el ensayo clínico antes de ser sub-terapéutica pero segura (4×10^{11} vg/kg). Los animales a las 8-10 semanas de edad recibieron una inyección individual en la vena porta ($n= 4$ /serotipo/dosis). Cuando se utiliza el vector de ensayo clínico los resultados reflejan el ensayo clínico, con el vector de AAV2 que es subterapéutico *in vivo* en todos los animales. A la misma dosis de vector, el AAV2 con un casete de doble cadena después de 4 semanas después de la inyección expresó niveles terapéuticos de hFIX y sostuvo estos niveles pasadas 16 semanas, y el AAV2 con un casete de transgén optimizado de doble cadena, expresó niveles terapéuticos de la semana uno hasta 16 semanas en hasta 70 veces el hFIX ng/ml en comparación con el vector de ensayo clínico (Figura 10, 11).

Respuesta inmune a BNP2.5 en animales preexpuestos a AAV

Puesto que el BNP 2.5 porta una mayoría de esqueleto del cápsido de AAV2 y minoría de aminoácidos de AAV1, se estudió para determinar si el perfil inmune de este vector quimérico es idéntico al AAV2 de donante progenitor, compartido entre AAV1 y AAV2, o distinto. Si el vector quimérico despliega un perfil inmune diferente de vectores originales, esto puede sugerir que la administración del vector en pacientes preexpuestos a AAV1 o AAV2 no es limitante de la rata para la transducción del vector BNP. Si los datos sugieren que el BNP tiene un perfil inmune idéntico al vector original, entonces hay una posibilidad de que la preexposición a AAV de tipo silvestre tuviera un impacto en BNP idéntico a los estudios establecidos en la literatura.

Estos experimentos se llevaron a cabo *in vitro* e *in vivo*. En los experimentos *in vitro*, los animales C57B16 fueron preexpuestos a los vectores de AAV1, AAV2, o BNP2.5. Cuatro semanas después de la inyección IM, se recolectaron los sueros y se sembraron 293 células a una densidad de 1×10^5 células/pozo en 1 ml de DMEM que contenía 10% de FBS en una placa de 24 pozos. Las células se cultivaron durante 2-3 horas a 37°C y se dejaron adherir al pozo. El medio se eliminó antes de que se agregaran 1×10^6 partículas de adenovirus dl309 en un volumen final de 200 μ l/pozo. Las células se incubaron adicionalmente a 37°C durante 1 hora y luego se lavaron dos veces. Los vectores de AAV-GFP (1×10^8 partículas) se incubaron con sueros humanos en diluciones en serie con PBS durante 2 horas a 4°C en un volumen total de 25 μ l (12.5 μ l de muestras de los sueros en dilución en serie más 12.5 μ l de vectores de AAV/GFP que contenían 1×10^8 partículas). La mezcla se agregó a las células en un volumen final de 200 μ l y se incubó durante la noche a 37°C. Las células que expresan GFP se contaron bajo un microscopio de fluorescencia. El porcentaje de inhibición se calculó sin muestra de suero como referencia. El título de anticuerpos de neutralización se calculó (Figura 12) usando la dilución más alta donde el porcentaje de células expresadas en GFP es 50% menos que el control sin sueros.

Los experimentos *in vivo* se implementaron utilizando los mismos ratones C57B16 que han sido cebados con AAV1, AAV2 y BNP2.5. Después de cuatro semanas, los ratones fueron expuestos con el vector de BNP IM portando el informador Luc y portando el vector como se muestra en la Figura 14 con la secuencia definida en la Figura 15, y se analizaron usando formación de imágenes en tiempo real (Figura 13). Se utilizaron experimentos de control de BNP con dosis idénticas en animales ingenuos.

Resultados

Después de seis semanas posteriores a la administración de una dosis optimizada de vector 1×10^{11} vg/kg, los niveles de expresión indican una traslación relativa de la expresión de FIX del cultivo de tejido *in vivo*. El rAAV2 proveyó la línea base y mide la expresión de FIX más baja. BNP2.5 (ss) y BNP2.5 (ds), mostraron ambos una mejoría sobre rAAV2, con cadena sencilla midiendo una mejora de 3-6 veces en FIX y BNP2.5 de doble cadena que deriva una mejora de 8-12 veces en FIX circulante (Figura 6). El trabajo aquí descrito muestra que el vector de BNP de doble cadena "BNP(ds)" que contiene un gen de FIX puede transducir el músculo estriado murínico y canino y células hepáticas que dan como resultado la expresión del gen de FIX y la secreción de proteínas en la sangre periférica.

Las secuencias y secuencias flanqueantes de FVIII (hFVIII) de codón modificado se desarrollaron (SEQ ID NOs: 12 y 15, Figuras 22 y 23, respectivamente), utilizando un programa de ordenador para sintetizar un gen de FVIII en el que el uso de codones se ha revisado para más sesgo casi aproximado de codón óptimo de los mamíferos, incluyendo la optimización del contenido de GC y los motivos que actúan en cis.

5 Con base en el análisis por ordenador, se eliminaron los elementos que actúan negativos en cis (tales como los sitios de empalme, señales no deseadas de poli(A), etc.) que pueden influir negativamente en la expresión de proteínas. Además, se incrementó el contenido de GC para prolongar la vida media del ARNm. El uso de codón se adaptó al sesgo del *Homo sapiens* dando como resultado un alto valor de Índice de Adaptación del Codón (CAI). Con base en estas modificaciones, el gen modificado probablemente permitirá ratas de expresión superiores y más estables en células de mamífero, específicamente células humanas o células derivadas de humanos.

10 Con respecto a la SEQ ID NO: 10, los histogramas de la Figura 16 muestran el porcentaje de codones de secuencia, que caen dentro de una cierta clase de calidad. El valor de la calidad del codón más frecuentemente utilizado para un aminoácido dado en el sistema de expresión deseado se establece en 100, los codones restantes se escalan concordantemente (véase también Sharp, PM, Li, WH, Nucleic Acids Res. 15 (3), 1987). La figura 17 muestra una calidad del codón potenciada dramáticamente. La Figura 18 muestra un incremento en el contenido de GC del 44% (gen tipo silvestre SEQ ID NO: 19) a 66% para optimizado (SEQ ID NO 12.).

Los motivos modificados incluyen los siguientes:

Motivos inhibitorios procariotas	16	0
Sitio poliA	3	0
Consenso del sitio donante de empalme (críptico)	2(9)	0
Motivo de inestabilidad de ARN (ARE)	11	0

20 Con respecto a la SEQ ID NO: 14, la Figura 19 muestra el porcentaje de codones de secuencia, que caen dentro de una cierta clase de calidad. El Índice de Adaptación del Codón es 0.96. La Figura 20 muestra un gráfico de calidad del codón. La Figura 21 muestra un gráfico de contenido de GC; el contenido de GC es del 62%.

25 El gen de tipo silvestre utiliza codones raros con una alta frecuencia y el contenido de GC es muy baja, lo que facilita el rápido retorno de ARNm. La optimización fue exitosa: están presentes sitios no negativos que actúan en cis (tales como sitios de empalme, señales de poli(A), etc.) que pueden influenciar negativamente la expresión. Se incrementó el contenido de GC para prolongar la vida media del ARNm y para mejorar la eficiencia de los empaques de vector. El uso de codones se adaptó al sesgo del *Homo sapiens* que da como resultado un valor más alto de CAI* (0.98). Por lo tanto, el gen optimizado debería permitir ratas de expresión más altas y estables en las células de *Homo sapiens* u otros mamíferos.

30 Para confirmar tal incremento de la rata de expresión, se condujo una comparación lado a lado de la expresión del vector de ensayo clínico hígado mediada por AAV2 vs. doble cadena y doble cadena + casete del transgén modificado de codón (incluyendo SEQ ID NO: 12 o 15) en ratones C57BL6. La dosis escogida será una que ha demostrado ser subterapéutica pero segura (4×10^{11} vg/kg). Los animales de 8-10 semanas de edad recibirán una inyección individual en la vena porta (n= 4/serotipo/dosis).

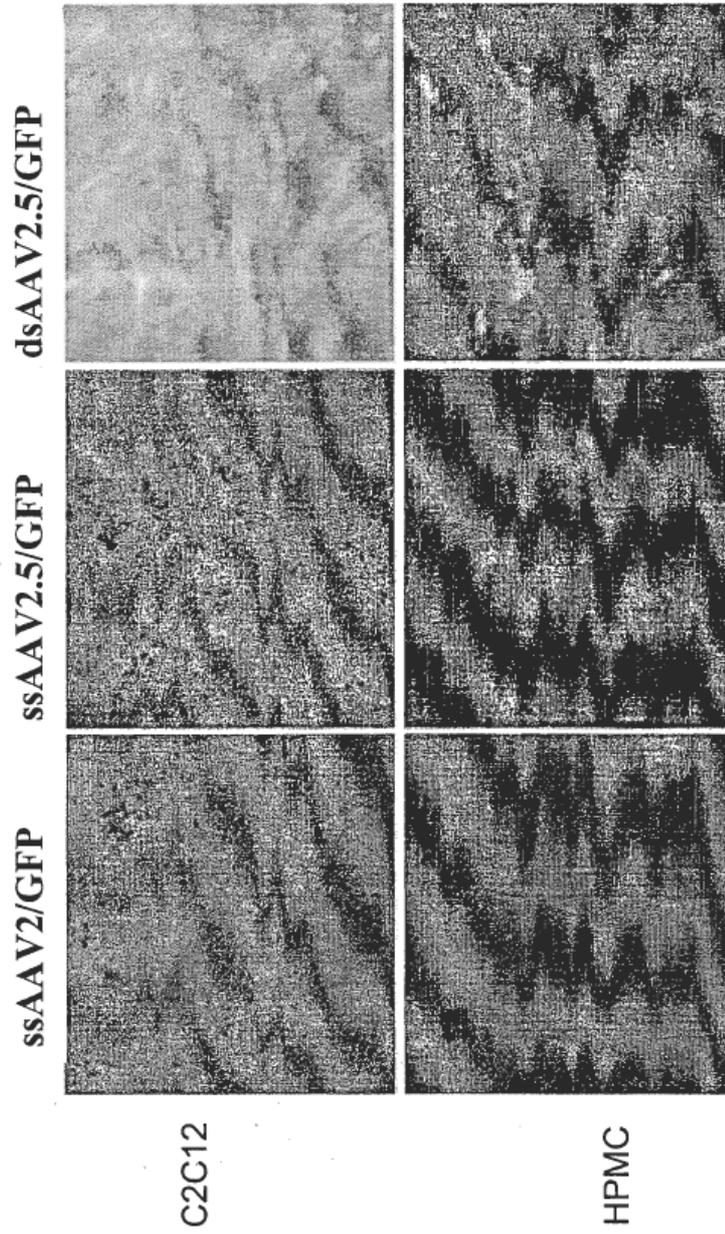
35 Estos experimentos se llevan a cabo *in vitro* e *in vivo*. En los experimentos *in vitro*, los animales C57B16 son pre-expuestos a los vectores de AAV1, AAV2, BNP2.5, o cualquier otro vector de parvovirus adecuado. Cuatro semanas después de la inyección IM, se recolectan los sueros y se siembran 293 células a una densidad de 1×10^5 células/pozo en 1 ml de DMEM que contiene 10% de FBS en una placa de 24 pozos. Las células se cultivan durante 2-3 horas a 37°C y se dejan adherir al pozo. El medio es eliminado antes de que se adicionen 1×10^6 partículas de adenovirus dl309 en un volumen final de 200 ul/pozo. Las células son incubadas adicionalmente a 37°C durante 1 hora y luego se lavan dos veces. Los vectores de AAVGFP (1×10^8 partículas) se incubaron con sueros humanos en diluciones en serie con PBS durante 2 horas a 4°C en un volumen total de 25 µl (12.5ul de muestras de sueros en dilución en serie más 12.5 µl de vectores de AAV/GFP que contienen 1×10^8 partículas). La mezcla se adiciona a las células en un volumen final de 200 µl y se incuban durante la noche a 37°C. Las células que expresan GFP se cuentan bajo un microscopio de fluorescencia. El porcentaje de inhibición se

calcula será calculado sin muestra de suero como referencia. El título de anticuerpos neutralizantes se calcula utilizando la dilución más alta donde el porcentaje de células expresadas en GFP es 50% menos que el control sin sueros.

