

USO DE VECTORES LENTIVIRALES QUE EXPRESAN EL FACTOR IX

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. con No. de Serie 62/776.393, presentada el
5 6 de diciembre, 2018, cuya descripción completa se incorpora por la presente en la presente memoria por referencia.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS ENVIADO

ELECTRÓNICAMENTE

El contenido del listado de secuencias enviado electrónicamente en
10 archivo de texto ASCII (Nombre: SA9-468TW_SequenceListing_ST25; Tamaño: 28.470 bites; y Fecha de Creación: 2 de diciembre, 2019) se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA DESCRIPCIÓN

La ruta de coagulación de la sangre implica, en parte, la formación de
15 un complejo enzimático del Factor VIIIa (FVIIIa) y el Factor IXa (FIXa) (complejo Xasa) en la superficie de las plaquetas. El FIXa es una serina proteasa con una actividad catalítica relativamente débil sin su cofactor FVIIIa. El complejo Xasa escinde el Factor X (FX) en el Factor Xa (FXa), que, a su vez, interacciona con el Factor Va (FVa) para escindir la
20 protrombina y generar trombina. La hemofilia B es un trastorno hemorrágico causado por mutaciones y/o deleciones en el gen de FIX que dan lugar a una deficiencia de la actividad de FIX.

En la hemofilia, la coagulación de la sangre está alterada por una ausencia de determinados factores de coagulación de la sangre en plasma.
25 La hemofilia B (también conocida como enfermedad de Christmas) es uno de los trastornos hemorrágicos hereditarios más comunes en el mundo. Está causada por una deficiencia en el Factor IX que puede producirse bien por la síntesis disminuida de la proteína Factor IX o por una molécula defectuosa con una actividad reducida. Da lugar a una actividad de coagulación de la
30 sangre disminuida *in vivo* e *in vitro* y requiere una monitorización médica

exhaustiva a lo largo de la vida del individuo afectado. Sin una profilaxis efectiva, las hemartrosis recurrentes dan lugar al desarrollo de una artropatía progresiva y discapacitante y a una baja calidad de vida (Giangrande P., Expert Opin Pharmacother. 2005; 6:1517-24).

5 El tratamiento de la hemofilia B se produce por el reemplazo del factor de coagulación ausente por concentrados de factor exógenos altamente enriquecidos en el Factor IX. Sin embargo, la generación de dicho concentrado a partir de la sangre está plagada de dificultades técnicas. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de una terapia de FIX que
10 supere las dificultades y limitaciones de las terapias de reemplazo actuales. La terapia génica constituye una estrategia potencial para un tratamiento duradero de la hemofilia B, mediante la integración estable de un casete de expresión de transgén que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX en el genoma de las células
15 diana.

BREVE EXPOSICIÓN DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción proporciona métodos para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto una dosis efectiva de un vector lentiviral que comprende una secuencia de
20 nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de factor IX (FIX), en donde el vector lentiviral se empaqueta en células HEK293T que sobreexpresan CD47 que comprenden un mayor nivel de expresión de la proteína CD47 en su superficie que un vector lentiviral control producido en células HEK293T no modificadas (ATCC® CRL-11268™), y en donde la
25 dosis efectiva se reduce en relación a una dosis control del vector lentiviral control necesaria para inducir la misma actividad de FIX que el vector lentiviral.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral control comprende 19 moléculas/ μm^2 de CD47 en la superficie del vector lentiviral control. En
30 algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos

aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2,0 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3,0 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4,0 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5,0 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6,0 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7,0 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8,0 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9,0 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que el vector lentiviral control producido en células HEK293T (ATCC® CRL-11268™).

En algunas realizaciones, la dosis efectiva es menos de aproximadamente 5×10^{10} unidades de transducción/kg (TU/kg), menos de 4×10^{10} TU/kg, menos de 3×10^{10} TU/kg, menos de 2×10^{10} TU/kg, menos de 1×10^{10} TU/kg, menos de 9×10^9 TU/kg, menos de 8×10^9 TU/kg, menos de 7×10^9 TU/kg, menos de 6×10^9 TU/kg, menos de 5×10^9 TU/kg, menos de 4×10^9 TU/kg, menos de 3×10^9 TU/kg, menos de 2×10^9 TU/kg, menos de 1×10^9 TU/kg, menos de aproximadamente 9×10^8 TU/kg, o menos de aproximadamente 8×10^8 TU/kg.

En algunas realizaciones, el sujeto presenta una o más de las siguientes propiedades después de la administración: (a) una transducción disminuida de macrófagos del vector lentiviral en relación al vector lentiviral control; (b) una respuesta inmune aloespecífica reducida frente al vector lentiviral en relación al vector lentiviral control; (c) una actividad de FIX de al

menos un 30%, en relación a la actividad de FIX normal al menos 3 semanas después de la administración; (d) una expresión específica de tejido del vector lentiviral en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo; y (e) cualquier combinación de (a)-(d).

5 En algunas realizaciones, la respuesta inmune aloespecífica comprende la liberación de una citoquina en respuesta al vector lentiviral. En algunas realizaciones, la citoquina se selecciona del grupo que consiste en MIP-1a, MIP-1b, MCP-1, y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MIP-1a
10 después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de MIP-1a después de la administración del vector lentiviral control. En algunas realizaciones, el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MIP-1b después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de MIP-1b después de la administración del vector lentiviral
15 control. En algunas realizaciones, el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MCP-1 después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de MCP-1 después de la administración del vector lentiviral control.

 En algunas realizaciones, el sujeto presenta una actividad de FIX de
20 al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 100%, al menos aproximadamente un 125%, al menos aproximadamente un 150%, al menos aproximadamente un 175%, al menos aproximadamente un 200%, al menos aproximadamente un 225%, al menos aproximadamente un 250%, al menos aproximadamente un 275%, o al menos aproximadamente un
25 300%, en relación a la actividad de FIX normal, al menos tres semanas después de la administración del vector lentiviral. En algunas realizaciones, el sujeto presenta una actividad de FIX de al menos aproximadamente un 150%, en relación a la actividad de FIX normal, al menos tres semanas después de la administración del vector lentiviral. En algunas realizaciones,
30 la actividad de FIX plasmática a las 24 horas a 48 horas después de la

administración del vector lentiviral se incrementa en relación a un sujeto al que se le administra la dosis control del vector lentiviral control. En algunas realizaciones, la actividad de FIX plasmática se incrementa después de la administración en al menos aproximadamente 2 veces, al menos

- 5 aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos
- 10 aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos
- 15 aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente
- 20 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces, al menos aproximadamente 180 veces, al menos aproximadamente 190 veces, o al menos aproximadamente 200 veces, en relación a un sujeto al que se le administra la dosis control del vector lentiviral control.

- En algunas realizaciones, el sujeto presenta una localización
- 25 incrementada del vector lentiviral en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto. En algunas realizaciones, la localización incrementada se caracteriza por un número de copias del vector (VCN) del vector lentiviral que es al menos
- 30 aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos

aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos
aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos
aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos
aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos
5 aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos
aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos
aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos
aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos
aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos
10 aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos
aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al
menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces,
al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150
veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente
15 170 veces, al menos aproximadamente 180 veces, al menos
aproximadamente 190 veces, o al menos aproximadamente 200 veces
mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la
administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del
hígado y el bazo en el sujeto. En algunas realizaciones, la localización
20 incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que es al menos
10 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo
después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano
distinto del hígado y el bazo en el sujeto. En algunas realizaciones, la
localización incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que
25 es al menos 50 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como
el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un
órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto. En algunas realizaciones, la
localización incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que
es al menos 100 veces mayor en el hígado, bazo o tanto en el hígado como
30 el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un
órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto.

En algunas realizaciones, la CD47 es una CD47 humana. En algunas realizaciones, la CD47 humana comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos un 85%, al menos

5 aproximadamente un 90%, al menos un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos un 99%, o aproximadamente un 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, el vector lentiviral no comprende un polipéptido MHC-I. En algunas realizaciones, el vector

10 lentiviral se produce en una célula huésped que expresa una alta concentración de la CD47 en comparación con las células HEK293T (ATCC® CRL-11268™).

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos

15 aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de

20 nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7.

La presente descripción también proporciona métodos para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto menos de 5×10^{10} unidades de transducción/kg (TU/kg) de un vector

25 lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de factor IX (FIX), en donde el vector lentiviral comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos

aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos

30 aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos

aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, la dosis es aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 4×10^{10} TU/kg, aproximadamente $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 3×10^{10} TU/kg, aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 2×10^{10} TU/kg, aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 1×10^{10} TU/kg, aproximadamente $9,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 9×10^9 TU/kg, aproximadamente $8,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 8×10^9 TU/kg,

aproximadamente $7,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 7×10^9 TU/kg,
aproximadamente $6,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 6×10^9 TU/kg,
aproximadamente $5,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 5×10^9 TU/kg,
aproximadamente $4,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 4×10^9 TU/kg,
5 aproximadamente $3,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 3×10^9 TU/kg,
aproximadamente $2,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 2×10^9 TU/kg,
aproximadamente $1,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 1×10^9 TU/kg,
aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 9×10^8 TU/kg,
aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 8×10^8 TU/kg,
10 aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 7×10^8 TU/kg,
aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 6×10^8 TU/kg,
aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 5×10^8 TU/kg,
aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 4×10^8 TU/kg,
aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 3×10^8 TU/kg,
15 aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 2×10^8 TU/kg,
aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg, o aproximadamente 1×10^8 TU/kg .En
algunas realizaciones, la dosis es menos de 5×10^{10} TU/kg, menos de
 $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 4×10^{10} TU/kg, menos de $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos
de 3×10^{10} TU/kg, menos de $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 2×10^{10} TU/kg, menos
20 de $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 1×10^{10} TU/kg, menos de $9,5 \times 10^9$ TU/kg,
menos de 9×10^9 TU/kg, menos de $8,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 8×10^9 TU/kg,
menos de $7,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 7×10^9 TU/kg, menos de $6,5 \times 10^9$ TU/kg,
menos de 6×10^9 TU/kg, menos de $5,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 5×10^9 TU/kg,
menos de $4,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 4×10^9 TU/kg, menos de $3,5 \times 10^9$ TU/kg,
25 menos de 3×10^9 TU/kg, menos de $2,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 2×10^9 TU/kg,
menos de $1,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 1×10^9 TU/kg, menos de
aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 9×10^8 TU/kg,
menos de aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente
 8×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de
30 aproximadamente 7×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg,
menos de aproximadamente 6×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente

5,5x10⁸ TU/kg, menos de aproximadamente 5x10⁸ TU/kg, menos de aproximadamente 4,5x10⁸ TU/kg, menos de aproximadamente 4x10⁸ TU/kg, menos de aproximadamente 3,5x10⁸ TU/kg, menos de aproximadamente 3x10⁸ TU/kg, menos de aproximadamente 2,5x10⁸ TU/kg, menos de aproximadamente 2x10⁸ TU/kg, menos de aproximadamente 1,5x10⁸ TU/kg, o menos de aproximadamente 1x10⁸ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis es entre 1x10⁸ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁸ y 5x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁸ y 1x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁸ y 1x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 2x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 3x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 4x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 5x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 6x10⁹ TU/kg, entre 2x10⁹ y 6x10⁹ TU/kg, entre 3x10⁹ y 6x10⁹ TU/kg, entre 4x10⁹ y 6x10⁹ TU/kg, entre 5x10⁹ y 6x10⁹ TU/kg, entre 6x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 7x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, 8x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 9x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 10¹⁰ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 1,5x10¹⁰ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 2x10¹⁰ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 2,5x10¹⁰ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 3x10¹⁰ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 3,5x10¹⁰ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 4x10¹⁰ y 5x10¹⁰ TU/kg, o entre 4,5x10¹⁰ y 5x10¹⁰ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis es entre 1x10⁹ y 5x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 4,5x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 4x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 3,5x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 3x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 2,5x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 2x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 1,5x10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 10¹⁰ TU/kg, entre 1x10⁹ y 9x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁹ y 8x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁹ y 7x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁹ y 6x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁹ y 5x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁹ y 4x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁹ y 3x10⁹ TU/kg, y entre 1x10⁹ y 2x10⁹ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis es entre 1x10¹⁰ y 2x10¹⁰ TU/kg, entre 1,1x10¹⁰ y 1,9x10¹⁰ TU/kg, entre 1,2x10¹⁰ y 1,8x10¹⁰ TU/kg, entre 1,3x10¹⁰ y 1,7x10¹⁰ TU/kg, o entre 1,4x10¹⁰ y 1,6x10¹⁰ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis es aproximadamente 4x10⁹ TU/kg a aproximadamente 6x10⁹ TU/kg.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral se administra como una dosis única o dosis múltiples. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se administra mediante inyección intravenosa. En algunas realizaciones, el

sujeto es un sujeto pediátrico. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto adulto.

