

CAPÍTULO REIVINDICATORIO

1. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX humano, en la que dicho ácido nucleico es al menos 80% idéntico a la SEQ ID NO: 10 y al menos un dinucleótido CpG menos en comparación con una secuencia de tipo natural que codifica el Factor IX humano.
2. Un vector de expresión o plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX humano, donde dicho ácido nucleico es al menos 80% idéntico a la SEQ ID NO: 10 y al menos un dinucleótido CpG menos en comparación con la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano y/o en el que si una o más secuencias adicionales a la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor IX humano están presentes en dicho vector o plásmido, dichas secuencias adicionales tienen opcionalmente un número reducido de dinucleótidos CpG en comparación con una secuencia homóloga o de contraparte nativa.
3. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de Factor IX humana de la Reivindicación1, el vector de expresión de la Reivindicación2, que comprende además un intrón, un elemento de control de expresión, una o más repeticiones de terminal invertido (ITRs) del virus adenoasociado (AAV) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno, opcionalmente en el que dicho intrón, elemento de control de expresión, repeticiones de terminal invertido (ITRs) del virus adenoasociado (AAV) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno tiene al menos un dinucleótido CpG menos en comparación con un elemento de control de expresión de contraparte o de tipo natural, repeticiones de terminal invertido del virus adenoasociado (IAV) y/o una secuencia de polinucleótidos de relleno.
4. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de Factor IX humano de la Reivindicación 3, en la que el intrón está dentro de la secuencia que codifica la proteína del Factor IX humano, o en la que el elemento de control de la expresión está operativamente ligado a la secuencia que codifica la proteína del Factor IX humano ITR, o en la que AAV ITR(s) flanquean el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica la proteína del Factor IX humano, o en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno flanquea el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica la proteína del Factor IX humano.

5. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 2-5 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

6. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 5-10 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

7. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 10-15 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

8. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 15-20 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

9. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 20-25 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

10. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de

relleno tiene 25-30 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

11. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 30-40 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

12. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno tiene 40-55 menos dinucleótidos CpG que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano.

13. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana, el intrón, el elemento de control de expresión, ITR(s) y/o la secuencia de polinucleótidos de relleno está desprovista de cualquier dinucleótido CpG .

14. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana comprende una secuencia con 85% o más de identidad con la SEC ID NO: 10, y codifica el Factor IX funcional determinado por ensayo de coagulación.

15. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana comprende una secuencia con un 90% o más de identidad con la SEC ID N°: 10, y codifica el Factor IX funcional determinado por ensayo de coagulación.

16. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana comprende una secuencia con una identidad del 95% o más con la SEC ID N°: 10, y codifica el Factor IX funcional determinado por ensayo de coagulación.

17. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana comprende las SEC ID Nos: 10, 25 o 26.
18. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, en la que la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO: 11.
19. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 3-18, en la que la secuencia del intrón comprende la secuencia establecida en la SEC ID NO: 17.
20. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 2-19, en la que el elemento de control de la expresión comprende una secuencia potenciadora que comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 14.
21. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 2-19, en la que el elemento de control de la expresión comprende una secuencia promotora que comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 15.
22. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 3-21, en la que la secuencia de la una o más repeticiones de terminal invertido (ITRs) del virus adenoasociado (AAV) comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 13 y/o SEC ID NO: 20.
23. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 3-22, en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno comprende una secuencia establecida como SEC ID NO: 21.
24. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana tiene una capacidad reducida para inducir una respuesta inmune.

25. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-24, en la que la secuencia que codifica la proteína FIX humana se expresa a niveles mayores que o equivalentes a la secuencia nativa que codifica el Factor IX humano que no tiene un número reducido de dinucleótidos CpG .
26. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX humano de cualquiera de las Reivindicaciones 2-25, en la que el elemento de control de expresión comprende un elemento de control constitutivo o regulable, o un elemento o promotor de control de expresión específico de tejido.
27. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX humano de cualquiera de las Reivindicaciones 2-26, en la que el elemento de control de la expresión comprende un elemento que confiere una expresión en el hígado.
28. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 2-27, en la que el elemento de control de la expresión comprende un promotor α 1-anti-tripsina humano (hAAT) y/o apolipoproteína E (ApoE) HCR-1 y/o Potenciador de HCR-2.
29. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína del Factor IX humano de cualquiera de las Reivindicaciones 1-28, que comprende además una secuencia de poliadenilación localizada en 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor IX humano.
30. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína del factor IX humano de la Reivindicación 29, en la que la secuencia de poliadenilación se localiza en 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor IX humano comprende una secuencia de poliadenilación de bGH.
31. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de la Reivindicación 29, en la que la secuencia de poliadenilación localizada en 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor IX humano comprende una secuencia de poliadenilación que tiene todos los dinucleótidos CpG eliminados de la misma.

32. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de la Reivindicación 31, en la que la secuencia de poliadenilación comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 19.

33. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 3-32, en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno está localizada en 3' de la secuencia que codifica la proteína FIX humana.

34. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 3-33, en la que las ITR(s) de AAV flanquean el extremo 3' de la secuencia que codifica la proteína FIX humana.

35. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de la Reivindicación 34, en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno está localizada en 3' de las ITR(s) de AAV que flanquea el extremo 3' de la secuencia que codifica la proteína FIX humana.

36. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 3-35, en la que la secuencia de polinucleótidos de relleno comprende una secuencia de fago lambda.

37. Una secuencia de plásmido que codifica la proteína FIX humana que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-36, que comprende además uno o más orígenes de replicación y/o un ácido nucleico que codifica resistencia a un antibiótico.

38. Una secuencia de plásmido que codifica la proteína FIX humana que comprende la SEC ID NO: 12 o 26.

39. Un vector viral que comprende la secuencia que codifica la proteína FIX humana o el vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-5.

40. El vector viral de acuerdo con la Reivindicación 39, en el que dicho vector viral es un vector lenti o adenoviral.
41. El vector viral de acuerdo con la Reivindicación 39, en el que dicho vector viral es un vector viral adenoasociado (AAV).
42. El vector de AAV de la Reivindicación 41, que comprende una secuencia ITR de cualquiera de: serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 AAV.
43. Vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia de la cápside VP1, VP2 y/o VP3 que tiene un 90% o más de identidad con secuencias AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 VP1, VP2 y/o VP3.
44. El vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia de la cápside VP1, VP2 o VP3 seleccionada entre cualquiera de: serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 o AAV-2i8 AAV.
45. El vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia VP1 que tiene un 90% o más de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 1, o 1-50 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos a la misma; una secuencia VP2 que tiene un 90% o más de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 2, o 1-50 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos a la misma; y/o una secuencia de VP3 que tiene un 90% o más de identidad de secuencia con la SEC ID NO: 3, o 1-50 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos a la misma.
46. El vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector tiene una sustitución de aminoácidos en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 o 202 de la secuencia de la cápside de VP1 establecida como SEC ID NO: 1, o una sustitución de aminoácido de una arginina por una lisina en la secuencia de la cápside VP1 establecida como SEC ID NO: 1.

47. El vector de AAV de acuerdo con la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector tiene residuos de cualquiera de los aminoácidos A, V, P o N en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 o 202 del conjunto de secuencias de la cápside VP1 establecida como SEC ID NO: 1.

48. El vector de AAV de la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector tiene un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de la cápside VP1 establecida como SEC ID NO: 1.

49. El vector de AAV de la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector tiene dos, tres o cuatro de un resto A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de la cápside VP1 establecida como SEC ID NO: 4.

50. El vector de AAV de la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia de la cápside de VP1 que tiene una identidad del 90% o más con cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-9.

51. El vector de AAV de la Reivindicación 41, en el que la secuencia de la cápside del vector comprende una secuencia de la cápside de VP1 que comprende cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-9.

52. Una composición farmacéutica que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína FIX humana de cualquiera de las Reivindicaciones 1-38 y/o un vector viral de las Reivindicaciones 39-51.