5 Los experimentos *in vivo* se implementan utilizando los mismos ratones C57B16 que han sido cebados con AAV1, AAV2, BNP2.5, o cualquier otro vector de parvovirus adecuado. Después de cuatro semanas, los ratones son expuestos con vector de BNP IM que porta el informador Luc y analizados usando formación de imágenes en tiempo real. Se utilizan experimentos de control de BNP con dosis idénticas en animales ingenuos.

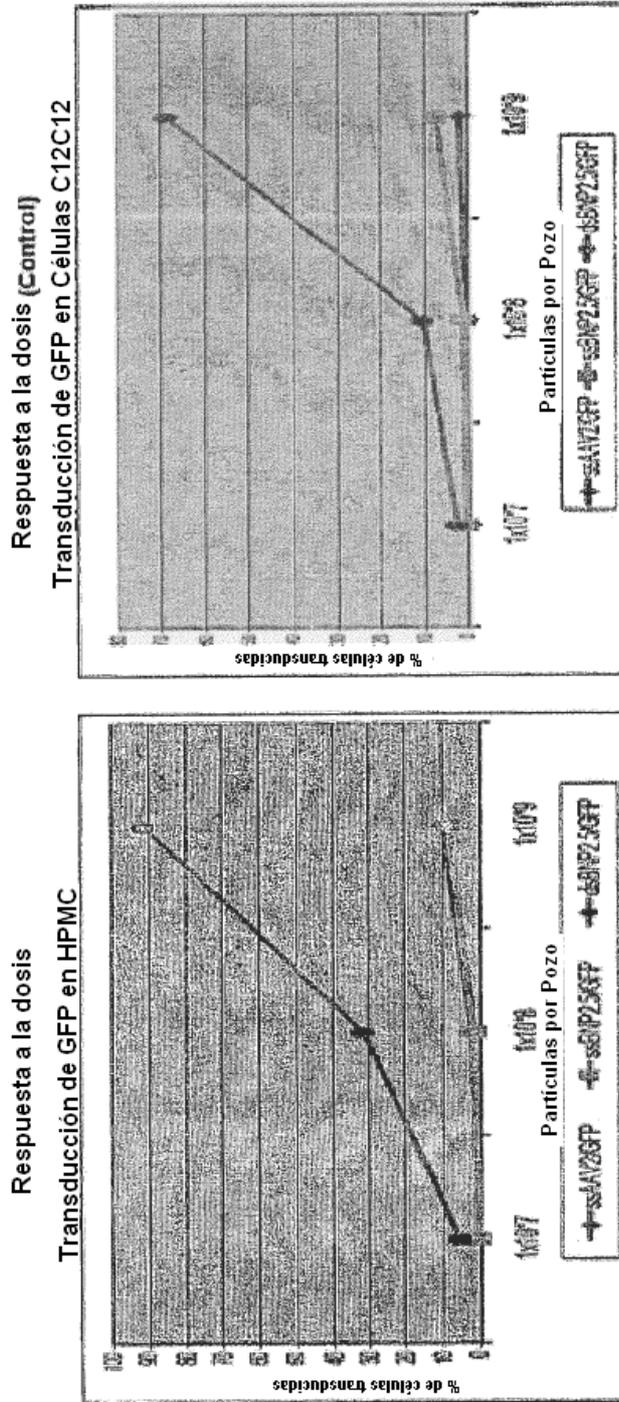
Reivindicaciones

1. Un gen aislado optimizado modificado para incrementar secuencias de GC y reducir motivos cis con respecto a un gen de FIX de tipo silvestre, en donde el gen optimizado para FIX tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7.
- 5 2. El gen optimizado de la reivindicación 1, en donde las secuencias de GC se incrementan al menos 40% con respecto al gen de tipo silvestre.
3. El gen optimizado de la reivindicación 1, en donde el gen optimizado está flanqueado por TRs de AAV.
4. Un vector de virus que comprende el gen optimizado de la reivindicación 1.
- 10 5. El vector de virus de la reivindicación 4, en donde el vector de virus es un vector de virus quimérico que comprende componentes del cápsido seleccionados de los cápsidos de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV12.
6. El vector de virus quimérico de la reivindicación 5 que comprende la SEQ ID NO: 17.
7. El vector de virus de la reivindicación 4, en donde el vector de virus comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
8. Un proceso para expresar un péptido FIX optimizado que comprende;
15 transfectar una célula con el polinucleótido de la SEQ ID NO: 7 que codifica el péptido FIX del mismo para producir una célula anfitriona transformada, en donde el polinucleótido ha sido modificado para incrementar las secuencias de GC y reducir los motivos cis con respecto a un gen de tipo silvestre; y
mantener la célula anfitriona transformada bajo condiciones biológicas suficientes para la expresión del péptido.
9. Una composición farmacéutica que comprende una mezcla de:
20 un ácido nucleico aislado o purificado que comprende la secuencia de: SEQ ID NO: 7; y
un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. El uso de cualquiera de los genes optimizados de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hemofilia en un sujeto.



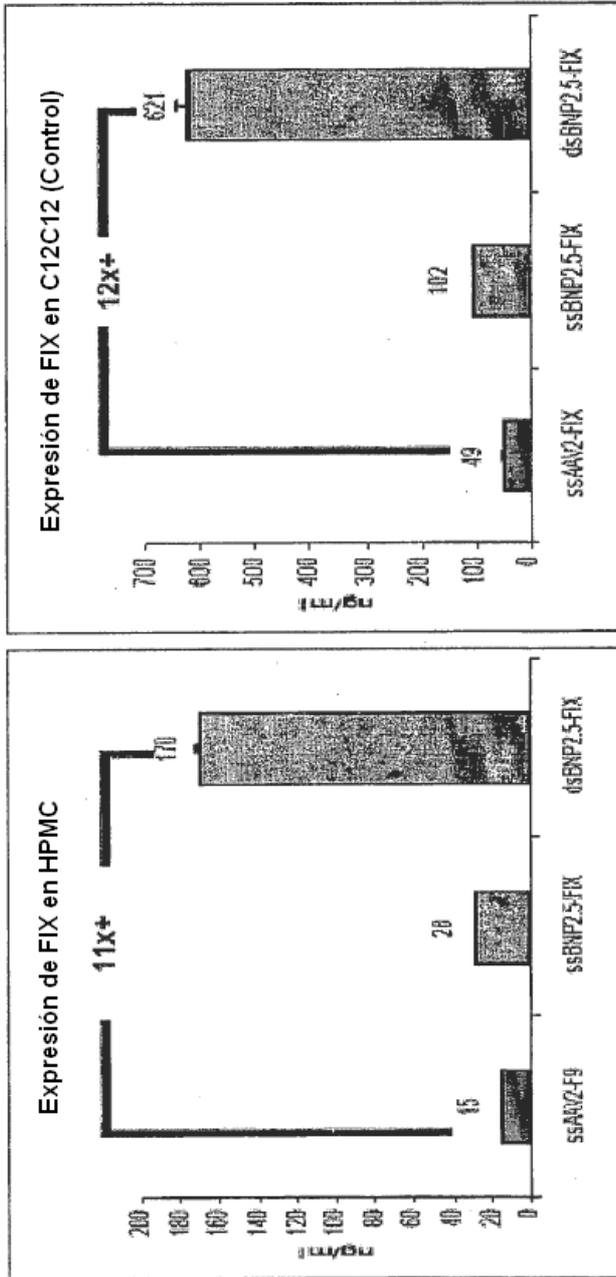
Transducción de GFP In Vitro en HPMC 1x10e9vg

Figura 1



Respuesta In Vitro a la Dosis en GFP del GENOMA de Cadena sencilla vs. Doble

Figura 2

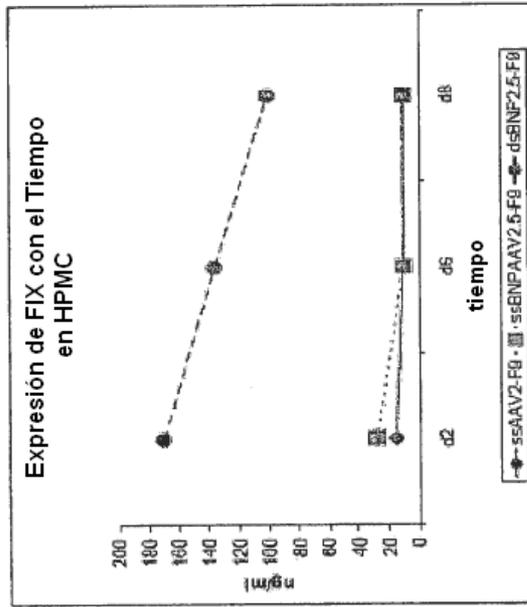


Meseta de Expresión de FIX en HPMC y en Células C12C12 24 horas después de la Administración de la Infección en 1×10^9 vg/título

Figura 3

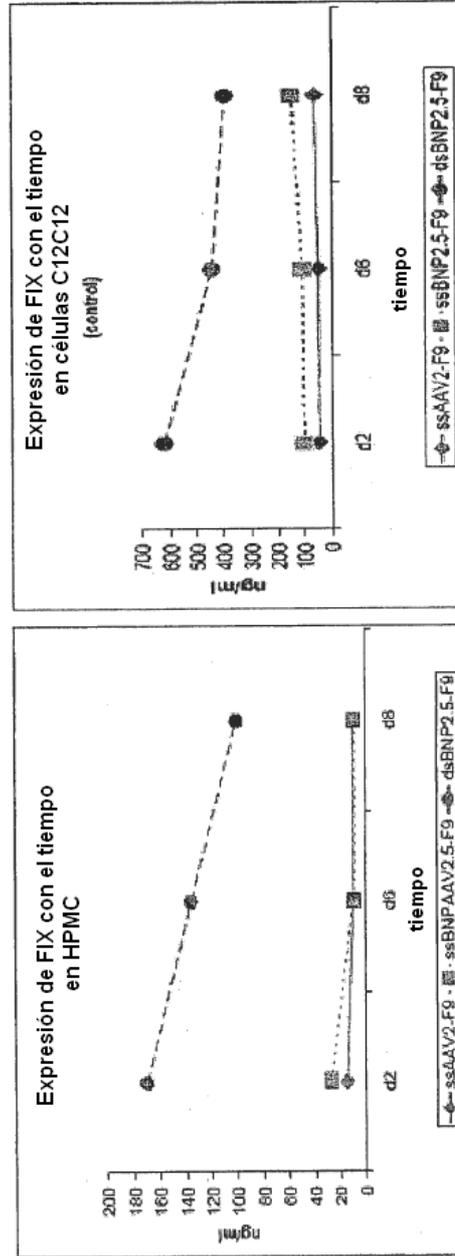
Resultados IN Vitro de APTT

	AAV-2 (Control)	BNP2.5-FIX	dsBNP2.5-FIX
FIX ng/ml Total	43.2	45.3	477.9
% de FIX de Plasma Normal	<5%	<5%	8.8%
Temporización de APTT (segundos)	150.0	146.4	65.6