En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de
5 identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un promotor específico de tejido. En algunas realizaciones, el promotor específico de
10 tejido aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana. En algunas realizaciones, el promotor específico de tejido que aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana comprende un promotor de APOA2, promotor de SERPINA1 (hAAT), promotor de mTTR, promotor
15 de MIR122, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la célula hepática diana es un hepatocito. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada se integra de manera estable en el genoma del hepatocito.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un sitio
20 donante de corte y empalme. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un sitio aceptor de corte y empalme. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia gag, una secuencia pol, una secuencia rev, un elemento de respuesta rev (RRE), o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la una secuencia gag
25 es una secuencia gag de longitud completa o truncada. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un potenciador, a secuencia diana para un microARN, un elemento regulador postranscripcional, una señal de empaquetamiento, una secuencia poli-A, una secuencia intrónica, o cualquier combinación de los mismos.

30 En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral se administra en

una vez o dividida en al menos dos subdosis. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral se repite al menos dos veces.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal. En algunas realizaciones, la
5 secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal tiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia con: (i) los nucleótidos 1-84 de la
10 SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende
15 además una secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido tiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia
20 con: (i) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un
25 polipéptido con actividad de FIX comprende además una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una secuencia de aminoácidos heteróloga. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos heteróloga es una albúmina, una región Fc de inmunoglobulina, una secuencia XTEN, el péptido C-terminal (CTP) de la subunidad β de la
30 gonadotropina coriónica humana, una secuencia PAS, una secuencia HAP,

una secuencia de péptido CTP, una transferrina, un resto de unión a albúmina, o cualesquiera fragmentos, derivados, variantes, o combinaciones de estos polipéptidos. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos heteróloga está unida al extremo N o al extremo C de la

5 secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX o está insertada entre dos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el resto heterólogo está insertado en el polipéptido con actividad de FIX inmediatamente aguas abajo de un aminoácido correspondiente al

10 aminoácido 103 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 105 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 142 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 149 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 162 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 166 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 174 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 224 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 226 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 228 de la SEQ ID NO: 2,

15 aminoácido 413 de la SEQ ID NO: 2, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el polipéptido FIX es una variante R338L del polipéptido FIX.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una célula huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped expresa CD47. En

20 algunas realizaciones, la célula huésped se modifica para sobreexpresar CD47. En algunas realizaciones, la célula huésped no expresa MHC-I. En algunas realizaciones, la célula huésped es CD47^{alta}/MHC-I⁻. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula HEK 293T CD47^{alta}/MHC-I⁻.

La presente descripción también proporciona vectores lentivirales que

25 comprenden una secuencia de nucleótidos que comprende (i) un promotor específico de tejido, y (ii) una secuencia de ácido nucleico como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde el promotor específico de tejido dirige la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula hepática.

La presente descripción también proporciona vectores lentivirales que

30 comprenden una secuencia de nucleótidos que comprende (i) un sitio

donante de corte y empalme; (ii) un sitio aceptor de corte y empalme; (iii) una secuencia gag; (iv) un elemento de respuesta Rev; (v) un potenciador; (vi) un elemento regulador postranscripcional, (vii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos

5 aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de

10 secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, y (viii) una secuencia diana para un microARN.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido con actividad de FIX, que comprende una secuencia de

15 aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12.

En algunas realizaciones, la superficie del vector lentiviral comprende

20 un nivel mayor de proteína CD47 que un vector lentiviral control producido en células HEK293T (ATCC® CRL-11268™). En algunas realizaciones, la superficie del vector lentiviral no comprende MHC-I.

La presente descripción también está dirigida a métodos para tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita, que comprenden administrar al sujeto

25 una dosis efectiva de un vector lentiviral descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la dosis efectiva es menos de aproximadamente 5×10^{10} unidades de transducción/kg (TU/kg), menos de 4×10^{10} TU/kg, menos de 3×10^{10} TU/kg, menos de 2×10^{10} TU/kg, menos de 1×10^{10} TU/kg, menos de 9×10^9 TU/kg, menos de 8×10^9 TU/kg, menos de 7×10^9 TU/kg, menos de

30 6×10^9 TU/kg, menos de 5×10^9 TU/kg, menos de 4×10^9 TU/kg, menos de

3×10^9 TU/kg, menos de 2×10^9 TU/kg menos de 1×10^9 TU/kg, menos de
 aproximadamente 9×10^8 TU/kg, o menos de aproximadamente 8×10^8 TU/kg.
 En algunas realizaciones, la dosis efectiva es aproximadamente 5×10^{10}
 TU/kg, aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 4×10^{10} TU/kg,
 5 aproximadamente $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 3×10^{10} TU/kg,
 aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 2×10^{10} TU/kg,
 aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 1×10^{10} TU/kg,
 aproximadamente $9,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 9×10^9 TU/kg,
 aproximadamente $8,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 8×10^9 TU/kg,
 10 aproximadamente $7,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 7×10^9 TU/kg,
 aproximadamente $6,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 6×10^9 TU/kg,
 aproximadamente $5,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 5×10^9 TU/kg,
 aproximadamente $4,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 4×10^9 TU/kg,
 aproximadamente $3,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 3×10^9 TU/kg,
 15 aproximadamente $2,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 2×10^9 TU/kg,
 aproximadamente $1,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 1×10^9 TU/kg,
 aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 9×10^8 TU/kg,
 aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 8×10^8 TU/kg,
 aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 7×10^8 TU/kg,
 20 aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 6×10^8 TU/kg,
 aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 5×10^8 TU/kg,
 aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 4×10^8 TU/kg,
 aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 3×10^8 TU/kg,
 aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 2×10^8 TU/kg,
 25 aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg, o aproximadamente 1×10^8 TU/kg. En
 algunas realizaciones, la dosis efectiva es menos de 5×10^{10} TU/kg, menos
 de $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 4×10^{10} TU/kg, menos de $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg,
 menos de 3×10^{10} TU/kg, menos de $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 2×10^{10} TU/kg,
 menos de $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 1×10^{10} TU/kg, menos de $9,5 \times 10^9$
 30 TU/kg, menos de 9×10^9 TU/kg, menos de $8,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 8×10^9
 TU/kg, menos de $7,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 7×10^9 TU/kg, menos de $6,5 \times 10^9$

TU/kg, menos de 6×10^9 TU/kg, menos de $5,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 5×10^9 TU/kg, menos de $4,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 4×10^9 TU/kg, menos de $3,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 3×10^9 TU/kg, menos de $2,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 2×10^9 TU/kg, menos de $1,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 1×10^9 TU/kg, menos de
 5 aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 9×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 8×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 7×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 6×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente
 10 $5,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 5×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 4×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 3×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 2×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg,
 15 o menos de aproximadamente 1×10^8 TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis efectiva es entre 1×10^8 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^8 y 5×10^9 TU/kg, entre 1×10^8 y 1×10^9 TU/kg, entre 1×10^8 y 1×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 2×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 3×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 4×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 5×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre
 20 2×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 3×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 4×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 5×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 6×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 7×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, 8×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 9×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $1,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg, entre 2×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $2,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg, entre 3×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $3,5 \times 10^{10}$ y
 25 5×10^{10} TU/kg, entre 4×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, o entre $4,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis efectiva es entre 1×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 4×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 3×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 2×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 10^{10}
 30 TU/kg, entre 1×10^9 y 9×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 8×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 7×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 5×10^9 TU/kg, entre

1x10⁹ y 4x10⁹ TU/kg, entre 1x10⁹ y 3x10⁹ TU/kg, y entre 1x10⁹ y 2x10⁹ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis efectiva es entre 1x10¹⁰ y 2x10¹⁰ TU/kg, entre 1,1x10¹⁰ y 1,9x10¹⁰ TU/kg, entre 1,2x10¹⁰ y 1,8x10¹⁰ TU/kg, entre 1,3x10¹⁰ y 1,7x10¹⁰ TU/kg, o entre 1,4x10¹⁰ y 1,6x10¹⁰ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis efectiva es aproximadamente 4x10⁹ TU/kg a aproximadamente 6x10⁹ TU/kg.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral se administra como una dosis única o dosis múltiples. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se administra mediante inyección intravenosa. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto adulto.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1. La presente descripción también está dirigida a vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el vector comprende un promotor específico de tejido. En algunas realizaciones, el promotor específico de tejido aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana. En algunas realizaciones, el promotor específico de tejido que aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana comprende un promotor de APOA2, promotor de SERPINA1 (hAAT), promotor de mTTR, promotor de MIR122, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la célula hepática diana es un hepatocito.

En algunas realizaciones, el vector comprende un sitio donante de corte y empalme. En algunas realizaciones, el vector comprende un sitio aceptor de corte y empalme. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia gag, una secuencia pol, una secuencia rev, un elemento de respuesta rev (RRE), o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la secuencia gag es una secuencia gag de longitud completa o truncada. En algunas realizaciones, el vector comprende un potenciador,

una secuencia diana para un microARN, un elemento regulador postranscripcional, una señal de empaquetamiento, una secuencia poli-A, una secuencia intrónica, o cualquier combinación de los mismos.

La presente descripción también está dirigida a una célula que

5 comprende una secuencia de ácido nucleico o un vector descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula CHO, una célula HEK293, una célula BHK21, una célula PER.C6®, una célula NS0, y una célula CAP. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En

10 algunas realizaciones, la célula expresa una proteína CD47. En algunas realizaciones, la célula se modifica para sobreexpresar CD47. En algunas realizaciones, la célula comprende al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2,0 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3,0 veces, al menos

15 aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4,0 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5,0 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6,0 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7,0 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos

20 aproximadamente 8,0 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9,0 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces,

25 al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces más de proteína CD47 en la superficie de la célula en comparación con una célula control que no se modifica para sobreexpresar CD47. En algunas realizaciones, la CD47 es una CD47

30 humana. En algunas realizaciones, la célula no expresa MHC-I.

La presente descripción también está dirigida a métodos para producir un vector lentiviral que comprenden cultivar una célula descrita en la presente memoria en condiciones adecuadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La FIG. 1 es un mapa de vector de un vector lentiviral ("LV-coFIX-1-R338L") que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX.

Las FIG. 2A-2B son representaciones gráficas de la actividad de FIX plasmática para ratones HemB después de la administración a las ocho
10 semanas de edad de un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX. La FIG. 2A muestra la actividad de FIX plasmática de LV-coFIX-1-R338L administrado mediante inyección en la vena de la cola a una dosis de 3E9, 7,5E9, 2E10, o 6E10 TU/kg, y FIG. 2B muestra la curva de respuesta a la dosis
15 correspondiente. Las barras de error representan la desviación estándar (FIG. 2B).

Las FIG. 3A-3B son representaciones gráficas de la actividad de FIX plasmática (FIG. 3A) y antígeno FIX plasmático (FIG. 3B) a diversos puntos de tiempo hasta 6 meses para ratones HemB a los que se administra a las 8
20 semanas de edad LV-coFIX-1-R338L mediante inyección en la vena de la cola a una dosis de 7,5E9 (círculos), 2E10 (cuadrados), o 6E10 (triángulos) TU/kg. Las barras de error representan la desviación estándar (FIG. 3A-3B).

Las FIG. 4A-4B son representaciones gráficas de la expresión de FIX persistente a diversos puntos de tiempo hasta 6 meses (FIG. 4A) y
25 respuesta a la dosis de LV-FIX con dosis similares (FIG. 4B) en los estadios neonatal, adolescente, o adulto. Se administró a ratones HemB de ocho semanas de edad (cuadrados) o dos días de edad (círculos) LV-coFIX-1-R338L por inyección intravenosa a una dosis de 7,5E9, 2E10, o 6E10 TU/kg; o se administró a ratones HemB de dos semanas de edad (triángulos) LV-
30 coFIX-1-R338L por inyección intravenosa a una dosis de 3E9, 7,5E9, o 2E10

TU/kg, como se indica (FIG. 4A). La respuesta a la dosis se midió por la actividad de FIX a las diversas dosis ensayadas en la FIG. 4A en ratones HemB a las ocho semanas de edad (cuadrados), dos semanas de edad (triángulos), y dos días de edad (círculos). Las barras de error representan la desviación estándar (FIG. 4A-4B).

La FIG. 5 es un gráfico que ilustra el número de copias del vector (VCN) del vector lentiviral en macrófagos de ratones NOD después de la administración de un vector lentiviral control (LV; círculos negros) o un vector lentiviral que tiene altos niveles superficiales de CD47 (CD47hi LV; círculos grises), y se determinó el número de moléculas de vector lentiviral presentes en los macrófagos. Los datos de VCN en células HEK293T se muestran como un control. Las barras de error representan la desviación estándar.

Las FIG. 6A-6C son representaciones gráficas de la actividad de FIX plasmática (FIG. 6A), antígeno FIX plasmático (FIG. 6B), y función de FIX (representada por tiempo APTT; FIG. 6C) en monos *Macaca nemestrina* después de la administración de un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX empaquetado en un vector lentiviral control (LV-FIX; #1, #2, y #3), un vector lentiviral que tiene altos niveles superficiales de CD47 (CD47hi LV-FIX; #4, #5, y #6), o un control de vehículo (#7).