53. La composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 52, que comprende además una cápside vacía de AAV.

54. La composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 53, en la que dicha cápside vacía se selecciona de serotipo AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 y AAV11.
55. Un vector de expresión que comprende la SEC ID NO: 11 o la SEC ID NO: 25.
56. El vector de expresión de la Reivindicación 55, que comprende además una secuencia potenciadora que comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 14.
57. El vector de expresión de la Reivindicación 55, que comprende además una secuencia promotora que comprende la secuencia establecida como SEC ID NO: 15.
58. El vector de expresión de la Reivindicación 55, que comprende adicionalmente una ITR de AAV2 corriente arriba y/o corriente abajo como se establece en la SEC ID NO: 12 o 26, en el que dicha ITR corriente arriba está posicionada en 5' del potenciador y/o dicha ITR AAV2 corriente abajo está posicionada en 3' de los exones hFIX 2-8 establecidos en la SEC ID NO: 12 o 26.
59. El vector de expresión de la Reivindicación 55, que comprende además una secuencia poliA situada en 3' de los exones hFIX 2-8 como se establece en la SEC ID NO: 12 o 26 y posicionada en 5' de AAV2 ITR.
60. Un vector de AAV que comprende el vector de expresión de cualquiera de las Reivindicaciones 55-59.
61. El vector de AAV de la Reivindicación 60, en el que la secuencia de la cápside comprende una secuencia de la cápside de VP1 que comprende cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-9.
62. Un vector de AAV recombinante para tratar la hemofilia B, que comprende una cápside y un genoma, en el que dicha cápside comprende una proteína VP1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4; y en el que dicho genoma es monocatenario y comprende los siguientes elementos en orden de 5' a 3':
- (a) un primer ITR AAV2,

- (b) un potenciador ApoE HCR-1,
- (c) un promotor de AAT,
- (d) un ácido nucleico optimizado en codones que codifica un Factor IX Padua humano, en el que el ácido nucleico carece por lo menos de un dinucleótido CpG presente de otro modo,
- (e) una secuencia de poliadenilación; y
- (f) un segundo AAV2 ITR.

63. El vector rAAV de la Reivindicación 62, en el que

- (a) la secuencia de ácido nucleico de la primera ITR de AAV2 consiste en los nucleótidos 1-141 de la SEC ID NO: 12,
- (b) la secuencia de ácido nucleico de dicho potenciador de ApoE HCR-1 consiste en los nucleótidos 152-472 de la SEC ID NO: 12,
- (c) la secuencia de ácido nucleico de dicho promotor ATT consiste en los nucleótidos 482-878 de la SEC ID NO: 12,
- (d) la secuencia de ácido nucleico de dicho ácido nucleico que codifica la variante de Factor IX de Padua humana consiste en los nucleótidos 908-3731 de la SEC ID NO: 12,
- (e) la secuencia de ácido nucleico de dicha secuencia de poliadenilación consiste en los nucleótidos 3820-4047 de la SEC ID NO: 12; y
- (f) la secuencia de ácido nucleico de dicha segunda ITR de AAV2 consiste en los nucleótidos 4097-4204 de la SEC ID NO: 12.

64. El vector de rAAV de la Reivindicación 63, en el que el genoma comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente a los nucleótidos 1-4204 de la SEC ID NO: 12.

65. Una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico contigua idéntica a la secuencia de ácido nucleico de 1-4204 de la SEC ID NO: 12.

66. La célula huésped de la Reivindicación 122, que comprende además la proteína rep de AAV, la proteína de la cápside de AAV y la(s) proteína(s) auxiliar(es) de adenovirus.

67. La célula huésped de la Reivindicación 123, en la que la proteína de la cápside de AAV comprende la SEC ID N°: 4, o una secuencia que tiene una identidad del 90% o más con la misma.

68. La célula huésped de la Reivindicación 123, en la que la célula huésped expresa la proteína FIX Padua.

69. Un método para producir un vector de AAV que comprende la secuencia de ácido nucleico de 1-4204 de la SEC ID NO: 12, que comprende cultivar una célula huésped de la Reivindicación 123 en condiciones que permiten el empaquetamiento de la secuencia de ácido nucleico de 1-4204 de la SEQ ID NO: 12 en partículas de AAV produciendo de este modo el vector AAV.

70. El método de la Reivindicación 69, que comprende además purificar o aislar el vector de AAV así producido.

71. Un vector de AAV producido mediante el método de la Reivindicación 70.

72. Un vector de AAV aislado o purificado producido por el método de la Reivindicación 72.

SAR\SAR\ID-553892\WPC21563