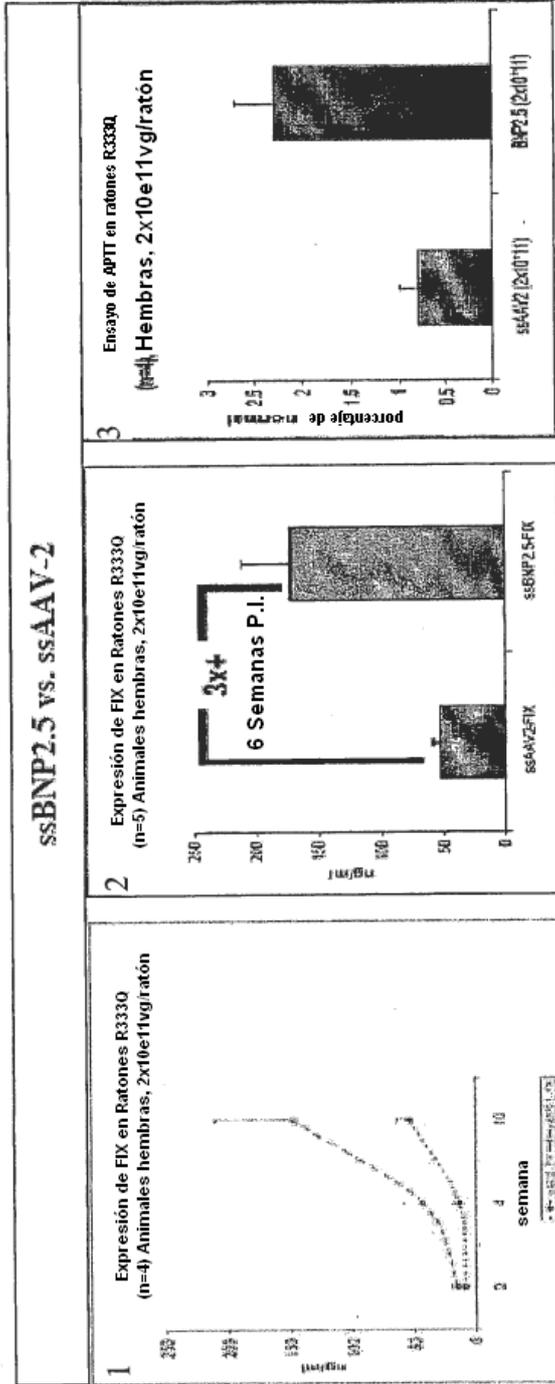
lisado in vitro en HPMC de APTT a partir de 1x10⁹evg /infección del título 24 horas después de la infección

Figura 4



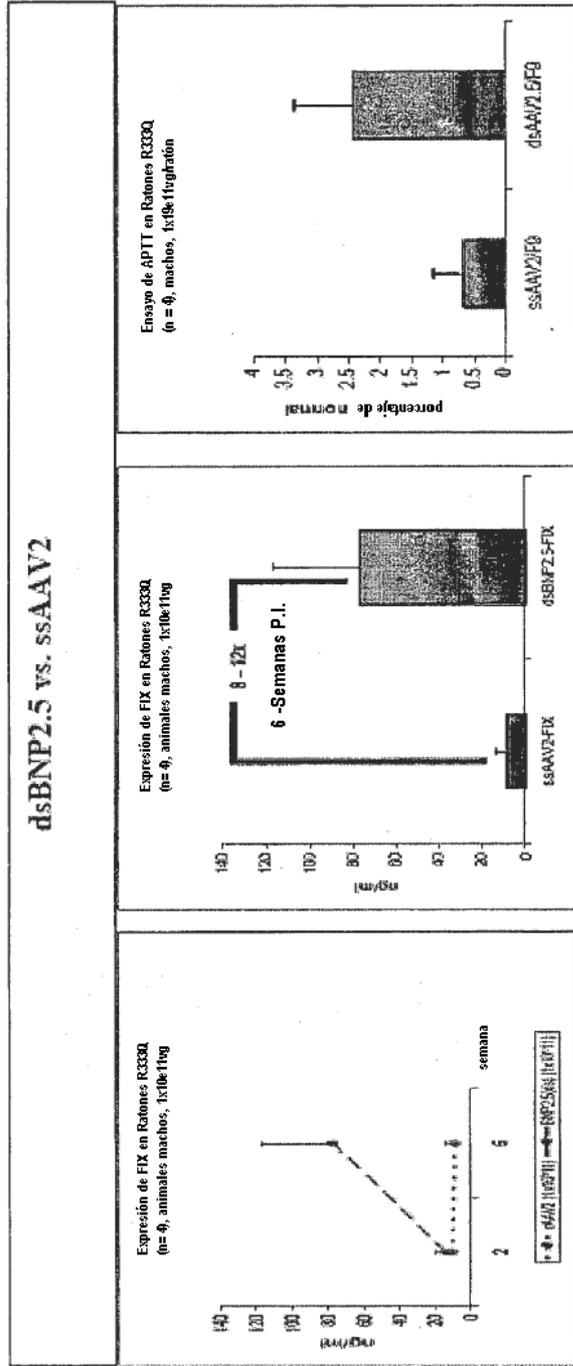
Expresión de Lisado In Vitro de Células en HPMC Cada 24 Horas de hFIX Evaluado con ELISA

Figura 5



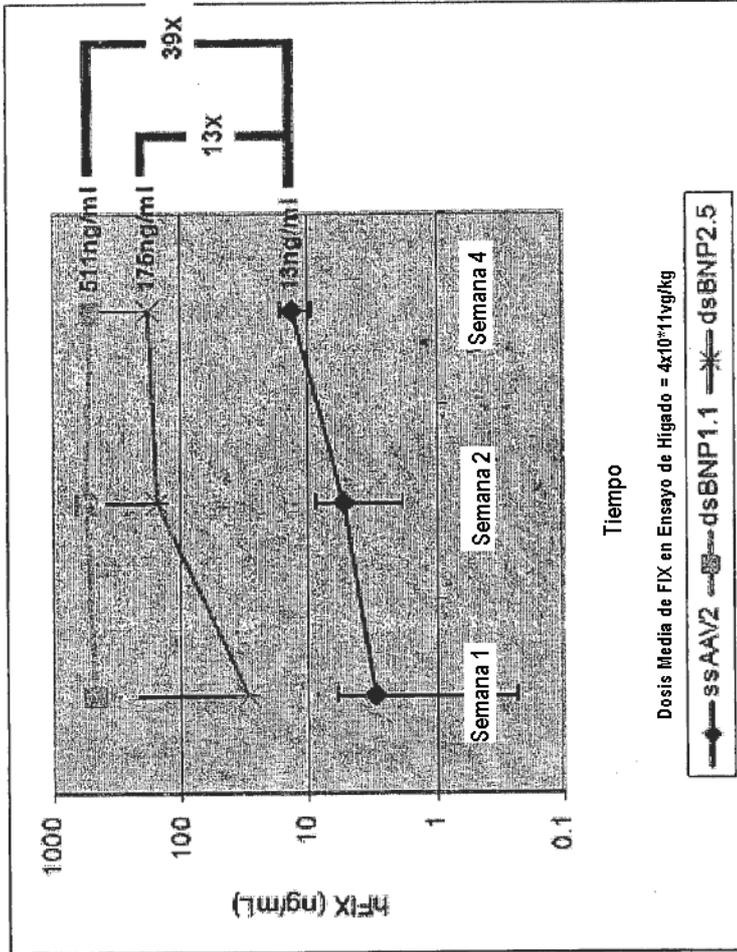
Datos In Vivo de FIX a partir del Modelo R333Q 6 Semanas Después de la Inyección

Figura 6A



Datos In Vivo de FIX a partir de Modelo R333Q 6 Semanas Después de la Inyección

Figura 6B



Administración de la Vena Porta de C57/Blk6
 1×10^{10} vg/animal = 4×10^{11} vg/kg (n= 4/cohorte)