Las FIG. 7A-7B son representaciones gráficas de la expresión de FIX mediada por el vector lentiviral en estado estacionario en monos *Macaca nemestrina* después de la administración de vector lentiviral CD47^{alta} que comprende un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX, administrado a una dosis de E9 TU/kg, como se representa por la actividad de FIX plasmática (FIG. 7A) y antígeno FIX plasmático (FIG. 7B). Las barras de error representan la desviación estándar (FIG. 7A-7B).

Las FIG. 8A-8D son representaciones gráficas de los niveles de ALT (FIG. 8A), niveles de AST (FIG. 8B), niveles de linfocitos (FIG. 8C), y temperatura

corporal (FIG. 8D) en monos *Macaca nemestrina* después de la administración de vehículo (círculos blancos), vector lentiviral control (LV; círculos negros) o vector lentiviral que tiene altos niveles superficiales de CD47 (CD47hi LV; círculos grises), vector lentiviral que comprende un vector
 5 lentiviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX.

Las FIG. 9A-9C son representaciones gráficas de los niveles de expresión de MIP-1a (9A), MIP-1b (9B), y MCP-1 (9C) en monos *Macaca nemestrina* después de la administración de Vehículo (círculos negros),
 10 vector lentiviral control (LV; cuadrados negros) o vector lentiviral que tiene altos niveles superficiales de CD47 (CD47hi LV; cuadrados abiertos) vector lentiviral que comprende un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX.

La FIG. 10 es un gráfico de dispersión que ilustra la distribución
 15 específica de tejido (representada por VCN) de vectores lentivirales que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX después de la administración a monos *Macaca nemestrina*, de vehículo (triángulo), vector lentiviral control (triángulo repasado) o CD47hi LV; círculos). Cada conjunto de datos representa un
 20 mono *Macaca nemestrina* individual.

Las FIG. 11A y 11B son representaciones gráficas de la expresión de FIX mediada por el vector lentiviral en estado estacionario en monos *Macaca nemestrina* después de la administración de vector lentiviral CD47^{alta} que
 comprende un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácido
 25 nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX, administrado a una dosis de 2,5 E9 TU/kg, como se representa por la actividad de FIX plasmática (FIG. 11A) y antígeno FIX plasmático (FIG. 11B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción describe vectores lentivirales que
 30 comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de

FIX, y métodos para usar los mismos. Por consiguiente, en algunos aspectos, la presente descripción está dirigida a terapia génica que comprende la administración de vectores lentivirales que comprenden moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos con actividad de FIX. En aspectos particulares, la presente descripción está dirigida a métodos para tratar trastornos hemorrágicos tales como hemofilia (p. ej., hemofilia B) que comprenden administrar al sujeto un vector lentiviral que comprende una secuencia de ácido nucleico de FIX con codones optimizados dirigida al hígado (p. ej., a los hepatocitos). La presente descripción satisface una necesidad importante en la técnica a través de una estrategia de terapia génica que produce la integración estable de un casete de expresión de transgén que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de FIX en el genoma de las células diana.

Este sistema demuestra una expresión aumentada a largo plazo de polipéptidos que tienen actividad de FIX en las células diana (p. ej., hepatocitos), cuando el vector lentiviral se administra al sujeto al menos en una dosis de 5×10^{10} unidades de transducción/kg (TU/kg) o menos, p. ej., aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg o menos, o aproximadamente $1,5 \times 10^9$ TU/kg o menos, o aproximadamente 1×10^8 TU/kg o menos.

Las construcciones ejemplares de la descripción se ilustran en las Figuras y listado de secuencias adjuntos.

Con el fin de proporcionar una comprensión clara de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, a continuación, se proporcionan las siguientes definiciones.

I. Definiciones

Debe indicarse que el término "un" o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad: por ejemplo, "una secuencia de nucleótidos" se entiende que representa una o más secuencias de nucleótidos. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden usarse

indistintamente en la presente memoria.

El término "aproximadamente" se usa en la presente memoria para significar aproximadamente, alrededor de, o en las regiones de. Cuando el término "aproximadamente" se usa conjuntamente con un rango numérico, modifica ese rango numérico extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos mostrados. En general, el término "aproximadamente" se usa en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor mostrado por una varianza del 10 por ciento, hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor).

El término "aislado" para los propósitos de la presente descripción designa un material biológico (célula, polipéptido, polinucleótido, o un fragmento, variante, o derivado de los mismos) que se ha retirado de su entorno original (el entorno en el que está presente naturalmente). Por ejemplo, un polinucleótido presente en el estado natural en una planta o un animal no está aislado, sin embargo, el mismo polinucleótido separado de sus ácidos nucleicos adyacentes con los que está presente naturalmente, se considera "aislado". No se requiere un nivel de purificación particular. Los polipéptidos y proteínas producidos recombinantemente expresados en células huésped se consideran aislados para el propósito de la descripción, como lo son los polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado o purificado parcialmente o sustancialmente por cualquier técnica adecuada.

"Ácidos nucleicos", "moléculas de ácido nucleico", "oligonucleótido," y "polinucleótido" se usan indistintamente y se refieren a la forma polimérica de éster fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualesquiera análogos fosfoéster de los mismos, tales como fósforotioatos y tioésteres, bien en forma monocatenaria, o como una hélice bicatenaria. Son posibles las hélices bicatenarias de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. El

término molécula de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, se refiere solo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita a ninguna forma terciaria particular. De este modo, este término incluye ADN bicatenario encontrado, *inter alia*, en moléculas de ADN lineales o circulares (p. ej., fragmentos de restricción), plásmidos, ADN superenrollado y cromosomas. En la discusión de la estructura de moléculas de ADN bicatenarias particulares, las secuencias pueden describirse en la presente memoria según la convención normal que proporciona solo la secuencia en la dirección 5' a 3' junto con la cadena de ADN no transcrita (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sido sometida a manipulación por biología molecular. El ADN incluye, pero no está limitado a, ADNc, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN sintético, y ADN semisintético. Una "composición de ácido nucleico" de la descripción comprende uno o más ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "región codificadora" o "secuencia codificadora" es una parte de polinucleótido que consiste en codones que se pueden traducir en aminoácidos. Aunque un "codón de parada" (TAG, TGA, o TAA) típicamente no se traduce en un aminoácido, puede considerarse como parte de una región codificadora, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones, y similares no son parte de una región codificadora. Los límites de una región codificadora están determinados típicamente por un codón de inicio en el extremo 5', que codifica el extremo amino del polipéptido resultante, y un codón de parada de la traducción en el extremo 3', que codifica el extremo carboxilo del polipéptido resultante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificadoras en una única construcción de polinucleótido, p. ej., en un único vector, o en construcciones de polinucleótidos separadas, p. ej., en vectores separados (diferentes). Por lo tanto, entonces, un único vector puede

contener solo una única región codificadora, o puede comprender dos o más regiones codificadoras.

Determinadas proteínas secretadas por las células de mamíferos están asociadas con un péptido señal de secreción que se escinde de la proteína madura una vez se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína creciente a través del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica son conscientes de que los péptidos señal están fusionados generalmente al extremo N del polipéptido, y se escinden del polipéptido completo o "de longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En determinadas realizaciones, un péptido señal nativo o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está asociado operativamente con él. Alternativamente, puede usarse un péptido señal de mamífero heterólogo, p. ej., péptido señal de activador de plasminógeno tisular (TPA) humano o β -glucuronidasa de ratón, o un derivado funcional de los mismos.

El término "polipéptido que tiene actividad de FIX", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que tiene una o más actividades asociadas con el factor IX de la coagulación. Están disponibles varios ensayos para evaluar la función del sistema de la coagulación, incluyendo el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) por FIX, ensayo cromogénico, ensayo ROTEM®, ensayo de tiempo de protrombina (PT) (también usado para determinar el INR), ensayo de fibrinógeno (frecuentemente por el método de Clauss), recuento de plaquetas, ensayo de la función plaquetaria (frecuentemente por PFA-100), TCT, tiempo de sangrado, ensayo de mezclado (donde una anomalía se corrige si el plasma del paciente se mezcla con plasma normal), ensayos de factores de coagulación, anticuerpos antifosfolípido, dímero D, ensayos genéticos (p. ej., factor V de Leiden, mutación en protrombina G20210A), tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (dRVVT), ensayos de función plaquetaria misceláneos, tromboelastografía (TEG o Sonoclot),

tromboelastometría (TEM[®], p. ej., ROTEM[®]), o tiempo de lisis de euglobulina (ELT).

El ensayo de aPTT es un indicador de comportamiento que mide la eficacia de las rutas de coagulación tanto "intrínseca" (también referida como la ruta de activación por contacto) como la común. Este ensayo se usa comúnmente para medir la actividad de coagulación de factores de coagulación recombinantes disponibles comercialmente, p. ej., FIX. Se usa conjuntamente con el tiempo de protrombina (PT), que mide la ruta extrínseca.

El análisis ROTEM[®] proporciona información sobre la cinética completa de la hemostasis: tiempo de coagulación, formación de coágulos, estabilidad de los coágulos y lisis. Los diferentes parámetros en la tromboelastometría dependen de la actividad del sistema de coagulación plasmático, función plaquetaria, fibrinólisis, o muchos factores que influyen en estas interacciones. Este ensayo puede proporcionar una visión completa de la hemostasis secundaria.

El término "aguas abajo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que está localizada en 3' respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En determinadas realizaciones, las secuencias de nucleótidos aguas abajo se refieren a secuencias que siguen el punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, el codón de inicio de la traducción de un gen está localizado aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción.

El término "aguas arriba" se refiere a una secuencia de nucleótidos que está localizada en 5' respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En determinadas realizaciones, las secuencias de nucleótidos aguas arriba se refieren a secuencias que están localizadas en el lado 5' de una región codificadora o punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, la mayor parte de los promotores están localizados aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "región reguladora de genes" o "región reguladora" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias no codificadoras en 5'), en, o aguas abajo (secuencias no codificadoras en 3') de una región
5 codificadora, y que influyen en la transcripción, procesamiento del ARN, estabilidad, o traducción de la región codificadora asociada. Las regiones reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de la traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento del ARN, sitios de unión de efectores y estructuras de tallo-
10 bucle. Si una región codificadora se pretende para la expresión en una célula eucariota, normalmente estarán localizadas en 3' de la región codificadora una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción.

Un polinucleótido que codifica un producto génico, p. ej., un
15 polipéptido, puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de la expresión (p. ej., transcripción o traducción) asociados operativamente con una o más regiones codificadoras. En una asociación operativa, una región codificadora para un producto génico, p. ej., un polipéptido, está asociada con una o más regiones reguladoras de una manera tal que se pone la
20 expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la región o regiones reguladoras. Por ejemplo, una región codificadora y un promotor están "asociados operativamente" si la inducción de la función del promotor da lugar a la transcripción del ARNm que codifica el producto génico codificado por la región codificadora, y si la naturaleza de la unión entre el
25 promotor y la región codificadora no interfiere con la capacidad del promotor de dirigir la expresión del producto génico o interfiere con la capacidad del molde de ADN de ser transcrito. Otros elementos de control de la expresión, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, también pueden
30 asociarse operativamente con una región codificadora para dirigir la expresión de un producto génico.

Las "secuencias de control de la transcripción" se refieren a secuencias reguladoras del ADN, tales como promotores, potenciadores, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificadora en una célula huésped. Los expertos en la técnica conocen una
5 variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrados, tales como, pero no limitadas a, segmentos de promotor y potenciador de citomegalovirus (el promotor inmediato temprano, conjuntamente con el intrón-A), virus de simio 40 (el promotor temprano), y
10 retrovirus (tales como el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y β -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control
15 de la transcripción adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfoquinas (p. ej., promotores inducibles por interferones o interleuquinas).

De manera similar, los expertos en la técnica conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, pero no están
20 limitados a, sitios de unión a ribosomas, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de picornavirus (particularmente, un sitio de entrada de ribosomas interno, o IRES, también referido como una secuencia CITE).

El término "expresión", tal y como se usa en la presente memoria, se
25 refiere a un proceso por el cual un polinucleótido produce un producto génico, por ejemplo, un ARN o un polipéptido. Incluye, sin limitación, la transcripción del polinucleótido en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN en horquilla pequeño (ARNsh), ARN de interferencia pequeño (ARNsi) o cualquier otro producto de ARN, y la
30 traducción de un ARNm en un polipéptido. La expresión produce un

"producto génico". Tal y como se usa en la presente memoria, un producto génico puede ser bien un ácido nucleico, p. ej., un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce a partir de un transcrito. Los productos génicos descritos en la presente memoria incluyen
5 además ácidos nucleicos con modificaciones posteriores a la transcripción, p. ej., poliadenilación o corte y empalme, o polipéptidos con modificaciones posteriores a la traducción, p. ej., metilación, glicosilación, la adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteínas, o escisión proteolítica. El término "rendimiento", tal y como se usa en la presente
10 memoria, se refiere a la cantidad de un polipéptido producida por la expresión de un gen.

Un "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación de y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula huésped. Un vector puede ser un replicón al que puede unirse otro segmento de ácido nucleico de
15 manera que se lleva a cabo la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (p. ej., plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad de replicación autónoma *in vivo*, es decir, que es capaz de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye tanto vehículos virales como no virales para
20 introducir el ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Se conocen y usan en la técnica un gran número de vectores incluyendo, por ejemplo, plásmidos, virus de eucariotas modificados, o virus de bacterias modificados. La inserción de un polinucleótido en un vector adecuado puede conseguirse ligando los fragmentos de polinucleótido apropiados en un
25 vector elegido que tiene extremos cohesivos complementarios.

Los vectores pueden prepararse por ingeniería para codificar marcadores seleccionables o informadores que proporcionan la selección o identificación de las células que han incorporado el vector. La expresión de los marcadores seleccionables o informadores permite la identificación y/o la
30 selección de las células huésped que incorporan y expresan otras regiones

codificadoras contenidas en el vector. Los ejemplos de genes de marcadores seleccionables conocidos y usados en la técnica incluyen: genes que proporcionan resistencia a ampicilina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, higromicina, herbicida bialafos, sulfonamida, y similares; y genes que se usan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de antocianina, gen de la isopentanol transferasa, y similares. Los ejemplos de informadores conocidos y usados en la técnica incluyen: luciferasa (Luc), proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -galactosidasa (LacZ), β -glucuronidasa (Gus), y similares. Los marcadores seleccionables también pueden considerarse que son informadores.

El término "marcador seleccionable" se refiere a un factor identificativo, habitualmente un gen de resistencia a antibiótico o compuesto químico, que puede seleccionarse sobre la base del efecto del gen del marcador, es decir, resistencia a un antibiótico, resistencia a un herbicida, marcadores colorimétricos, enzimas, marcadores fluorescentes, y similares, en donde el efecto se usa para seguir la herencia de un ácido nucleico de interés y/o para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés. Los ejemplos de genes de marcadores seleccionables conocidos y usados en la técnica incluyen: genes que proporcionan resistencia a ampicilina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, higromicina, herbicida bialafos, sulfonamida, y similares; y genes que se usan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de antocianina, gen de la isopentanol transferasa, y similares.

El término "gen informador" se refiere a un ácido nucleico que codifica un factor identificativo que puede identificarse sobre la base del efecto del gen informador, en donde el efecto se usa para seguir la herencia de un ácido nucleico de interés, para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés, y/o para medir la inducción o transcripción de la expresión génica. Los ejemplos de genes informadores

conocidos y usados en la técnica incluyen: luciferasa (Luc), proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -galactosidasa (LacZ), β -glucuronidasa (Gus), y similares. Los genes de los marcadores seleccionables también pueden considerarse que son genes de
5 informadores.

"Promotor" y "secuencia promotora" se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o ARN funcional. En general, una secuencia codificadora está localizada en 3' respecto a una secuencia promotora. Los
10 promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso pueden comprender segmentos de ADN sintético. Los expertos en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tipos de
15 tejidos o células, o en diferentes estadios del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayor parte de los tipos celulares la mayor parte del tiempo se refieren comúnmente como "promotores constitutivos". Los promotores que hacen que un gen se exprese en un tipo celular
20 específico se refieren comúnmente como "promotores específicos de célula" o "promotores específicos de tejido". Los promotores que hacen que un gen se exprese en un estadio de desarrollo o de diferenciación celular específico se refieren comúnmente como "promotores específicos del desarrollo" o "promotores específicos de la diferenciación celular". Los promotores que
25 son inducidos y que hacen que un gen se exprese después de la exposición o tratamiento de la célula con un agente, molécula biológica, compuesto químico, ligando, luz, o similares que inducen al promotor se refieren comúnmente como "promotores inducibles" o "promotores regulables". Se reconoce además que como en la mayor parte de los casos no se han
30 definido completamente los límites exactos de las secuencias reguladoras, los fragmentos de ADN con diferentes longitudes pueden tener una actividad

promotora idéntica.

La secuencia promotora está limitada típicamente en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (en dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesario para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. En la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (definido convenientemente, por ejemplo, por mapeo con la nucleasa S1), así como los dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

El término "plásmido" se refiere a un elemento extracromosómico que porta frecuentemente un gen que no es parte del metabolismo central de la célula, y habitualmente en la forma de moléculas de ADN bicatenarias circulares. Dichos elementos pueden ser secuencias que se replican de forma autónoma, secuencias de integración en el genoma, secuencias de fago o nucleótidos, lineares, circulares, o superenrolladas, de un ADN o ARN mono o bicatenario, derivado de cualquier fuente, en el que varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una única construcción que es capaz de introducir un fragmento de promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con una secuencia no traducida en 3' apropiada en una célula.

Un "vector de clonación" se refiere a un "replicón", que es una unidad de longitud de un ácido nucleico que se replica secuencialmente y que comprende un origen de replicación, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ácido nucleico de manera que se produzca la replicación del segmento unido. Determinados vectores de clonación son capaces de replicarse en un tipo de célula, p. ej., bacterias y de expresión en otro, p. ej., células eucariotas. Los vectores de clonación comprenden típicamente una o más secuencias que pueden usarse para la selección de células que comprenden el vector y/o uno o más sitios de clonación múltiples para la inserción de secuencias de ácido nucleico de

interés.

El término "vector de expresión" se refiere a un vehículo diseñado para permitir la expresión de una secuencia de ácido nucleico insertada después de la inserción en una célula huésped. La secuencia de ácido nucleico insertada se pone en asociación operativa con regiones reguladoras como se ha descrito anteriormente.

Los vectores se introducen en células huésped por métodos muy conocidos en la técnica, p. ej., transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosomas), uso de una pistola de genes, o un transportador de vector de ADN. "Vector lentiviral", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una partícula viral híbrida defectuosa para la replicación. En algunos contextos, el vector lentiviral se refiere a la partícula de vector lentiviral y al genoma de lentivirus incluido. En algunos contextos, el vector lentiviral se refiere al genoma del lentivirus, incluyendo cualquier modificación del mismo.

"Cultivo", "cultivar" y "cultivando", tal y como se usan en la presente memoria, significan incubar las células en condiciones *in vitro* que permitan el crecimiento o división celular o mantener las células en un estado vivo. "Células cultivadas", tal y como se usa en la presente memoria, significa células que se propagan *in vitro*.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "polipéptido" se pretende que englobe un "polipéptido" en singular, así como "polipéptidos" en plural y se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. De este modo, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término usado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más

aminoácidos, se incluyen en la definición de "polipéptido" y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o indistintamente con, cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también se pretende que se refiera a los productos de las modificaciones posteriores a la expresión del

5 polipéptido, incluyendo, sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos no naturales. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una

10 secuencia de ácido nucleico diseñada. Puede generarse de cualquier manera, incluyendo por síntesis química.

El término "aminoácido" incluye alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparagina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina

15 (His o H); isoleucina (Ile o I); leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); prolina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V). Los aminoácidos no tradicionales también están en el alcance de la descripción e incluyen norleucina, omitina, norvalina, homoserina, y otros análogos de

20 residuos de aminoácidos tales como los descritos en Ellman *et al.* Meth. Enzym. 202:301-336 (1991). Para generar dichos residuos de aminoácidos no naturales, pueden usarse los procedimientos de Noren *et al.* Science 244:182 (1989) y Ellman *et al.*, supra. Brevemente, estos procedimientos implican activar químicamente un ARNt supresor con un residuo de

25 aminoácido no natural seguido de la transcripción y traducción *in vitro* del ARN. La introducción del aminoácido no tradicional también puede conseguirse usando químicas de péptidos conocidas en la técnica. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido polar" incluye aminoácidos que tienen una carga neta cero, pero que tienen cargas

30 parciales distintas de cero en diferentes partes de sus cadenas laterales (p. ej., M, F, W, S, Y, N, Q, C). Estos aminoácidos pueden participar en

interacciones hidrófobas e interacciones electrostáticas. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido cargado" incluye aminoácidos que pueden tener una carga neta distinta de cero en sus cadenas laterales (p. ej., R, K, H, E, D). Estos aminoácidos pueden participar
5 en interacciones hidrófobas e interacciones electrostáticas.

En la presente invención también se incluyen fragmentos o variantes de polipéptidos, y cualquier combinación de los mismos. El término "fragmento" o "variante" cuando se refiere a dominios de unión o moléculas de unión de polipéptidos de la presente descripción incluyen cualquier
10 polipéptido que retenga al menos algunas de las propiedades (p. ej., afinidad de unión a FcRn para un dominio de unión a FcRn o variante de Fc, actividad de coagulación para un polipéptido que tiene actividad de FIX) del polipéptido de referencia. Los fragmentos de polipéptidos incluyen fragmentos proteolíticos, así como fragmentos de delección, además de
15 fragmentos de anticuerpos específicos que se discuten en otro lugar de la presente memoria, pero no incluyen el polipéptido natural de longitud completa (o polipéptido maduro). Las variantes de dominios de unión o moléculas de unión de polipéptidos de la presente descripción incluyen fragmentos como se ha descrito anteriormente, y también polipéptidos con
20 secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, delecciones, o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ser naturales o no naturales. Las variantes no naturales pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones, delecciones, o adiciones de aminoácidos
25 conservativas o no conservativas.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica,
30 incluyendo cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina),

cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano),
 5 cadenas laterales con ramificación beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, si un aminoácido en un polipéptido se reemplaza con otro aminoácido de la misma familia de cadenas laterales, se considera que la sustitución es conservativa. En otra realización, una cadena de
 10 aminoácidos puede reemplazarse de manera conservativa con una cadena estructuralmente similar que se diferencia en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadenas laterales.

El término "porcentaje de identidad" como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más
 15 secuencias de polinucleótidos, como se determina comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de polipéptidos o de polinucleótidos, como pueda ser el caso, como se determina por la concordancia entre cadenas de dichas secuencias. La "identidad" puede calcularse fácilmente por métodos
 20 conocidos, incluyendo, pero no limitado a, los descritos en: *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, Nueva York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed.) Academic Press, Nueva York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.) Humana Press, Nueva Jersey
 25 (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); y *Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.) Stockton Press, Nueva York (1991). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para proporcionar la mejor concordancia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para
 30 determinar la identidad están codificados en programas de ordenador disponibles públicamente. Los alineamientos de secuencias y los cálculos

del porcentaje de identidad pueden realizarse usando software de análisis de secuencias tales como el programa Megalign del paquete informático de bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI), el paquete de programas GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group
 5 (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)), y DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 EE. UU.).

En el contexto de esta solicitud, se entenderá que cuando se usa software de análisis de secuencias para el análisis, los resultados del
 10 análisis se basarán en los "valores por defecto" del programa referenciado, a no ser que se especifique otra cosa. Tal y como se usa en la presente memoria, los "valores por defecto" significarán cualquier conjunto de valores o parámetros que están cargados originalmente en el software cuando se inicializa por primera vez.

Una proteína "de fusión" o "quimérica" comprende una primera secuencia de aminoácidos unida a una segunda secuencia de aminoácidos con la que no está naturalmente unida en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos que existen normalmente en proteínas separadas pueden unirse en el polipéptido de fusión, o las secuencias de aminoácidos que
 20 existen normalmente en la misma proteína pueden ponerse en una nueva disposición en el polipéptido de fusión, p. ej., fusión de un dominio de FIX de la descripción con un dominio Fc de Ig. Una proteína de fusión se crea, por ejemplo, por síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada. Una
 25 proteína quimérica puede comprender además una segunda secuencia de aminoácidos asociada con la primera secuencia de aminoácidos por un enlace covalente, no peptídico o un enlace no covalente.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sitio de inserción" se refiere a una posición en un polipéptido que tiene una actividad
 30 de FIX, o fragmento, variante, o derivado del mismo, que está

inmediatamente aguas arriba de la posición en la que puede insertarse un resto heterólogo. Un "sitio de inserción" se especifica como un número, siendo el número el número del aminoácido en la variante R338L del FIX humano (SEQ ID NO: 11-12) al que corresponde el sitio de inserción, que es
 5 inmediatamente N-terminal a la posición de la inserción, a no ser que se indique otra cosa.

La expresión "inmediatamente aguas abajo de un aminoácido", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la posición a la derecha del grupo carboxilo terminal del aminoácido. De manera similar, la expresión
 10 "inmediatamente aguas arriba de un aminoácido", se refiere a la posición a la derecha del grupo amino terminal del aminoácido.