Figura 7

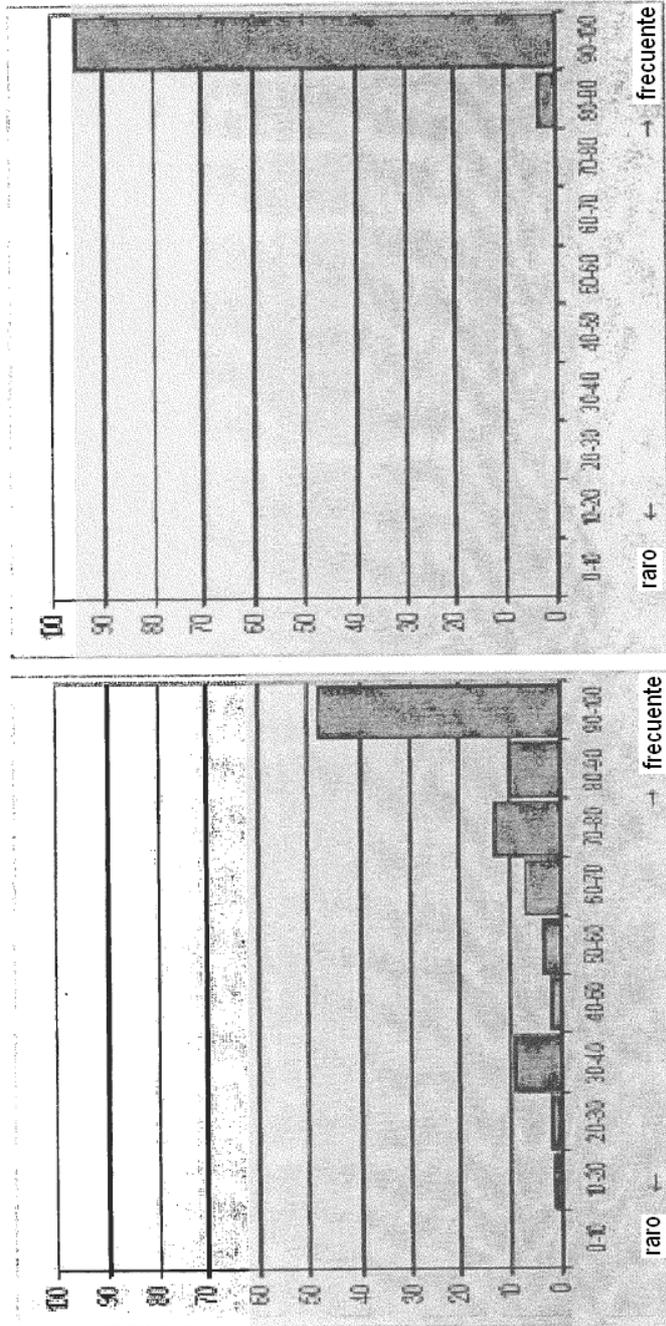


Figura 8

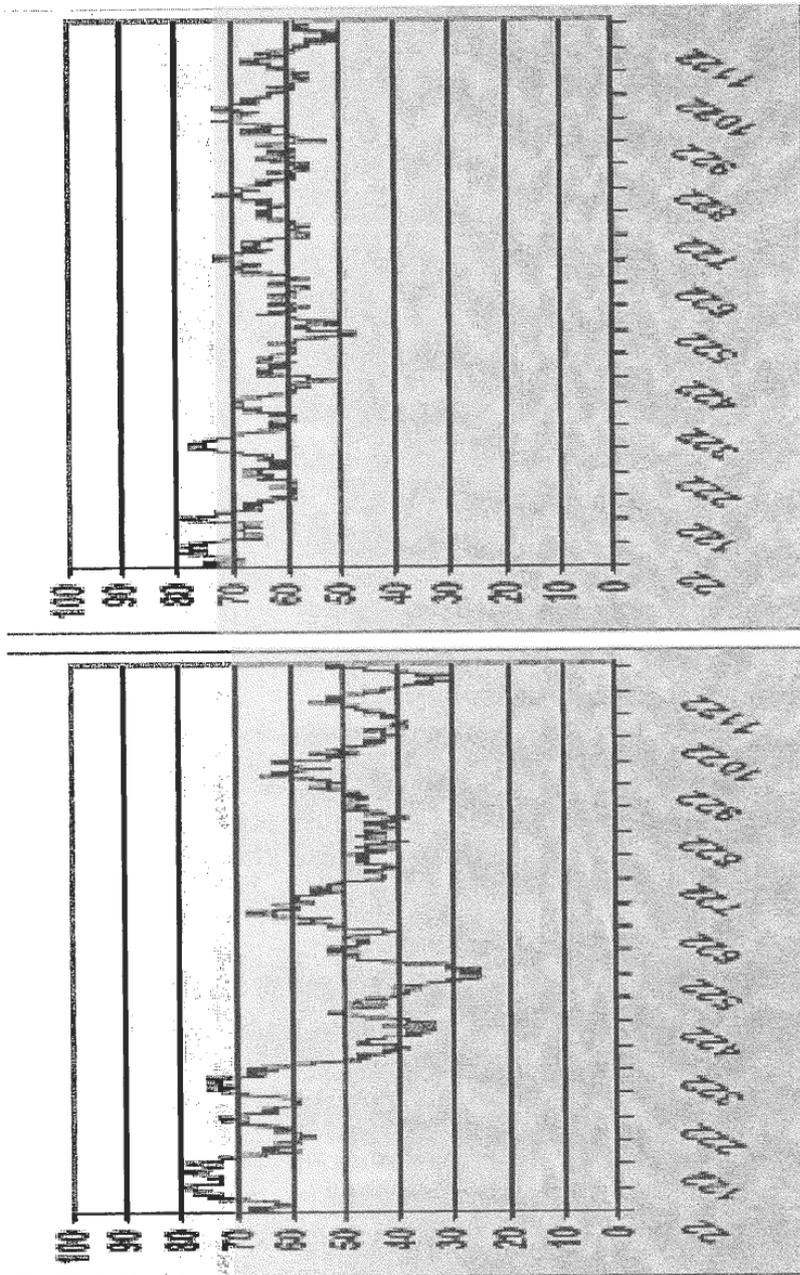
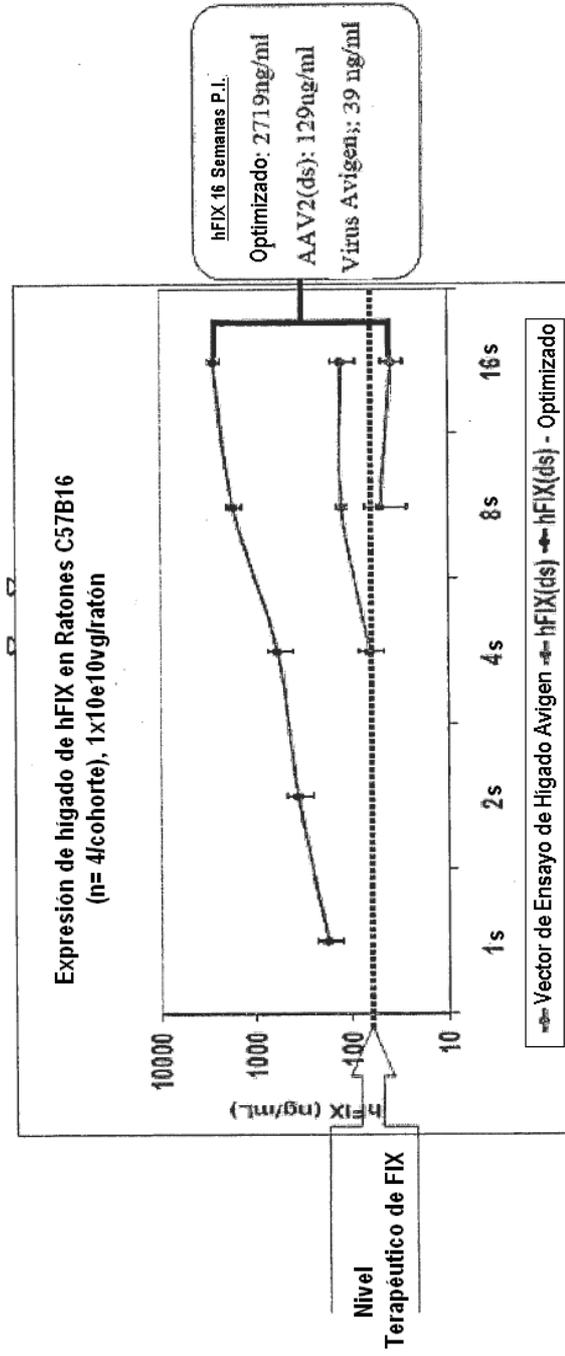
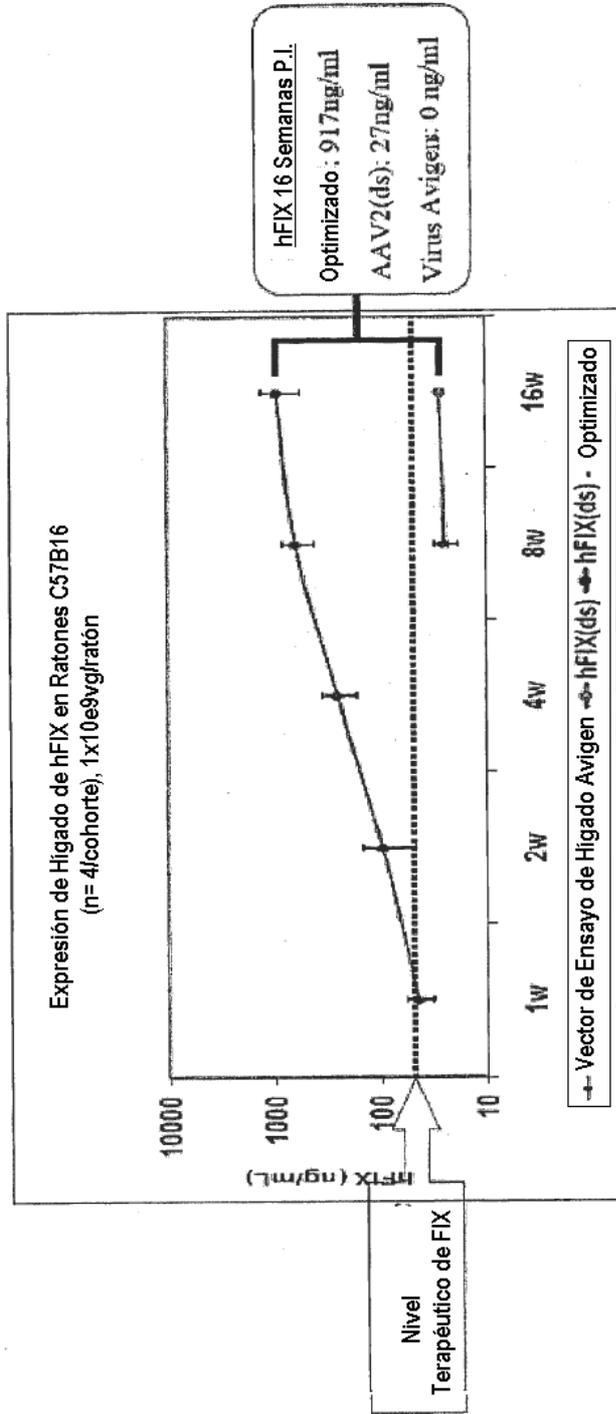


Figura 9



4x10¹⁰vg/kg usados en el ensayo de hígado Avigen fueron seguros, sin embargo no terapéuticos

Figura 10



8x10¹⁰vg/kg usados en el ensayo de hígado Avigen fueron seguros, sin embargo no terapéutico