Los términos "insertado", "se inserta", "insertado en" o términos relacionados gramaticalmente, tal y como se usan en la presente memoria, se refieren a la posición de un resto heterólogo en un polipéptido FIX
 15 recombinante, en relación a la posición análoga en el FIX maduro nativo humano. Tal y como se usan en la presente memoria, los términos se refieren a las características del polipéptido FIX recombinante en relación al FIX maduro nativo humano, y no indican, implican o infieren ningún método o proceso mediante el que se preparó el polipéptido FIX recombinante.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "semivida" se refiere a la semivida biológica de un polipéptido particular *in vivo*. La semivida puede representarse por el tiempo requerido para que se aclare la mitad de la cantidad administrada a un sujeto de la circulación y/u otros tejidos en el animal. Cuando se construye una curva de aclaramiento de un
 25 polipéptido dado como una función del tiempo, la curva es habitualmente bifásica con una fase α rápida y una fase β más larga. La fase α representa típicamente un equilibrio del polipéptido Fc administrado entre el espacio intra y extravascular y está determinada, en parte, por el tamaño del polipéptido. La fase β representa típicamente el catabolismo del polipéptido
 30 en el espacio intravascular. En algunas realizaciones, FIX y las proteínas

químicas que comprenden FIX son monofásicas, y de este modo no tienen una fase alfa, sino solo la única fase beta. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el término semivida, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la semivida del polipéptido en la fase β .

5 El término "unido", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos unida covalentemente o no covalentemente a una segunda secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos, respectivamente. La primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos puede estar unida directamente
10 o yuxtapuesta a la segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos o alternativamente una secuencia interviniente puede unir covalentemente la primera secuencia a la segunda secuencia. El término "unido" significa no solo una fusión de una primera secuencia de aminoácidos a una segunda secuencia de aminoácidos en el extremo C o el extremo N, sino que también
15 incluye la inserción de la totalidad de la primera secuencia de aminoácidos (o la segunda secuencia de aminoácidos) en cualquiera de dos aminoácidos en la segunda secuencia de aminoácidos (o la primera secuencia de aminoácidos, respectivamente). En una realización, la primera secuencia de aminoácidos puede unirse a una segunda secuencia de aminoácidos por un
20 enlace peptídico o un conector. La primera secuencia de nucleótidos puede unirse a una segunda secuencia de nucleótidos por un enlace fosfodiéster o un conector. El conector puede ser un péptido o un polipéptido (para cadenas de polipéptidos) o un nucleótido o una cadena de nucleótidos (para cadenas de nucleótidos) o cualquier resto químico (tanto para cadenas de
25 polipéptidos como de polinucleótidos). El término "unido" también se indica por un guion (-).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "asociado con" se refiere a un enlace covalente o no covalente formado entre una primera cadena de aminoácidos y una segunda cadena de aminoácidos. En una
30 realización, el término "asociado con" significa un enlace covalente, no

peptídico o un enlace no covalente. Esta asociación puede indicarse por un colon, es decir, (:). En otra realización, significa un enlace covalente excepto un enlace peptídico. Por ejemplo, el aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un grupo tiol en un segundo residuo de cisteína. En la mayor parte de las moléculas de IgG naturales, las regiones CH1 y CL están asociadas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están asociadas por dos enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU). Los ejemplos de enlaces covalentes incluyen, pero no están limitados a, un enlace peptídico, un enlace disulfuro, un enlace sigma, un enlace pi, un enlace delta, un enlace glicosídico, un enlace agnóstico, un enlace doblado, un enlace dipolar, un retroenlace Pi, un enlace doble, un enlace triple, un enlace cuádruple, un enlace quíntuple, un enlace séxtuple, conjugación, hiperconjugación, aromaticidad, hapticidad, o antienlazante. Los ejemplos no limitativos de enlace no covalente incluyen un enlace iónico (p. ej., un enlace catiónico pi o un enlace de sal), un enlace metálico, un enlace de hidrógeno (p. ej., un enlace de dihidrógeno, complejo de dihidrógeno, un enlace de hidrógeno de barrera baja, o un enlace de hidrógeno simétrico), fuerza de van der Waals, fuerza de dispersión de London, un enlace mecánico, un enlace de halógeno, aurofilicidad, intercalación, apilamiento, fuerza entrópica, o polaridad química.

El término "híbrido de monómero-dímero", usado en la presente memoria, se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera cadena de polipéptido y una segunda cadena de polipéptido, que están asociadas entre sí por un enlace disulfuro, en donde la primera cadena comprende un factor de coagulación, p. ej., FIX, y una primera región Fc y la segunda cadena comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una segunda región Fc sin el factor de coagulación. La construcción del híbrido de monómero-dímero es de este modo un híbrido que comprende un aspecto de monómero que tiene solo un factor de coagulación y un aspecto

de dímero que tiene dos regiones Fc.

Hemostasis, tal y como se usa en la presente memoria, significa la parada o ralentización del sangrado o hemorragia; o la parada o ralentización del flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo o parte del
5 cuerpo.

Trastorno hemostático, tal y como se usa en la presente memoria, significa una afección heredada genéticamente o adquirida caracterizada por una tendencia a la hemorragia, bien espontáneamente o como resultado de un trauma, debido a una capacidad alterada o incapacidad de formar un
10 coágulo de fibrina. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen las hemofilias. Las tres formas principales son hemofilia A (deficiencia del factor VIII), hemofilia B (deficiencia del factor IX o "enfermedad Christmas") y hemofilia C (deficiencia del factor XI, tendencia a sangrado suave). Otros trastornos hemostáticos incluyen, p. ej., enfermedad de von Willebrand, deficiencia del
15 Factor XI (deficiencia de PTA), deficiencia del Factor XII, deficiencias o anomalías estructurales en el fibrinógeno, protrombina, Factor V, Factor VII, Factor X o factor XIII, síndrome de Bernard-Soulier, que es un defecto o deficiencia de GPIb. GPIb, el receptor de vWF, puede ser defectuoso y dar lugar a la ausencia de la formación de coágulos primarios (hemostasis
20 primaria) y una tendencia incrementada de sangrado), y trombastenia de Glanzman y Naegeli (trombastenia de Glanzmann). En la insuficiencia hepática (formas aguda y crónica), hay una producción insuficiente de factores de coagulación por el hígado; esto puede incrementar el riesgo de sangrado.

25 Los vectores lentivirales que comprenden la molécula de ácido nucleico aislada de la descripción pueden usarse profilácticamente. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento profiláctico" se refiere a la administración de una molécula antes de un episodio de sangrado. En una realización, el sujeto que necesita un agente hemostático
30 general se está sometiendo, o se va a someter, a cirugía. Por ejemplo, un

vector lentiviral de la descripción puede administrarse antes o después de la cirugía como un profiláctico. El vector lentiviral de la descripción puede administrarse durante o después de la cirugía para controlar un episodio de sangrado agudo. La cirugía puede incluir, pero no está limitada a, trasplante de hígado, resección de hígado, procedimientos dentales, o trasplante de células madre.

Los vectores lentivirales de la descripción también se usan para el tratamiento a demanda. El término "tratamiento a demanda" se refiere a la administración de un vector lentiviral descrito en la presente memoria en respuesta a síntomas de un episodio de sangrado o antes de una actividad que puede causar sangrado. En un aspecto, el tratamiento a demanda puede proporcionarse a un sujeto cuando el sangrado empieza, tal como después de una lesión, o cuando el sangrado se espera, tal como antes de una cirugía. En otro aspecto, el tratamiento a demanda puede proporcionarse antes de actividades que incrementan el riesgo de sangrado, tales como deportes de contacto.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sangrado agudo" se refiere a un episodio de sangrado independientemente de la causa subyacente. Por ejemplo, un sujeto puede tener un trauma, uremia, un trastorno de sangrado hereditario (p. ej., deficiencia de FIX) un trastorno plaquetario, o resistencia debida al desarrollo de anticuerpos frente a factores de coagulación.

Tratar, tratamiento, tratando, tal y como se usan en la presente memoria, se refieren a, p. ej., la reducción de la gravedad de una enfermedad o afección; la reducción de la duración del curso de una enfermedad; la mejoría de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o afección; el suministro de efectos beneficiosos a un sujeto con una enfermedad o afección, sin curar necesariamente la enfermedad o afección, o la profilaxis de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o afección. En una realización, el término "tratando" o

"tratamiento" significa mantener un nivel valle de FIX de al menos aproximadamente 1 IU/dL, 2 IU/dL, 3 IU/dL, 4 IU/dL, 5 IU/dL, 6 IU/dL, 7 IU/dL, 8 IU/dL, 9 IU/dL, 10 IU/dL, 11 IU/dL, 12 IU/dL, 13 IU/dL, 14 IU/dL, 15 IU/dL, 16 IU/dL, 17 IU/dL, 18 IU/dL, 19 IU/dL, o 20 IU/dL en un sujeto mediante la administración de un vector lentiviral de la descripción. En otra realización, tratando o tratamiento significa mantener un nivel valle de FIX entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 2 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 3 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 4 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 5 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 6 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 7 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 8 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 9 y aproximadamente 20 IU/dL, o aproximadamente 10 y aproximadamente 20 IU/dL. Tratamiento de o tratando una enfermedad o afección también puede incluir mantener una actividad de FIX en un sujeto a un nivel comparable a al menos aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, o 20% de la actividad de FIX en un sujeto no hemofílico. En una realización, el término "tratando" o "tratamiento" significa mantener un nivel valle de FIX de al menos aproximadamente 30 IU/dL, 40 IU/dL, 50 IU/dL, 60 IU/dL, 70 IU/dL, 80 IU/dL, 90 IU/dL, 100 IU/dL, 110 IU/dL, 120 IU/dL, 130 IU/dL, 140 IU/dL, o 150 IU/dL en un sujeto mediante la administración de un vector lentiviral de la descripción. En otra realización, tratando o tratamiento significa mantener un nivel valle de FIX entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 IU/dL, aproximadamente 20 y aproximadamente 23 IU/dL, aproximadamente 30 y aproximadamente 40 IU/dL, aproximadamente 40 y aproximadamente 50 IU/dL, aproximadamente 50 y aproximadamente 60 IU/dL, aproximadamente 60 y aproximadamente 70 IU/dL, aproximadamente 70 y aproximadamente 80 IU/dL, aproximadamente 80 y aproximadamente 90 IU/dL, aproximadamente 90 y aproximadamente 100 IU/dL, aproximadamente 110 y aproximadamente 120 IU/dL, aproximadamente 120 y aproximadamente

130 IU/dL, aproximadamente 130 y aproximadamente 140 IU/dL, o aproximadamente 140 y aproximadamente 150 IU/dL. Tratamiento de o tratando una enfermedad o afección también puede incluir mantener una actividad de FIX en un sujeto a un nivel comparable a al menos

5 aproximadamente el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145% o 150% de la actividad de FIX en un sujeto no hemofílico. El nivel vallo mínimo requerido para el tratamiento puede medirse por uno o más métodos conocidos y puede ajustarse (incrementarse o

10 disminuirse) para cada persona.

"Administrar", tal y como se usa en la presente memoria, significa proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica FIX, polipéptido FIX, o vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica FIX de la descripción farmacéuticamente aceptable a un sujeto mediante una

15 ruta farmacéuticamente aceptable. Las rutas de administración pueden ser intravenosa, p. ej., inyección intravenosa e infusión intravenosa. Las rutas adicionales de administración incluyen, p. ej., la administración subcutánea, intramuscular, oral, nasal, y pulmonar. Las moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, y vectores pueden administrarse como parte de una

20 composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "sujeto que lo necesita" incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, o vector de la descripción, p. ej., para mejorar la hemostasis. En

25 una realización, los sujetos incluyen, pero no están limitados a, individuos con hemofilia. En otra realización, los sujetos incluyen, pero no están limitados a, los individuos que han desarrollado un inhibidor de FIX y de este modo necesitan una terapia de baipás. El sujeto puede ser un adulto o un menor (p. ej., con menos de 12 años de edad). En algunas realizaciones, el

30 sujeto es femenino. En otras realizaciones, el sujeto es masculino.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "factor de coagulación", se refiere a moléculas, o análogos de las mismas, naturales o producidas recombinantemente que previenen o disminuyen la duración de un episodio de sangrado en un sujeto. En otras palabras, significa moléculas que tienen actividad de procoagulación, es decir, son responsables de la conversión de fibrinógeno en una red de fibrina insoluble que causa que la sangre se coagule o forme un coágulo. Un "factor de coagulación activable" es un factor de coagulación en una forma inactiva (p. ej., en su forma de zimógeno) que se puede convertir en una forma activa.

La actividad de coagulación, tal y como se usa en la presente memoria, significa la capacidad de participar en una cascada de reacciones bioquímicas que culmina en la formación de un coágulo de fibrina y/o reduce la gravedad, duración o frecuencia de la hemorragia o episodio de sangrado.

Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "heterólogo" o "exógeno" se refieren a las moléculas que no se encuentran normalmente en un contexto dado, p. ej., en una célula o en un polipéptido. Por ejemplo, una molécula exógena o heteróloga puede introducirse en una célula y solo está presente después de la manipulación de la célula, p. ej., por transfección u otras formas de ingeniería genética o una secuencia de aminoácidos heteróloga puede estar presente en una proteína en la que no se encuentra naturalmente.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos heteróloga" se refiere a una secuencia de nucleótidos que no aparece naturalmente con una secuencia de polinucleótido dada. En una realización, la secuencia de nucleótidos heteróloga codifica un polipéptido capaz de prolongar la semivida de FIX. En otra realización, la secuencia de nucleótidos heteróloga codifica un polipéptido que incrementa el radio hidrodinámico de FIX. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos heteróloga codifica un polipéptido que mejora una o más propiedades farmacocinéticas de FIX sin afectar significativamente su actividad o función

biológica (p. ej., su actividad procoagulante). En algunas realizaciones, FIX está unido o conectado con el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos heteróloga por un conector. Los ejemplos no limitativos de restos de polipéptido codificados por secuencias de nucleótidos heterólogas

5 incluyen una región constante de inmunoglobulina o una parte de la misma, albúmina o un fragmento de la misma, un resto de unión a albúmina, una transferrina, los polipéptidos PAS de la Solicitud de Pat de EE. UU. No. 20100292130, una secuencia HAP, transferrina o un fragmento de la misma, el péptido C-terminal (CTP) de la subunidad β de la gonadotropina coriónica

10 humana, molécula pequeña de unión a albúmina, una secuencia XTEN, restos de unión a FcRn (p. ej., regiones Fc completas o partes de las mismas que se unen a FcRn), regiones Fc de cadena única (regiones ScFc, p. ej., como se describe en US 2008/0260738, WO 2008/012543, o WO 2008/1439545), conectores de poliglicina, conectores de poliserina, péptidos

15 y polipéptidos cortos de 6-40 aminoácidos de dos tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) con diversos grados de estructura secundaria de menos del 50% a más del 50%, entre otros, o dos o más combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el polipéptido codificado por la secuencia de

20 nucleótidos heteróloga está unido a un resto no polipeptídico. Los ejemplos no limitativos de los restos no polipeptídicos incluyen polietilen glicol (PEG), moléculas pequeñas de unión a albúmina, ácido polisiálico (PAS), hidroxietil almidón (HES), un derivado del mismo, o cualesquiera combinaciones de los mismos.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "región Fc" se define como la parte de un polipéptido que corresponde a la región Fc de Ig nativa, es decir, como se forma por la asociación dimérica de los respectivos dominios Fc de sus dos cadenas pesadas. Una región Fc nativa forma un homodímero con otra región Fc. Por el contrario, el término "región Fc

30 fisionada genéticamente" o "región Fc de cadena única" (región scFc), tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una región Fc dimérica

sintética comprendida por dominios Fc unidos genéticamente en una única cadena de polipéptido (es decir, codificadas en una única secuencia genética contigua).

En una realización, la "región Fc" se refiere a la parte de una única
 5 cadena pesada de Ig que empieza en la región bisagra justo aguas arriba del sitio de escisión de la papaína (es decir, el residuo 216 en IgG, tomando que el primer residuo de la región constante de la cadena pesada es 114) y finalizando en el extremo C del anticuerpo. Por consiguiente, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2, y un
 10 dominio CH3.

La región Fc de una región constante de Ig, dependiendo del isotipo de la Ig, puede incluir los dominios CH2, CH3, y CH4, así como la región bisagra. Las proteínas quiméricas que comprenden una región Fc de una Ig conceden varias propiedades deseables a una proteína quimérica
 15 incluyendo estabilidad incrementada, semivida en suero incrementada (véase, Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525), así como unión a receptores de Fc tales como el receptor de Fc neonatal (FcRn) (Pat. de EE. UU. No. 6.086.875. 6.485.726. 6.030.613; WO 03/077834; US2003-0235536A1), que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "optimizado", con respecto a secuencias de nucleótidos, se refiere a una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido, en donde la secuencia de polinucleótidos se ha mutado para aumentar una propiedad de esa secuencia de polinucleótido. En algunas realizaciones, la optimización se
 25 hace para incrementar los niveles de transcripción, incrementar los niveles de traducción, incrementar los niveles de ARNm en estado estacionario, incrementar o disminuir la unión de proteínas reguladoras tales como factores generales de transcripción, incrementar o disminuir el corte y empalme, o incrementar el rendimiento del polipéptido producido por la
 30 secuencia de polinucleótido. Los ejemplos de cambios que pueden hacerse

en una secuencia de polinucleótidos para optimizarla incluyen la optimización de codones, optimización del contenido de G/C, eliminación de secuencias repetidas, eliminación de elementos ricos en AT, eliminación de sitios de corte y empalme crípticos, eliminación de elementos que actúan en cis que reprimen la transcripción o traducción, adición o eliminación de secuencias poli-T o poli-A, adición de secuencias alrededor del sitio de inicio de la transcripción que aumentan la transcripción, tales como secuencias consenso Kozak, eliminación de secuencias que podrían formar estructura de tallo bucle, eliminación de secuencias desestabilizantes, y dos o más combinaciones de los mismos.

II. Terapia Génica Lentiviral con FIX

La terapia génica somática se ha explorado como un posible tratamiento para trastornos hemorrágicos, y en particular, para la hemofilia. La terapia génica es un tratamiento particularmente atractivo para la hemofilia debido a su potencial para curar la enfermedad a través de la producción endógena continua de FIX después de una única administración de un vector que codifica FIX. La hemofilia B es muy adecuada para una estrategia de reemplazo génico debido a que sus manifestaciones clínicas son atribuibles a una expresión disminuida de FIX funcional.

Los vectores lentivirales están obteniendo importancia como vehículos de administración génica debido a su gran capacidad y habilidad para sostener una expresión transgénica mediante la integración. Los vectores lentivirales se han evaluado en numerosos programas clínicos de terapia celular *ex-vivo* con perfiles de eficacia y seguridad prometedores.

La presente descripción proporciona métodos para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto una dosis efectiva de un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX. En algunas realizaciones, el vector lentiviral está empaquetado en una partícula lentiviral que comprende a nivel mayor de expresión de la proteína CD47 en la

superficie que un vector lentiviral control, p. ej., un vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™) sin el nivel alto de expresión de la proteína CD47 en la superficie, es decir, un nivel normal (natural) de la expresión de la proteína CD47 en la superficie. En algunas realizaciones, la dosis efectiva se reduce en relación a una dosis control del vector lentiviral control necesaria para inducir la misma actividad de FIX que el vector lentiviral.

Otros aspectos de la descripción proporcionan métodos para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto menos de 5×10^{10} unidades de transducción/kg (TU/kg) de un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de factor IX (FIX), en donde el vector lentiviral comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, el sujeto presenta una transducción disminuida de macrófagos del vector lentiviral después de la administración, en relación al vector lentiviral control. En algunas realizaciones, el sujeto presenta una respuesta inmune aloespecífica reducida frente al vector lentiviral después de la administración, en relación al vector lentiviral control. En algunas realizaciones, el sujeto presenta una actividad de FIX de al menos un 30%, en relación a la actividad de FIX normal, al menos 3 semanas después de la administración. En algunas realizaciones, el sujeto presenta una expresión específica de tejido del vector lentiviral en el hígado,

bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración.

En algunas realizaciones, la respuesta aloespecífica comprende la liberación de una citoquina en respuesta al vector lentiviral administrado. En algunas realizaciones, el sujeto presenta una expresión menos de una

5 citoquina asociada con una respuesta aloespecífica después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de la citoquina después de la administración del vector lentiviral control. En algunas realizaciones, la citoquina es una citoquina proinflamatoria. En determinadas realizaciones, la citoquina se selecciona del grupo que consiste en MIP-1a,

10 MIP-1b, MCP-1, interleuquina-2 (IL-2), interferón gamma, y cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MIP-1a después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de MIP-1a después de la administración del vector lentiviral control. En determinadas

15 realizaciones, el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MIP-1b después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de MIP-1b después de la administración del vector lentiviral control. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MCP-1 después de la administración del vector lentiviral en relación a la

20 expresión de MCP-1 después de la administración del vector lentiviral control. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta un nivel menos de expresión de IL-2 después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de IL-2 después de la administración del vector lentiviral control. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta un nivel

25 menos de expresión de interferón gamma después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de interferón gamma después de la administración del vector lentiviral control.

En algunas realizaciones, la expresión de la citoquina se reduce en al menos aproximadamente un 5%, al menos aproximadamente un 10%, al

30 menos aproximadamente un 15%, al menos aproximadamente un 20%, al

menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 35%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 45%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 55%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente un 100%, en relación a la expresión de la citoquina después de la administración del vector lentiviral control. En determinadas realizaciones, la expresión de la citoquina es indetectable después de la administración del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una expresión indetectable de una citoquina seleccionada del grupo que consiste en MIP-1a, MIP-1b, MCP-1, interleuquina-2 (IL-2), interferón gamma, y cualquier combinación de los mismos después de la administración del vector lentiviral.

En algunas realizaciones, el sujeto presenta una actividad de FIX plasmática incrementada después de la administración del vector lentiviral en relación a la actividad de FIX plasmática antes de la administración. En algunas realizaciones, el incremento se observa al menos 1 día, al menos aproximadamente 2 días, al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 4 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 6 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 3 semanas, al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 5 semanas, al menos aproximadamente 6 semanas, al menos aproximadamente 7 semanas, o al menos aproximadamente 8 semanas después de la administración. En algunas realizaciones, la actividad de FIX plasmática a aproximadamente 12 horas a aproximadamente 60 horas, aproximadamente

- 12 horas a aproximadamente 48 horas, aproximadamente 12 horas a aproximadamente 36 horas, aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 60 horas, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas, aproximadamente 24 horas a aproximadamente 36 horas, aproximadamente 36 horas a aproximadamente 60 horas, aproximadamente 36 horas a aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 48 horas a aproximadamente 60 horas después de la administración del vector lentiviral se incrementa en relación a un sujeto al que se le administra la dosis control del vector lentiviral control.
- 10 En algunas realizaciones, la actividad de FIX después de la administración del vector lentiviral es al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 100%, al menos aproximadamente un 125%, al menos aproximadamente un 150%, al menos aproximadamente un 175%, al menos aproximadamente un 200%, al menos aproximadamente un 225%, al menos
- 15 aproximadamente un 250%, al menos aproximadamente un 275%, o al menos aproximadamente un 300%, en relación a la actividad de FIX normal, al menos una semana, dos semanas, o tres semanas después de la administración del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta una actividad de FIX de al menos aproximadamente un 150%, en
- 20 relación a la actividad de FIX normal, al menos tres semanas después de la administración del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta una actividad de FIX de al menos aproximadamente un 200%, en relación a la actividad de FIX normal, al menos tres semanas después de la administración del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el sujeto
- 25 presenta una actividad de FIX de al menos aproximadamente un 225%, en relación a la actividad de FIX normal, al menos tres semanas después de la administración del vector lentiviral.

En algunas realizaciones, la actividad de FIX plasmática se incrementa después de la administración en al menos aproximadamente 2

30 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6

veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces, al menos aproximadamente 180 veces, al menos aproximadamente 190 veces, o al menos aproximadamente 200 veces, en relación a un sujeto al que se le administra la dosis control del vector lentiviral control.

En algunas realizaciones, después de la administración, el vector lentiviral se localiza específicamente en el hígado, el bazo, o tanto en el hígado como el bazo del sujeto, en donde se encuentra una mayor concentración del vector lentiviral en el hígado, el bazo, o tanto en el hígado como el bazo que en otro órgano en el cuerpo del sujeto. En algunas realizaciones, el otro órgano en el cuerpo del sujeto se selecciona del grupo que consiste en un testículo, un nodo linfático, un músculo, el timo, un riñón, un pulmón, el corazón, la corteza frontal, el tálamo, el núcleo caudado, el colículo, el cerebelo, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el sujeto presenta una localización incrementada del vector lentiviral en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto. La localización del vector lentiviral puede medirse y/o expresarse

usando cualquier método y/o unidad conocida en la técnica. En algunas realizaciones, la localización incrementada se caracteriza por un número de copias del vector (VCN) del vector lentiviral que es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces, al menos aproximadamente 180 veces, al menos aproximadamente 190 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, al menos aproximadamente 400 veces, o al menos aproximadamente 500 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto.

En determinadas realizaciones, el sujeto presenta una localización incrementada del vector lentiviral en el hígado, el bazo, o tanto en el hígado como el bazo, en donde la localización incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que es al menos 10 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del

vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta una localización incrementada del vector lentiviral en el hígado, el bazo, o tanto en el hígado como el bazo, en donde la localización incrementada se caracteriza por un

5 VCN del vector lentiviral que es al menos 50 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta una localización incrementada del vector lentiviral en el hígado, el bazo, o tanto en el hígado

10 como el bazo, en donde la localización incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que es al menos 100 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto presenta una localización

15 incrementada del vector lentiviral en el hígado, el bazo, o tanto en el hígado como el bazo, en donde la localización incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que es al menos 150 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el

20 sujeto.