Figura 11

Título de NAb In Vítro

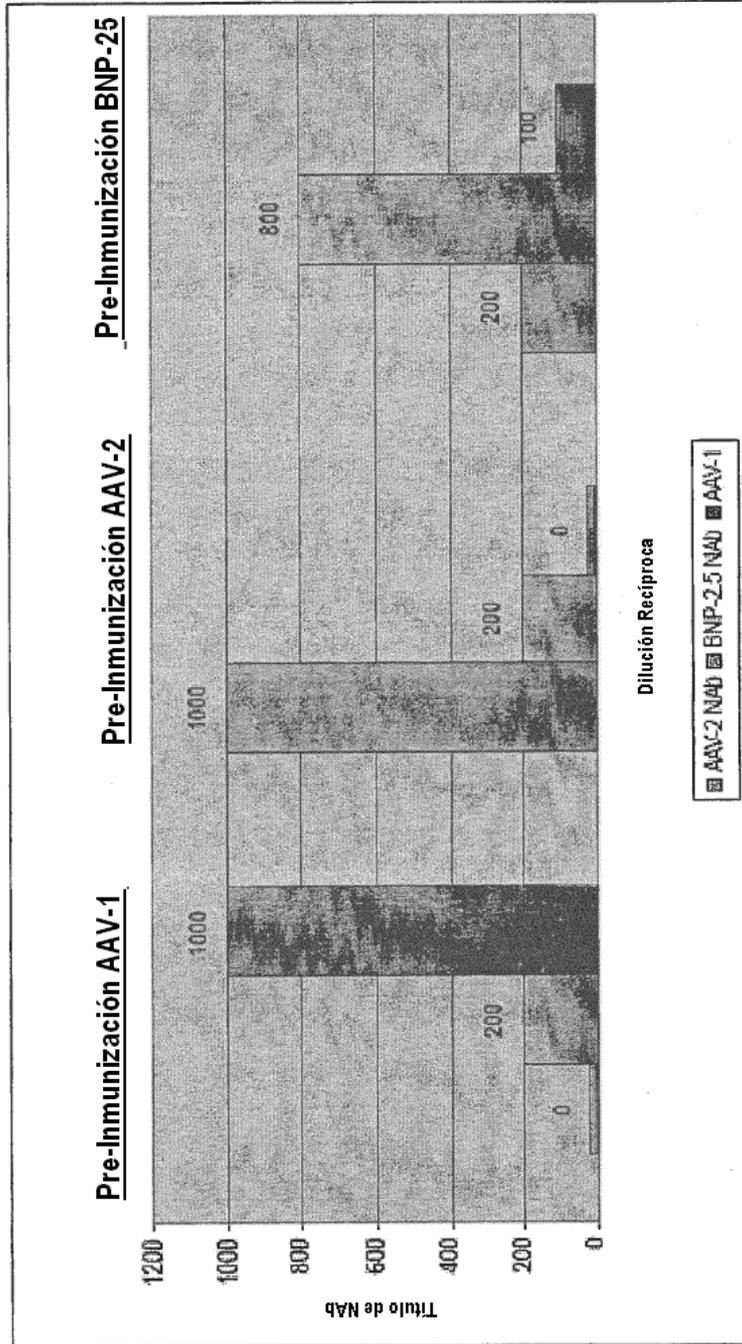


Figura 12

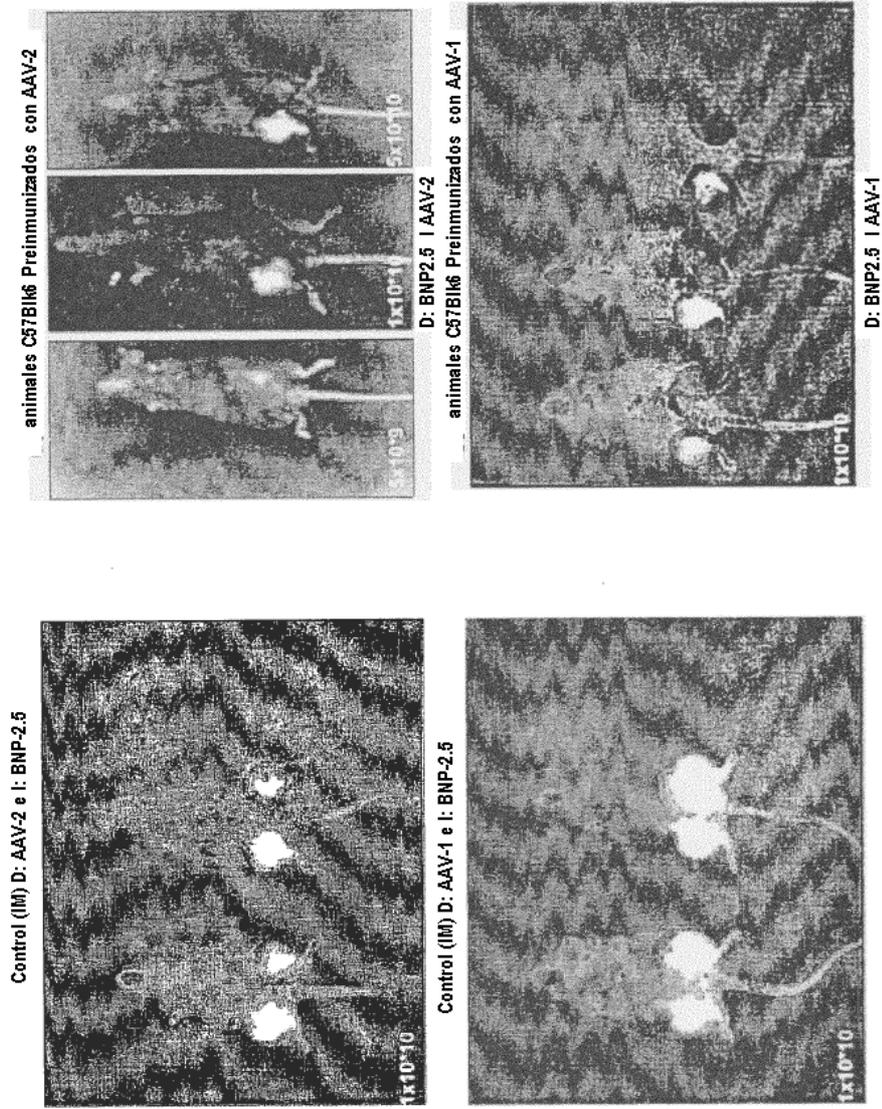


Figura 13

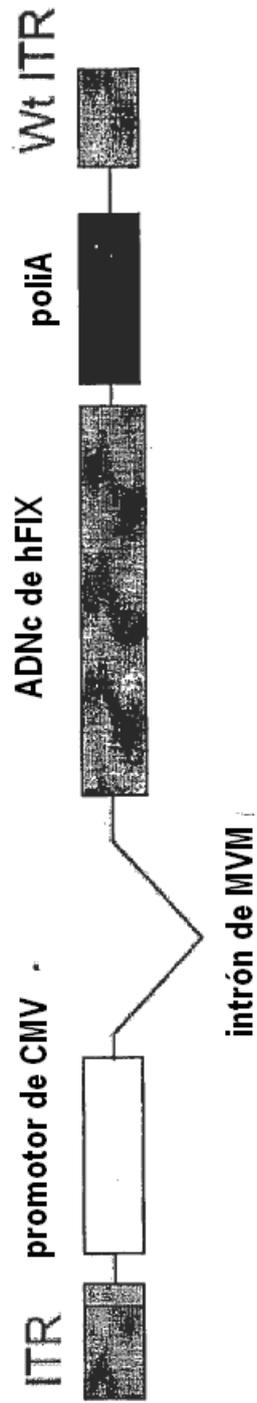


Figura 14

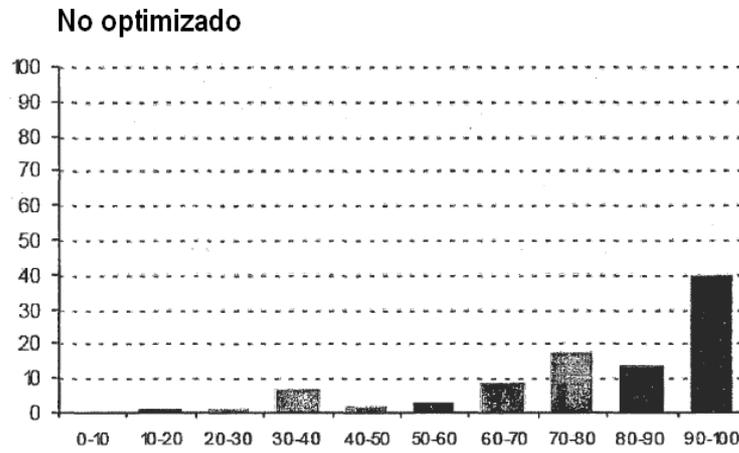
CTGGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCG
GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGA
GCGCGCAGAGAGGGAGTGGAATTCGAGCtcgagcttgggctgcaggtcga
gggactgggaggatgttgagtaagatggaaaactactgatgacctgacagacagagt
ataggacatgttgaacagggccgggcatcagcaggtagctctagaggatccccgtct
gtctgcacattcgtagagcaggttccgatactctaataccttaggaaggtcatattgt
gtaggtfacttattctcctttgtgactaagtcaataatcagaatcagcaggttggagtcagct
ggcagggatcagcagcctgggttgaaggaggggtataaaagccccttcaccaggaga
agccgtcacacagatccacaagctcctgacaggaagctctaggtagctcttaaggtagcctt
gcagaagttggctgtaggcaactggctagccctaaggttaagttggcgcctttaagggatggtt
ggttgggtgggtattaatgttaattacctttttacagccctgaagatctccaccATGCAGC
GCGTGAACATGATCATGGCCGAGAGCCCTGGCCTGATCACCATCT
GCCTGCTGGGCTACCTGCTGAGCGCCGAGTGCACCGTGTTCCTGG
ACCACGAGAACGCCAACAAAGATCCTGAACCGGCCCAAGAGATAC
AACAGCGGCAAGCTGGAGGAGTTCGTGCAGGGCAACCTGGAGAG
GGAGTGCATGGAGGAGAAGTGCAGCTTCGAGGAGGCCAGGGAAG
TGTTGAGAACACCGAGCGGACCACCGAGTTCTGGAAGCAGTACG
TGGACGGCGACCAGTGCAGAGCAACCCTTGCCTGAACGGCGGC
AGCTGCAAGGACGACATCAACAGCTACGAGTGCTGGTGCCCTTC
GGCTTCGAGGGCAAGAAGTGCAGCTGGACGTGACCTGCAACAT
CAAGAACGGCCGCTGCGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCGACA
ACAAAGTGGTGTAGCTGCACCGAGGGCTACAGACTGGCCGAG
AACCAGAAGAGCTGCGAGCCCGCCGTGCCCTTCCCCTGCGGCAG
AGTGAGCGTGTCCCAGACCAGCAAGCTGACCAGAGCCGAGACCG
TGTTCCCCGACGTGGACTACGTGAATAGCACCGAGGCCGAGACCA
TCCTGGACAACATCACCCAGAGCACCCAGTCCTTCAACGACTTCA
CCAGAGTTGTGGGCGGCGAGGACGCCAAGCCCGGCCAGTCCCC

Figura 15 A

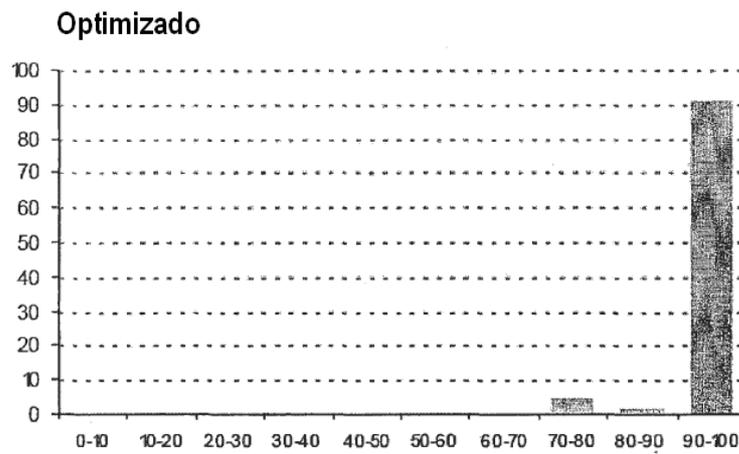
TGGCAGGTGGTGCTGAACGGCAAAGTGGATGCCTTCTGCGGCGG
CAGCATCGTGAACGAGAAGTGGATCGTGACAGCCGCCCACTGCGT
GGAGACCGGCGTGAAGATCACCGTGGTGGCCGGCGAACACAATA
TCGAGGAGACCGAGCACACCGAGCAGAAGCGGAACGTCATCCGG
ATTATCCCCACCACAACACTACAACGCCGCCATCAACAAGTACAAC
CACGACATCGCCCTGCTGGAGCTGGACGAGCCTCTGGTGCTGAAT
AGCTACGTGACCCCCATCTGCATCGCCGACAAGGAGTACACCAAC
ATCTTCTGAAGTTCGGCAGCGGCTACGTGTCCGGCTGGGGCAGA
GTGTTCCACAAGGGCAGAAGCGCCCTGGTGCTGCAGTACCTGAGA
GTGCCCTGGTGGACAGAGCCACCTGCCTGAGGAGCACCAAGTTC
ACCATCTACAACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGCGGC
AGAGACAGCTGCCAGGGCGACAGCGGCGGACCCCACGTGACCGA
AGTGGAGGGCACCAGCTTCTGACCGGCATCATCAGCTGGGGCG
AGGAGTGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGCATCTACACCAAAGTG
AGCCGGTACGTGAACTGGATCAAGGAGAAAACCAAGCTGACCTG
ATGAgcatgcctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgt
tgtttccccctcccccgtccttcttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttctaat
aaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtgg
ggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggaaAGCT
TCAGCTAGAGCA TGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAAT
CATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT
CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCCG
CCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG
CGCGCAG