A. Inhibición de la Respuesta Inmune

En algunas realizaciones, el vector lentiviral, p. ej., la partícula lentiviral, contiene uno o más polipéptidos en su superficie que inhiben una respuesta inmune frente al vector lentiviral después de la administración a un

25 sujeto humano. Determinados aspectos de la presente descripción están dirigidos a vectores lentivirales o métodos para administrar vectores lentivirales a un sujeto, en donde el vector lentiviral contiene CD47 en su superficie. En algunas realizaciones, la superficie del vector lentiviral comprende una o más moléculas de CD47. CD47 es una proteína

30 "marcadora de lo propio", que se expresa de forma ubicua en las células

humanas. La expresión en superficie de CD47 inhibe la fagocitosis inducida por macrófagos de células endógenas a través de la interacción de CD47 y SIRP α expresada en macrófagos. Las células que expresan niveles altos de CD47 presentan una menor probabilidad de ser tomadas como diana y destruidas por los macrófagos humanos *in vivo*.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una alta concentración de moléculas de polipéptido CD47 en su superficie. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína CD47, en donde se expresa el polinucleótido heterólogo que codifica la CD47. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende además un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína CD47, en donde se expresa el polinucleótido heterólogo que codifica la CD47.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral tiene un nivel mayor de una proteína CD47 porque se produce en una línea celular que tiene un alto nivel de expresión de CD47. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una célula CD47^{alta}, en donde la célula tiene una alta expresión de CD47 en la membrana celular. En realizaciones particulares, el vector lentiviral se produce en una célula HEK 293T CD47^{alta}, en donde la HEK 293T se modifica para tener una expresión incrementada de CD47 en relación a la expresión de CD47 en células HEK293T no modificadas. En algunas realizaciones, la célula HEK 293T se modifica para sobreexpresar CD47 endógena en relación a células HEK 293T no modificadas. En algunas realizaciones, la célula HEK 293T se modifica mediante la transducción de la célula HEK293T con un vector que expresa CD47 heteróloga. En algunas realizaciones, el vector que expresa CD47 heteróloga comprende un vector retroviral. En determinadas realizaciones, el vector retroviral es un vector γ -retroviral. En algunas realizaciones, el vector que expresa CD47 heteróloga no es capaz de empaquetarse de manera cruzada por el vector lentiviral.

En determinados aspectos, la presente descripción está dirigida a

métodos para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto una dosis efectiva de un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX, en donde el vector lentiviral comprende un nivel mayor de expresión de proteína CD47 en su superficie que los vectores lentivirales control producidos en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™) y en donde la dosis efectiva se reduce en relación a una dosis control del vector lentiviral control necesaria para inducir la misma actividad de FIX que el vector lentiviral. Sin estar ligado a ningún mecanismo, se cree que la expresión de CD47 en la superficie del vector lentiviral protege al vector lentiviral frente a la degradación y/o eliminación por el sistema inmune del sujeto y previene y/o reduce la respuesta inmune frente al vector lentiviral.

En algunas realizaciones, la CD47 es CD47 humana (No. de Acceso NCBI NP_001768.1). En determinadas realizaciones, la CD47 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos un 99%, o aproximadamente un 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14. En realizaciones particulares, la CD47 humana comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones, la CD47 se expresa por el vector lentiviral. En otras realizaciones, la CD47 no se expresa por el vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral se expresa en una célula huésped, en donde la célula huésped se modifica para expresar CD47. En algunas realizaciones, la célula huésped se modifica para sobreexpresar CD47. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una célula huésped que expresa una alta concentración de CD47 en comparación con las células HEK293 (ATCC® CRL-1573™). En

realizaciones particulares, el vector lentiviral se produce en células HEK293T modificadas para sobreexpresar CD47 en relación a células HEK293T no modificadas.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un nivel
5 mayor de expresión de la proteína CD47 en su superficie que un vector lentiviral control. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral control se produce en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™), que se sabe que producen 19 moléculas/ μm^2 (véase, p. ej., Sosale *et al.*, *Methods & Clinical Development* 3:16080 (2016) en la FIG. S1(d). En algunas realizaciones, el
10 vector lentiviral control comprende menos de 20 moléculas/ μm^2 de CD47 en la superficie del vector lentiviral control.

En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 2 veces a al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 2 veces a al menos aproximadamente 75 veces,
15 al menos aproximadamente 2 veces a al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 2 veces a al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 2 veces a al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 2 veces a al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 2 veces a al menos aproximadamente 10 veces,
20 al menos aproximadamente 10 veces a al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 10 veces a al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 10 veces a al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 10 veces a al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 10 veces a
25 al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 10 veces a al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 20 veces a al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 20 veces a al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 20 veces a al menos aproximadamente 50 veces, al
30 menos aproximadamente 20 veces a al menos aproximadamente 40 veces,

- o al menos aproximadamente 20 veces a al menos aproximadamente 30 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que en la superficie de los vectores lentivirales control producidos en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™). En realizaciones particulares, los vectores lentivirales
- 5 comprenden al menos aproximadamente 10 veces a al menos aproximadamente 30 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que en la superficie del vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™). En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos
- 10 aproximadamente 2,0 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3,0 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4,0 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5,0 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6,0 veces, al menos
- 15 aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7,0 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8,0 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9,0 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente
- 20 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 45 veces, al menos aproximadamente
- 25 50 veces more, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, o al menos aproximadamente 100 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que en la superficie del vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™).
- 30 En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 10 veces más de proteína CD47 en la superficie

del vector lentiviral que en la superficie del vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™). En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 15 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que en la superficie del vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™). En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 20 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que en la superficie del vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™). En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 25 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que en la superficie del vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™). En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 30 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que en la superficie del vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™).

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos 20 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 25 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 30 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 35 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 40 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 45 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 50 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 55 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 60 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 65 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 70 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 75 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 80 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 85 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 90 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 95 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 100 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 125 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 150 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 175 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 200 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie

del vector lentiviral. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 225 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 250 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 275 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 300 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 325 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 350 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 375 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 400 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 425 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 450 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 475 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 500 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 525 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 550 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 575 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 600 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 625 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 650 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 675 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 700 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 725 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 750 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 800 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 850 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 900 moléculas/ μm^2 , al menos aproximadamente 950 moléculas/ μm^2 , o al menos aproximadamente 1.000 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral.

En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 400 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 450 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 500 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 600 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral

comprende al menos aproximadamente 700 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 800 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 900 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 1.000 moléculas/ μm^2 de la proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral se expresa en una célula huésped que se modifica además para reducir la inmunogenicidad del vector lentiviral resultante. En algunas realizaciones, el vector lentiviral tiene poco o ningún complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) expuesto en la superficie. El MHC-I expuesto en la superficie expone fragmentos peptídicos de proteínas “no propias” de dentro de una célula, tales como fragmentos de proteínas indicativos de una infección, facilitando una respuesta inmune frente a la célula. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una célula MHC-I^{bajo}, en donde la célula tiene MHC-I expuesto en la superficie reducido en la membrana celular. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una célula MHC-I⁻ (o “MHC-I libre”, “MHC-1^{neg}” o “MHC-negativa”), en donde la célula no tiene MHC-I expuesto en la superficie.

Las células MHC-I⁻ o MHC-I^{bajo} pueden generarse usando cualquier medio conocido en la técnica. En algunas realizaciones, las células MHC-I⁻ o MHC-I^{bajo} se generan disrumpiendo la expresión de uno o más genes que codifican una o más proteínas del MHC. En algunas realizaciones, las células MHC-I⁻ o MHC-I^{bajo} se generan disrumpiendo la expresión del gen que codifica la beta-2-microglobulina (B2M; Ensembl ENSG00000166710; No. de Acceso de Proteína NCBI ABB01003). En algunas realizaciones, las células MHC-I⁻ o MHC-I^{bajo} se generan disrumpiendo de manera permanente

la expresión del gen que codifica la beta-2-microglobulina (B2M). En algunas realizaciones, las células MHC-I⁻ o MHC-I^{bajo} se generan bloqueando la expresión del gen que codifica la beta-2-microglobulina (B2M). En algunas realizaciones, las células MHC-I⁻ o MHC-I^{bajo} se generan introduciendo una

5 mutación en el gen que codifica la beta-2-microglobulina (B2M), en donde la mutación da lugar a la pérdida de la expresión del gen que codifica la B2M. En algunas realizaciones, las células MHC-I⁻ o MHC-I^{bajo} se generan inactivando el gen que codifica la beta-2-microglobulina (B2M). En determinadas realizaciones, las células MHC-I⁻ o MHC-I^{bajo} se generan

10 modificando las células HEK 293T para bloquear o reducir el MHC-I expuesto en la superficie. Las células HEK293-T no modificadas tienen MHC-I expuesto en la superficie. Véase, p. ej., Dellgren et al., *PLoS One* 10(8):e0135385 (2015).

En algunas realizaciones, las células son células HEK 293T MHC-I⁻, en donde las células no tienen MHC-I expuesto en la superficie. En determinadas realizaciones, las células MHC-I⁻ tienen menos de un 1% de MHC-1 expuesto en la superficie, en relación a células HEK293T no modificadas. En algunas realizaciones, las células son células HEK293T MHC-I^{bajo}, en donde las células HEK293T se modifican para tener menos de

20 aproximadamente un 90%, menos de aproximadamente un 85%, menos de aproximadamente un 80%, menos de aproximadamente un 75%, menos de aproximadamente un 70%, menos de aproximadamente un 65%, menos de aproximadamente un 60%, menos de aproximadamente un 55%, menos de aproximadamente un 50%, menos de aproximadamente un 45%, menos de

25 aproximadamente un 40%, menos de aproximadamente un 35%, menos de aproximadamente un 30%, menos de aproximadamente un 25%, menos de aproximadamente un 20%, menos de aproximadamente un 15%, menos de aproximadamente un 10%, menos de aproximadamente un 9%, menos de aproximadamente un 8%, menos de aproximadamente un 7%, menos de

30 aproximadamente un 6%, menos de aproximadamente un 5%, menos de aproximadamente un 4%, menos de aproximadamente un 3%, menos de

aproximadamente un 2%, menos de aproximadamente un 1% de MHC-I expuesto en la superficie, en relación a células HEK293T no modificadas. En determinadas realizaciones, las células MHC-I^{bajo} tienen menos de un 5% de MHC-I expuesto en la superficie, en relación a células HEK293T no modificadas. En determinadas realizaciones, las células MHC-I^{bajo} tienen menos de un 4% de MHC-I expuesto en la superficie, en relación a células HEK293T no modificadas. En determinadas realizaciones, las células MHC-I^{bajo} tienen menos de un 3% de MHC-I expuesto en la superficie, en relación a células HEK293T no modificadas. En determinadas realizaciones, las células MHC-I^{bajo} tienen menos de un 2% de MHC-I expuesto en la superficie, en relación a células HEK293T no modificadas.

En realizaciones particulares, el vector lentiviral comprende una cubierta lipídica que comprende una alta concentración de polipéptidos CD47 y que carece de MHC-I expuesto en la superficie. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una línea celular CD47^{alta}/MHC-I^{bajo}, p. ej., una línea celular HEK 293T CD47^{alta}/MHC-I^{bajo}. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una línea celular CD47^{alta}/MHC-I⁻, p. ej., una línea celular HEK 293T CD47^{alta}/MHC-I⁻.

En otra realización, la administración de un vector lentiviral descrito en la presente memoria y/o la expresión posterior del transgén de la proteína FIX no induce una respuesta inmune en un sujeto. En algunas realizaciones, la respuesta inmune comprende el desarrollo de anticuerpos frente a FIX. En algunas realizaciones, la respuesta inmune comprende la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, la respuesta inmune comprende la activación de células B, células T, o tanto células B como células T. En algunas realizaciones, la respuesta inmune es una respuesta inmune inhibidora, en donde la respuesta inmune en el sujeto reduce la actividad de la proteína FIX en relación a la actividad del FIX en un sujeto que no ha desarrollado una respuesta inmune. En determinadas realizaciones, la expresión de la proteína FIX mediante la administración del vector lentiviral

de la descripción previene una respuesta inmune inhibidora frente a la proteína FIX o la proteína FIX expresada a partir de la molécula de ácido nucleico aislada o el vector lentiviral.

B. Dosificación

5 Los vectores lentivirales, partículas de vector lentiviral, y métodos de uso de los mismos de la presente descripción permiten la prevención y/o tratamiento de la hemofilia usando dosis menores del vector lentiviral que el vector lentiviral control producido en un vector lentiviral control producido en células HEK293 (ATCC® CRL-1573™). En algunas realizaciones, los

10 vectores lentivirales de la presente descripción son efectivos a una dosis que se reduce en relación a una dosis control del vector lentiviral control necesaria para inducir la misma actividad de FIX que el vector lentiviral. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es al menos

15 aproximadamente un 5%, al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 15%, al menos aproximadamente un 20%, o al menos aproximadamente un 25% de la dosis control del vector lentiviral control-. En algunas realizaciones, la dosis es al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 35%, al menos aproximadamente un 40%, al menos aproximadamente un 45%, o al menos aproximadamente un 50% de

20 la dosis control de el vector lentiviral control-. En algunas realizaciones, la dosis es al menos aproximadamente un 55%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 70%, o al menos aproximadamente un 75% de la dosis control del vector lentiviral control. En algunas realizaciones, la dosis es al menos

25 aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de la dosis control del vector lentiviral control-.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es

aproximadamente $5,0 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $4,9 \times 10^{10}$ TU/kg,

30 aproximadamente $4,8 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $4,7 \times 10^{10}$ TU/kg,

aproximadamente $4,6 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $4,4 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $4,3 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $4,2 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $4,1 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $4,0 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $3,9 \times 10^{10}$ TU/kg,
5 aproximadamente $3,8 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $3,7 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $3,6 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $3,4 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $3,3 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $3,2 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $3,1 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $3,0 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $2,9 \times 10^{10}$ TU/kg,
10 aproximadamente $2,8 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $2,7 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $2,6 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $2,4 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $2,2 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $2,1 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $2,0 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $1,9 \times 10^{10}$ TU/kg,
15 aproximadamente $1,8 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $1,7 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $1,6 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $1,4 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $1,3 \times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente $1,1 \times 10^{10}$ TU/kg, o
aproximadamente $1,0 \times 10^{10}$ TU/kg.