Figura 15 B

Distribución de Calidad del Codón



Índice de Adaptación del Codón : 0,74



Índice de Adaptación del Codón : 0,98

Figura 16

Gráfico de Calidad del Codón

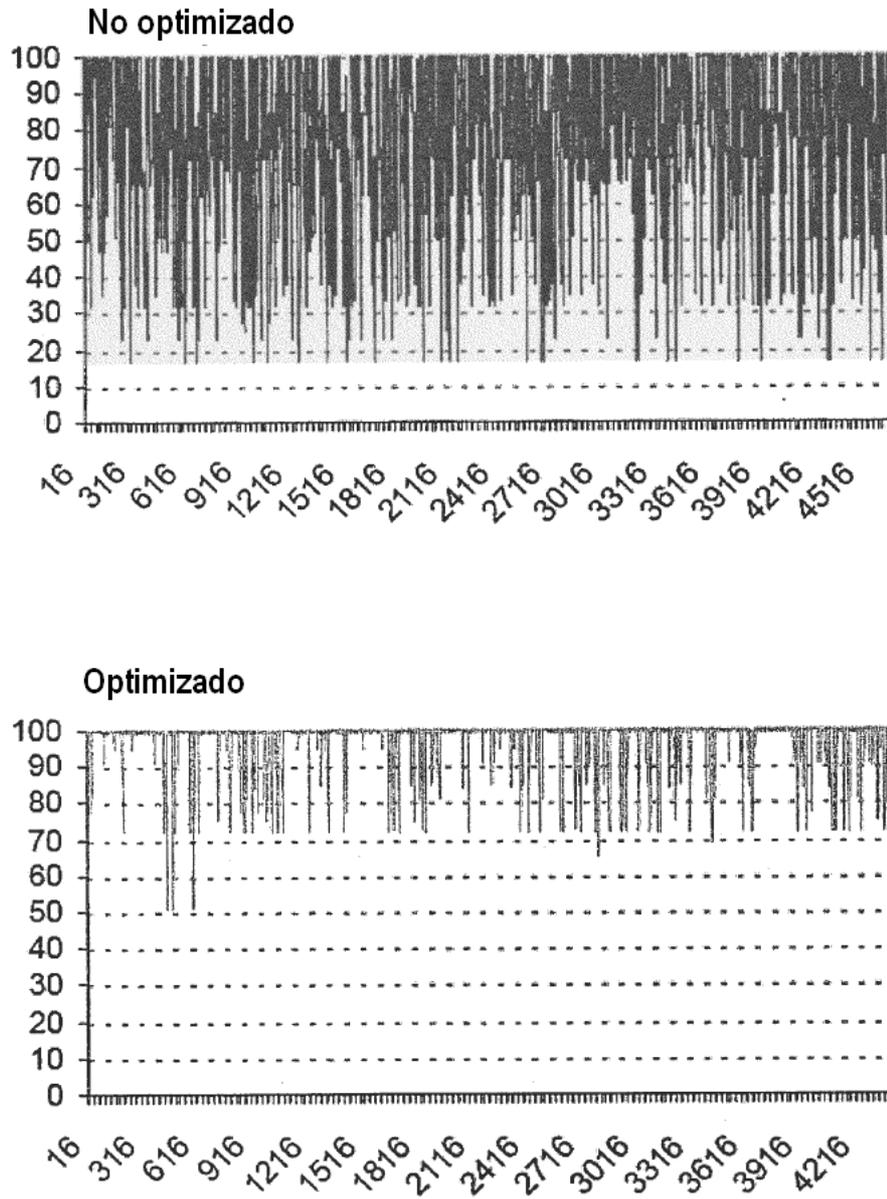


Figura 17

Contenido de GC

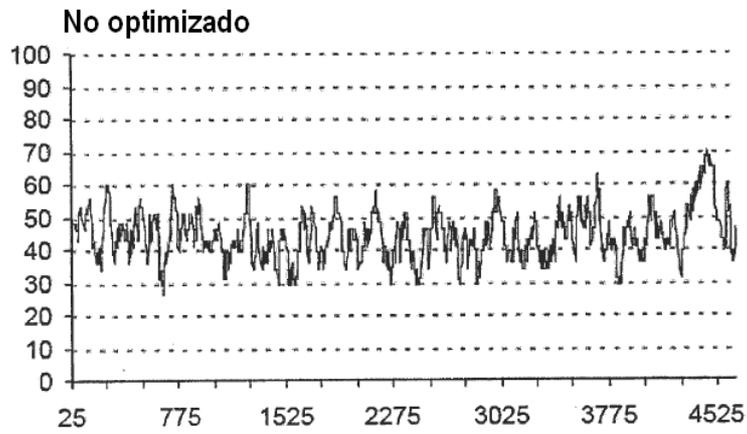


Fig. 3a

Contenido promedio de GC: 44%

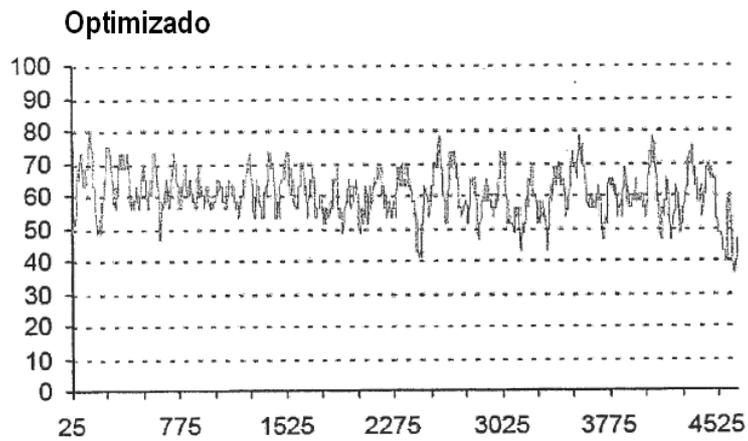


Fig. 3b

Contenido promedio de GC: 60%

Figura 18

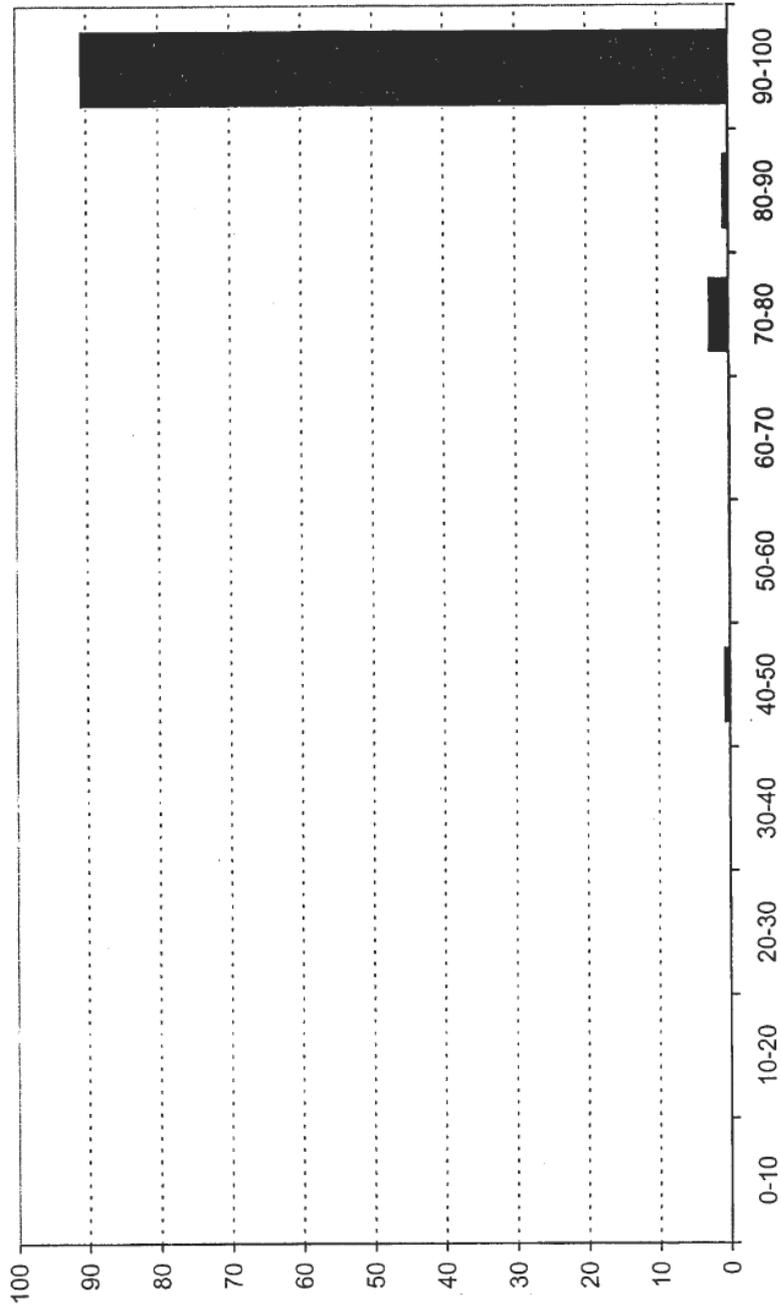


Figura 19

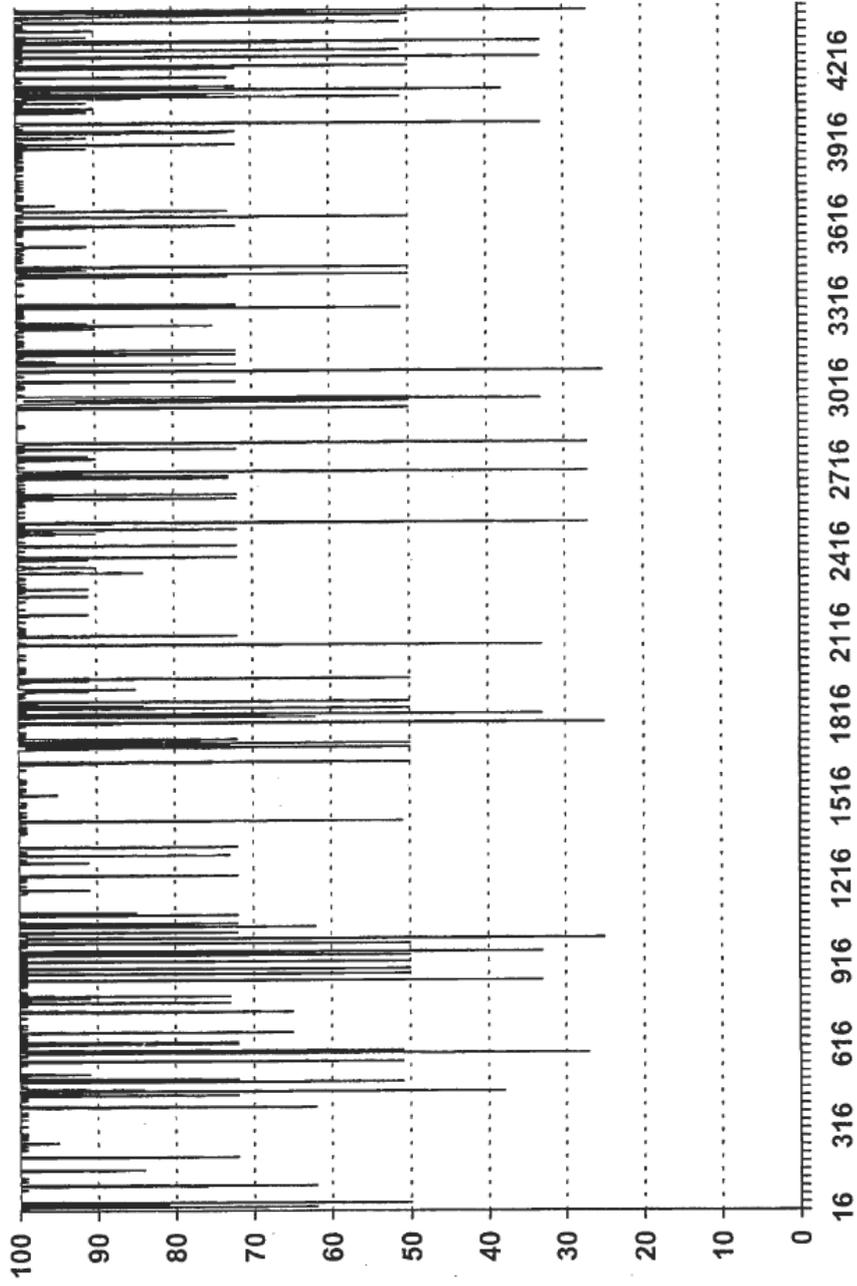


Figura 20

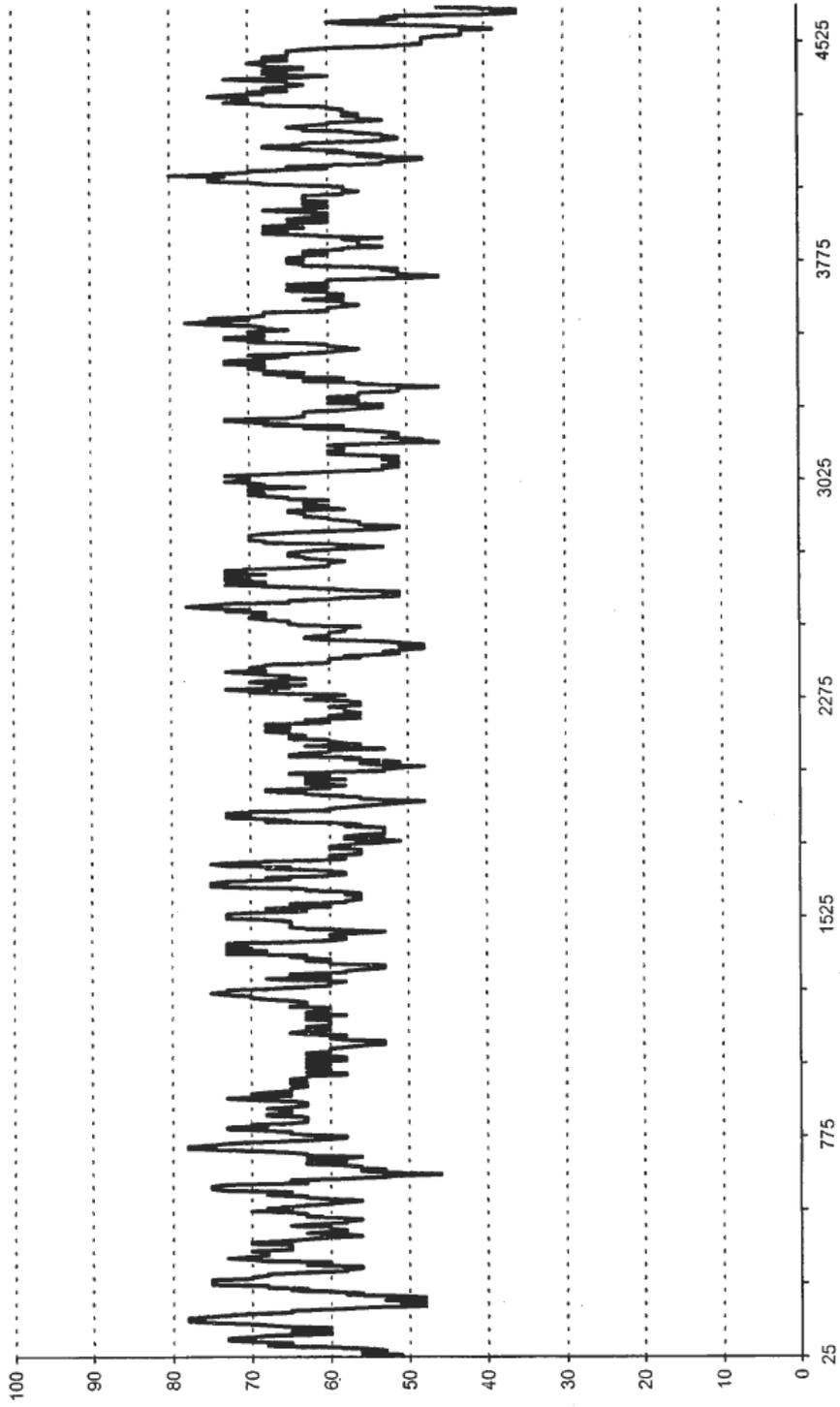


Figura 21

ggtaccgccaccatgcagatcgagctgtccacatgcttttctgtgctgctgcggttctgctt
cagcgccacccgcggtactacctggcgccgtggagctgtcctgggactacatgcagag
cgacctgggagctgcccgtggacgcccgttccccccagagtgcccaagagcttcccc
ttcaacaccagcgtggtgtacaagaaaaccctgttcgtggagttcaccgtgcacctgttcaac
atcgccaagcccaggccccctggatggcctgctgggcccaccatccaggccgaggtg
tacgacaccgtggtgatcacctgaagaacatggccagccaccccgtagcctgcacgcc
gtggcgtagctactggaaggcctccgagggcgccgagtagcagcaccagaccagcca
gcgggagaaagaggacgacaaagtcttctggcggcagccacacctacgtgtggcaggt
cctgaaagaaaacggccccatggcctccgacccccgtgcctgacctacagctacctgagc
cacgtggacctggtgaaggacctgaacagcgggctgattggggccctgctggtctgccggg
agggcagcctggccaaagagaaaaccagacctgcacaagttcatcctgctgttccgct
gttcgacgagggcaagagctggcacagcgagaccaagaacagcctgatgcaggaccgg
gacgccgcctctgccagacctggcccaagatgcacaccgtgaacggctacgtgaacag
aagcctgcccggcctgattggctgccaccggaagagcgtgtactggcacgtgatcggcatg
ggcaccacaccgaggtgcacagcatcttctggaaggccacaccttctggtgcggaacc
accggcaggccagcctggaaatcagccatcaccttctgaccgcccagacactgctgat
ggacctgggcccagttcctgctgtttgccacatcagctctcaccagcacgacggcatggaag
cctacgtgaagggtgactcctgccccgaggaaccccagctgcggatgaagaacaacgag
gaagccgaggactacgacgacacctgaccgacagcgagatggacgtggtgcggttcca
cgacgacaacagcccagcttcatccagatcagaagcgtggccaagaagcaccccaag
acctgggtgcactacatcgccgaggaagaggactgggactacgccccctggtgctg
gccccgacgacagaagctacaagagccagctacctgaacaatgccccagcggatcg
gccggaagtacaagaaagtgcggttcatggcctacaccgacgagacctcaagaccggg
aggccatccagcacgagagcggcatcctgggccccctgctgtacggcgaagtgggacgac
acactgctgatcatcttaagaaccaggccagccggccctacaacatctacccccacggca
tcaccgacgtgcggccccctgtacagcaggcggctgccaagggcgtgaagcacctgaag

Figura 22 A

gacttccccatcctgcccggcgagatcttcaagtacaagtgaccgtgaccgtggaggacg
 gccccaccaagagcgaccccagatgcctgacccggtactacagcagcttcgtgaacatgg
 aacgggacctggcctccgggtgatcggacctctgctgatctgctacaaagaaagcgtgga
 ccagcggggcaaccagatcatgagcgcacaagcggaacgtgatcctgttcagcgtgttcgat
 gagaaccggctcctggatctgaccgagaacatccagcggttctgccaaccctgccgggggt
 gcagctggaagatcccagttccaggccagcaacatcatgcactccatcaatggctacgtgt
 tcgacagcctgcagctgtccgtgtgtctgcacgaggtggcctactggtacatcctgagcatcg
 gcgcccagaccgacttctgagcgtgttcttcagcggctacacctcaagcacaagatggtgt
 acgaggacaccctgaccctgtcccttcagcggcgagaccgtgttcagcatggaaaac
 cccggcctgtggatcctgggctgccacaacagcgaactccggaaccggggcatgaccgcc
 ctgctgaaggtgtccagctgcgacaagaacaccggcgactactacgaggacagctacgag
 gatatcagcgcctacctgctgtccaagaacaacgccatcgagcccagaagcttcagccag
 aacagccggcaccaccagcaccggcagaagcagttcaacgccacccccctgtgtgaa
 gcggcaccagagagagatcaccggaccaccctgcagtccgaccaggaagagatcgatt
 acgacgacaccatcagcgtggagatgaaaaagaagatttcgacatctacgacgaggac
 gagaaccagagccccggctctccagaagaaaaccggcactactttatcgccgccgtgg
 agcggctgtgggactacggcatgagcagcagccccacgtgctgcggaaccggggcccag
 agcggcagcgtgcccagttcaagaaagtgggtgtccaggaattcaccgacggcagcttca
 ccagcccctgtaccggggcgagctgaacgagcacctggggctgctggggccctacatca
 gggccgaagtggaggacaacatcatggtgacctccggaatcaggccagcagaccctact
 cttctacagcagcctgatcagctacgaagaggaccagcggcagggcgctgaacccgg
 aagaactcgtgaagcccaatgagaccaagacctacttctggaaagtgcagcaccacatg
 gccccaccaaggacgagttcgactgcaaggcctgggcctacttcagcgacgtggatctgg
 aaaaggacgtgcactctggactgattggccctctgctggtgtgccaccaaacacctgaac
 cccgccacggccggcaggtgaccgtgcaggaattcgccctgttcttcacatcttcgacga
 gaccaagtctgttacttcaccgagaatatggaacggaactgcagagccccctgcaacatc

Figura 22 B

cagatggaagatcctacctcaagagaactaccggtccacgccatcaacggctacatcat
ggacaccctgcctggcctggtgatggcccaggaccagaggatccgggtgatctgctgtcca
tgggcagcaacgagaatatccacagcatccacttcagcggccacgtgtcaccgtgaggaa
gaaagaagagtacaagatggccctgtacaacctgtaccccggtgttcgagaccgtgga
gatgctgccagcaaggccggcatctggcgggtggagtgtctgatcggcgagcacctgcat
gccgggatgagcacctgtttctggtgtacagcaacaagtgccagacccccctgggcatgg
ccagcggccacatccgggacttcagatcaccgcctccggccagtcaggccagtgggccc
ccaagctggccccggtgactacagcggcagcatcaacgcctggtccaccaagagccct
tcagctggatcaaggtggacctgctggcccctatgatcatccacggcattaagaccagggc
gccaggcagaagttcagcagcctgtacatcagccagttcatcatcatgtacagcctggacgg
caagaagtggcagacctaccggggcaacagcaccggcaccctgatggtgttcttcggcaa
cgtggacagcagcggcatcaagcacaacatctcaaccccccatcatgcccggfacatc
cggctgcacccccaccactacagcatcagatccaccctgaggatggaactgatgggctg
acctgaactcctgcagcatgcctctggcatggaaagcaaggccatcagcgacgcccaga
tcacagccagcagctacttcaccaacatgttcgccacctggtccccctcaaggccaggctg
cacctgcagggccggtccaacgcctggcggcctcaggtgaacaaccccaagaatggct
gcaggtggactttcagaaaaccatgaaggtgaccggcgtgaccaccagggcgtgaaaa
gcctgctgaccagcatgtacgtgaaagagtttctgatcagcagcagccaggacggccacca
gtggaccctgttcttcagaacggcaaggtgaaagtgtccagggcaaccaggactcctcac
ccccgtggtgaactccctggacccccctgctgaccgcctacctgaggatccacccccagt
cttgggtgcaccagatgcacctgaggatggaagtgtgggatgtgaggcccaggatctgtac
tga**CTCGAGGGGTGGCCACTGCAGCACCTGCCACTGCCGTCA**
CCTCTCCCTCCTCAGCTCCAGGGCAGTGTCCCTCCCTGGCTT
GCCTTCTACCTTTGTGCTAAATCCTAGCAGACACTGCCTTGAA
GCCTCCTGAATTAATATCATCAGTCCTGCATTTCTTTGGTGG
GGGGCCAGGAGGGTGCATCCAATTTAACTTAACTCTTACCTA
TTTTCTGCAGGGGATCTCAGTCGACGAGCTC

Figura 22 C

atgcagatcgagctgagctacctgcttttctctgcctgctgcggtctgcttcagcgccaccggc
 ggtactacctggcgccgtggagctgagttgggactacatgcagagcgacctggcgagctg
 cccgtggacgcccgggtccccctcgggtgcccagagctccccctcaacaccagcgtggg
 tacaagaaaaccctgttcgtggagttcacctgacacgttcaacatcgccaagcccaggccc
 ccctggatggcctgctgggcccaccatccaggccgaggtgtacgacaccgtggtgatcac
 cctgaagaacatggccagccaccctgagcctgcacgcccgtggcgctgagctactggaag
 gccagtgagggcgccgagctacgacgaccagaccagccagcgggagaaagaggacgac
 aaggtttccctggcgccagccacacctacgtgtggcaggtcctgaaagaaaacggccccat
 ggctccgaccccctgtgctgacctacagctacctgagccacgtggacctggtcaaggacct
 gaacagcggcctgatcggcgctgctggtctgccgggagggcagcctggccaaagagaa
 aaccagaccctgcacaagttcatcctgctgttcgctgttcgacgagggcaagagctggca
 cagcgagaccaagaacagcctgatgcaggaccgggacgccgcccagcgcctcgcgctggc
 ccaagatgcacaccgtgaacggatacgtgaaccggctccctgcccgggctgatcggctgcca
 ccggaagagcgtgtactggcacgtgatcggcatgggcaccacgcccagggtgcacagcatc
 ttctcgagggccacaccttctcgtgcggaaccaccggcaggccagcctcgagatcagccc
 catcaccttctcaccgcccagacgctgctgatggacctgggcccagttcctgcttctgcccaca
 tcagctcgaccagcagcagcggcatggaagcctacgtgaaggtggacagttgccccgagga
 accccagctgcggatgaagaacaacgaggaagccgaggattacgacgacgacctgaccg
 acagcgagatggacgtggtgctgacgacgacaacagccccagcttcatccagatccg
 gtccgtggccaagaagcaccccaagacctgggtgcaactacatcgccgcccaggaagagga
 ctgggactacgccccctggtgctggccccgacgaccggctcctacaagagccagctaccta
 acaacgggcccagcggatcggccggaagtacaagaaagtgcggtcatggcctacaccg
 acgagaccttaagacccgggaggccatccagcagagagcggcatcctgggccccctgct
 gtacggcgaggtcggcgacaccctgctgatcatctcaagaaccaggccagccggccctac
 aacatctacccccacggcatcaccgacgtgcggcccctgtacagcaggcggctgcccagg
 gcgtgaagcacctgaaggacttccccatcctgcccggcgagatctcaagtaagaagtgacc

Figura 23 A

gtgaccgtggaggacggccccaccaagagcgacccccgctgcctcaccgggtactacagc
agcttcgigaacatggagcgggacctggcctccggcctcatcgggcccctgctcatctgtaca
aagaaagcgtggaccagcgggcaaccagatcatgagcgacaagcggaacgfgatcctgt
tctcgggttcgacgagaaccggagttggtatctgacggagaacatccagcgggtcctcccaa
ccctgccggcgtgcagctcaggaccgagttccaggccagcaacatcatgactccatca
atggctacgtgttcgacagcctgcagctgtccgtgtgcctccacgagggtggcctactggtacatc
ctgagcatcggcggccagaccgacttctgagcgtgttctcagcggctacacctcaagcaca
agatgggtgacgaggacacctgacctgttccggttcagcggcgagaccggttcatgagcat
ggaaaacccccggcctgtggatcctgggtgccacaacagcgaactccggaaccggggcatg
accgccctgtgaaggtgtccagctgcgacaagaacaccggcgactactacgaggacagct
acgaggacatcagcgcctacgtgtccaagaacaacgccatcgagccccggfcttcagc
cagaacagccggcaccacagcaccggcagaagcagttcaacgccacccccctgtgctg
aagcggcaccagcgcgagatcaccggaccacctgcagtccgaccaggaagagatcga
ctacgacgacaccatcagcgtggagatgaagaaaggacttcgacatctacgacgagga
cgagaaccagagcccccgagctccagaagaaaacccggcactactcatcgccgcggtg
gagcggctgtgggactacggcatgagcagcagccccacgtgctgcggaaccggggccag
agcggcagcgtgccccagttcaagaaagtgggtgtccaggaattcaccgacggcagcttac
ccagccccgtaccggggcgagctgaacgagcacctggggtgctggggccctacatccgc
gcgagggtggaggacaacatcatggtgacctccggaaccaggcctcccgccctactcctc
tacagcagcctgatcagctacgaaggaccagcggcagggcgggagccccggaaga
acttcgtgaagcccaacgagaccaagacctacttctggaaggtgcagcaccacatggcccc
caccaaggacgagttcgaactgcaaggcctgggctacttcagcgcagtggtgacctcgagaag
gacgtgcactccgggctcatcggcccgtcctcgtgtgccacaccaacacctgaacccccgc
ccacggccggcaggtgacctgcaggaattcgccctgttcttaccatcttcgacgagaccaa
gtcgtggacttcaccgagaacatggaacgcaactgcagggccccctgcaacatccagatgg
aagatcccacctcaaagagaactaccggtccacgccatcaacggctacatcatggacacc
ctgcccggtggtgatggcccaggaccagcgcacccggtggtatctgctgtccatgggcagc

Figura 23 B

aacgagaacatccacagcatccactfcagcggccacgtgtcaccgtccggaagaaagaag
 agtacaagatggccctgtacaacctgtacccccggcgtgttcgagaccgtggagatgctgccca
 gcaaggccggcatctggcgggtggagtgctgatcggggagcacctccacgccggcatgtc
 caccctgttctcgtgtacagcaacaagtgccagacccccctgggcatggccagcggccaca
 tccgggacttcagatcaccgcctccggccagtagcggccagtgggccccaagctggcccg
 gctgactacagcggcagcatcaacgcctggtccaccaagagcccttcagctggatcaag
 gtggacctgctcgtcccccattgatcatccacgggatcaagaccaggggccaggcagaagt
 tcagcagcctgtacatcagccagttcatcatcatgtacagcctggacggcaagaagtggcag
 acctaccggggcaacagcaccggcaccctgatggtgttcttcggcaacgtggacagcagcg
 gcatcaagcacaacatcttcaaccccccatcatcgtcccggtacatccgggtgcaccccacc
 cactacagcatccgggtccaccctgcggtatggaactgatgggctgcgacctgaactcctgcag
 catgcccctggggatggaaagcaaggccatcagcgcacgcccagatcacggccagcagcta
 cttaccaacatgttcgccacctggtccccctcaaggcccgcctgcacctgcagggccggtc
 caacgcctggcggcctcaggtcaacaaccccaagagtggtgcaggtgacttcagaaa
 accatgaaggtgaccggcgtgaccaccaggggggtgaagagcctgctgaccagcatgtac
 gtgaaagagttcctcatcagcagcagccaggacggccaccagtggtgacgtgttcttcagaa
 cggcaaggtcaaggtgttcagggaaccaggacagtttcacgcccgtggtgaactccctgg
 accccccctgctgaccgctacctgcggtaccacccccagagctgggtccaccagatcgcc
 ctgcgatggaagtctcggctgcgaggcgcaggacctgtactga**CTCGAGGGGTG**
GCCACTGCAGCACCTGCCACTGCCGTCACCTCTCCCTCCTCAG
CTCCAGGGCAGTGTCCCTCCCTGGCTTGCCTTCTACCTTTGTG
CTAAATCCTAGCAGACACTGCCTTGAAGCCTCCTGAATTAAT
ATCATCAGTCCTGCATTTCTTTGGTGGGGGGCCAGGAGGGTGC
ATCCAATTTAACTTAACTCTTACCTATTTTCTGCAGGGGATCTC
AGTCGACGAGCTC

Figura 23C

Consulta	361	TTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAGCTCGATGTAAACAATGTAACATTAAGAATGGCAGA	420
Asunto	361	TTGGCTTCGAGGGCAAAGAACTGGAGCTGGACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGCCCGC	420
Consulta	421	TGCGAGCAGTTTTGTAAAAAATAGTGTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCGTACTGAGGGA	480
Asunto	421	TGCGAGCAGTTCTGCAAAGAACAGCGCCGACAAACAAGTGGTGTGTAGCTGCACCGAGGGC	480
Consulta	481	TATCGACTTGCAGAAAACCAGAAAGTCTGTGAAACCAGCAGTGCCTATTTCCATGCGGCCGC	540
Asunto	481	TACAGACTGGCCGAGAACCCAGAAGAGCTGGGAGCCCGCCGTGCCCTTCCCTGCGGCAGA	540
Consulta	541	GTTTCTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGTGATGTGGAC	600
Asunto	541	GTGAGCGTGTCCAGACCAGCAAGCTGACCAGAGCCGAGACCGTGTTCGCCGACGTGGAC	600
Consulta	601	TATGTAATTTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCCAATCA	660
Asunto	601	TACGTGAATAGCACCCGAGCCGAGACCATCTCTGGACAACATCACCCAGAGCACCCAGTCC	660
Consulta	661	TTTAAATGACTTCACCTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGG	720
Asunto	661	TTCAAACGACTTCACCAGAGTTGTGGGCGGAGGACGCCAAAGCCCGGCGCAGTTCCTTGG	720

Figura 24B

Consulta	721	CAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAA	780
Asunto	721	CAGGTGGTGTGAACGGCAAAAGTGGATGCCCTTCTGCGGGCGGACGATCGTGAACGAGAAG	780
Consulta	781	TGGATTGTAACCTGCTGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAAATTACAGTTGTGCGCAGGT	840
Asunto	781		
		TGGATCGTGACAGCCGCCCACTGCGTGGAGACCCGGCGTGAAGATCACCCGTGGTGGCCGGC	840
Consulta	841	GAAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATT	900
Asunto	841		
		GAAACATAATATCGAGGAGACCGGACACACCCGAGCAGAGCGGAACGTCAATCCGGATTATC	900
Consulta	901	CCTCACCACTACTACAATGCAGCTAATTAATAAGTACAACCAATGACATTGCCCTTCTGGAA	960
Asunto	901		
		CCCCACCACAACACTACAACGCCGCCCATCAACAAGTACAACCAACGACATCGCCCTGTGGAG	960
Consulta	961	CTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCAATTTGTCACAAGGAA	1020
Asunto	961		
		CTGGACGAGCCTCTGGTGTGAATAGCTACGTGACCCCCCATCTGCATCGCCCGACAAGGAG	1020
Consulta	1021	TACACGAACATCTTCCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTC	1080
Asunto	1021		
		TACACCAACATCTTCCCTGAAGTTCGGCAGCGGGCTACGTGTCCGGCTGGGGCAGAGTGTTC	1080

Figura 24 C

Consulta	1081	CACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCITCAGTACCTTAGAGTTCCACITTTGTTGACCGAGCC	1140
Asunto	1081	CACAAAGGCAGAAAGCCCTGGTGTGCAGTACCTGAGAGTGCCCCCTGGTGGACAGAGCC	1140
Consulta	1141	ACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCAT	1200
Asunto	1141	ACCTGCCTGAGGAGCACCAAGTTCACCATCTACAACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCAC	1200
Consulta	1201	GAAGGAGGTAGAGATTCAATGTCAAGGAGATAGTGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAA	1260
Asunto	1201	GAGGGCGCAGAGACAGCTGCCAGGGCGACAGGGGGACCCACCGTGACCGAAGTGGAG	1260
Consulta	1261	GGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAA	1320
Asunto	1261	GGCACCAGCTTCCGTGACCCGGCATCATCAGCTGGGGCGGAGGAGTGGCCCATGAAGGGCAAG	1320
Consulta	1321	TATGGAATATATACCAAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCT	1379
Asunto	1321	TACGGCATCTACACCAAAGTGAGCCCGGTACGTGAACTGGATCAAGGAGAAAAACAAGCT	1379

Figura 24D