20 En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es
aproximadamente $9,9 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $9,8 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente $9,7 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $9,6 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente $9,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $9,4 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente $9,3 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $9,2 \times 10^9$ TU/kg,
25 aproximadamente $9,1 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $9,0 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente $8,9 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $8,8 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente $8,7 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $8,6 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente $8,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $8,4 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente $8,3 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $8,2 \times 10^9$ TU/kg,
30 aproximadamente $8,1 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $8,0 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente $7,9 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $7,8 \times 10^9$ TU/kg,

[illegible]

aproximadamente $1,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $1,4 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $1,3 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $1,2 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente $1,1 \times 10^9$ TU/kg, o aproximadamente $1,0 \times 10^9$ TU/kg.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es

- 5 aproximadamente $9,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,8 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,6 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,4 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,2 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,1 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $9,0 \times 10^8$ TU/kg,
- 10 aproximadamente $8,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,8 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,6 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,4 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,2 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,1 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $8,0 \times 10^8$ TU/kg,
- 15 aproximadamente $7,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,8 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,6 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,4 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,2 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,1 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $7,0 \times 10^8$ TU/kg,
- 20 aproximadamente $6,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,8 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,6 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,4 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,2 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,1 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $6,0 \times 10^8$ TU/kg,
- 25 aproximadamente $5,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,8 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,6 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,4 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,2 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,1 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $5,0 \times 10^8$ TU/kg,
- 30 aproximadamente $4,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $4,8 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $4,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $4,6 \times 10^8$ TU/kg,

aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $4,4 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $4,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $4,2 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $4,1 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $4,0 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $3,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $3,8 \times 10^8$ TU/kg,
5 aproximadamente $3,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $3,6 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $3,4 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $3,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $3,2 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $3,1 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $3,0 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $2,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $2,8 \times 10^8$ TU/kg,
10 aproximadamente $2,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $2,6 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $2,4 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $2,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $2,2 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $2,1 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $2,0 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $1,9 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $1,8 \times 10^8$ TU/kg,
15 aproximadamente $1,7 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $1,6 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $1,4 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $1,3 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente $1,2 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente $1,1 \times 10^8$ TU/kg, o aproximadamente $1,0 \times 10^8$ TU/kg.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es menos de
20 aproximadamente $5,0 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,9 \times 10^{10}$
TU/kg, menos de aproximadamente $4,8 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de
aproximadamente $4,7 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,6 \times 10^{10}$
TU/kg, menos de aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de
aproximadamente $4,4 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,3 \times 10^{10}$
25 TU/kg, menos de aproximadamente $4,2 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de
aproximadamente $4,1 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,0 \times 10^{10}$
TU/kg, menos de aproximadamente $3,9 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de
aproximadamente $3,8 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,7 \times 10^{10}$
TU/kg, menos de aproximadamente $3,6 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de
30 aproximadamente $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,4 \times 10^{10}$
TU/kg, menos de aproximadamente $3,3 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de

aproximadamente $3,2 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,1 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,0 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,9 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,8 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,7 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,6 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,4 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,3 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,2 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,1 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,0 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,9 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,8 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,7 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,6 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,4 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,3 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,1 \times 10^{10}$ TU/kg, o menos de aproximadamente $1,0 \times 10^{10}$ TU/kg.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es menos de aproximadamente $9,9 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,8 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,7 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,6 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,4 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,3 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,2 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,1 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,0 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,9 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,8 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,7 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,6 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,4 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,3 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,2 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,1 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,0 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,9 \times 10^9$ TU/kg, menos de

- TU/kg, menos de aproximadamente $3,1 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,0 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,9 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,8 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,7 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,6 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,4 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,3 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,2 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,1 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,0 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,9 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,8 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,7 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,6 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,4 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,3 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,2 \times 10^9$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,1 \times 10^9$ TU/kg, o menos de aproximadamente $1,0 \times 10^9$ TU/kg.

- En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es menos de aproximadamente $9,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,7 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,6 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,1 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $9,0 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,7 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,6 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,1 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $8,0 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,7 \times 10^8$

- TU/kg, menos de aproximadamente $7,6 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $7,1 \times 10^8$
- 5 TU/kg, menos de aproximadamente $7,0 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,7 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,6 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de
- 10 aproximadamente $6,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,1 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $6,0 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,7 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,6 \times 10^8$
- 15 TU/kg, menos de aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,1 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $5,0 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de
- 20 aproximadamente $4,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,7 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,6 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $4,1 \times 10^8$
- 25 TU/kg, menos de aproximadamente $4,0 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,7 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,6 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de
- 30 aproximadamente $3,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $3,1 \times 10^8$ TU/kg, menos de

aproximadamente $3,0 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,7 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,6 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,1 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $2,0 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,9 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,8 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,7 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,6 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,4 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,3 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,2 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente $1,1 \times 10^8$ TU/kg, o menos de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ TU/kg.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 2×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 3×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 4×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 5×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 6×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 7×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 8×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre

[illegible]

aproximadamente 4×10^{10} TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, o entre aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, entre

5 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 4×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 3×10^{10} TU/kg, entre

10 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 2×10^{10} TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 10^{10} TU/kg, entre

15 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 9×10^9 TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $8,5 \times 10^9$ TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 8×10^9 TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $7,5 \times 10^9$ TU/kg, entre

20 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 7×10^9 TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $6,5 \times 10^9$ TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 6×10^9 TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $5,5 \times 10^9$ TU/kg, entre

25 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^9 TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $4,5 \times 10^9$ TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 4×10^9 TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $3,5 \times 10^9$ TU/kg, entre

30 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 3×10^9 TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $2,5 \times 10^9$ TU/kg, entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 2×10^9 , entre aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $1,5 \times 10^9$ TU/kg, entre

aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 1×10^9 TU/kg, entre

aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, entre

aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 9×10^8 TU/kg, entre

aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 8×10^8 TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 7×10^8 TU/kg, entre
5 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 6×10^8 TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 5×10^8 TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, entre
10 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 4×10^8 TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 3×10^8 TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, entre
aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente 2×10^8 , o entre
15 aproximadamente 1×10^8 TU/kg y aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg,

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es entre
aproximadamente 1×10^{10} TU/kg y aproximadamente 2×10^{10} TU/kg, entre
aproximadamente $1,1 \times 10^{10}$ TU/kg y aproximadamente $1,9 \times 10^{10}$ TU/kg, entre
aproximadamente $1,2 \times 10^{10}$ TU/kg y aproximadamente $1,8 \times 10^{10}$ TU/kg, entre
20 aproximadamente $1,3 \times 10^{10}$ TU/kg y aproximadamente $1,7 \times 10^{10}$ TU/kg, o
entre aproximadamente $1,4 \times 10^{10}$ TU/kg y aproximadamente $1,6 \times 10^{10}$ TU/kg.
En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg. En
algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es aproximadamente
 2×10^{10} TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es
25 2×10^{10} TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es
aproximadamente 6×10^{10} TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del
vector lentiviral es 6×10^{10} TU/kg.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es entre
aproximadamente 1×10^9 TU/kg y aproximadamente 2×10^9 TU/kg, entre
30 aproximadamente $1,1 \times 10^9$ TU/kg y aproximadamente $1,9 \times 10^9$ TU/kg, entre

aproximadamente $1,2 \times 10^9$ TU/kg y aproximadamente $1,8 \times 10^9$ TU/kg, entre aproximadamente $1,3 \times 10^9$ TU/kg y aproximadamente $1,7 \times 10^9$ TU/kg, o entre aproximadamente $1,4 \times 10^9$ TU/kg y aproximadamente $1,6 \times 10^9$ TU/kg. En determinadas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es entre

- 5 aproximadamente 4×10^9 y aproximadamente 6×10^9 TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es $1,5 \times 10^9$ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es 4×10^9 TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es $4,5 \times 10^9$ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es 5×10^9 TU/kg. En algunas
- 10 realizaciones, la dosis del vector lentiviral es $5,5 \times 10^9$ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es aproximadamente 6×10^9 TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es 6×10^9 TU/kg.

- En determinadas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es aproximadamente $2,5 \times 10^9$ TU/kg. En determinadas realizaciones, la dosis
- 15 del vector lentiviral es $2,5 \times 10^9$ TU/kg. En determinadas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es aproximadamente $3,0 \times 10^9$ TU/kg. En determinadas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es $3,0 \times 10^9$ TU/kg. En determinadas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es
- 20 aproximadamente $7,5 \times 10^9$ TU/kg. En determinadas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es $7,5 \times 10^9$ TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es aproximadamente 2×10^{10} TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es 2×10^{10} TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es aproximadamente 6×10^{10} TU/kg. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral es 6×10^{10}
- 25 TU/kg.

- En algunas realizaciones, el vector lentiviral se administra como una dosis única o dosis múltiples. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral se administra en una vez o dividida en múltiples subdosis, p. ej., dos subdosis, tres subdosis, cuatro subdosis, cinco subdosis, seis subdosis,
- 30 o más de seis subdosis. En algunas realizaciones, se administra más de un

vector lentiviral.

En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral se administra al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, o al menos diez veces. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral se administra una vez aproximadamente cada semana, una vez aproximadamente cada dos semanas, una vez aproximadamente cada tres semanas, o una vez aproximadamente cada cuatro semanas. En algunas realizaciones, la dosis del vector lentiviral se administra una vez aproximadamente cada 10 días, una vez aproximadamente cada 14 días, una vez aproximadamente cada dos semanas, una vez aproximadamente cada 15 días, una vez aproximadamente cada tres semanas, una vez aproximadamente cada 20 días, una vez aproximadamente cada cuatro semanas, una vez aproximadamente cada mes, dos veces aproximadamente cada mes, una vez aproximadamente cada 5 semanas, una vez aproximadamente cada 6 semanas, una vez aproximadamente cada 7 semanas, una vez aproximadamente cada 8 semanas, una vez aproximadamente cada 2 meses, una vez aproximadamente cada 9 semanas, una vez aproximadamente cada 10 semanas, una vez aproximadamente cada 11 semanas, una vez aproximadamente cada 12 semanas, una vez aproximadamente cada 3 meses, una vez aproximadamente cada 13 semanas, una vez aproximadamente cada 14 semanas, una vez aproximadamente cada 15 semanas, una vez aproximadamente cada 16 semanas, una vez aproximadamente cada 4 meses, una vez aproximadamente cada 17 semanas, una vez aproximadamente cada 18 semanas, una vez aproximadamente cada 19 semanas, una vez aproximadamente cada 20 semanas, una vez aproximadamente cada 5 meses, una vez aproximadamente cada 21 semanas, una vez aproximadamente cada 22 semanas, una vez aproximadamente cada 23 semanas, una vez aproximadamente cada 24 semanas, una vez

aproximadamente cada 25 semanas, una vez aproximadamente cada 26 semanas, o una vez aproximadamente cada 6 meses.

En algunas realizaciones, se administra una primera dosis del vector lentiviral, el sujeto se monitoriza para detectar la expresión del transgén, y se
5 administra una segunda dosis al sujeto si el sujeto tiene una expresión del transgén por debajo de un umbral predeterminado. En determinadas realizaciones, se administra al sujeto una segunda (tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si menos de aproximadamente un 100%, menos de aproximadamente un 95%, menos
10 de aproximadamente un 90%, menos de aproximadamente un 85%, menos de aproximadamente un 80%, menos de aproximadamente un 75%, menos de aproximadamente un 70%, menos de aproximadamente un 65%, menos de aproximadamente un 60%, menos de aproximadamente un 55%, menos de aproximadamente un 50%, menos de aproximadamente un 45%, menos
15 de aproximadamente un 40%, menos de aproximadamente un 35%, menos de aproximadamente un 30%, menos de aproximadamente un 25%, menos de aproximadamente un 20%, menos de aproximadamente un 15%, menos de aproximadamente un 10%, menos de aproximadamente un 5%, menos de aproximadamente un 4%, menos de aproximadamente un 3%, menos de
20 aproximadamente un 3%, o menos de aproximadamente un 1% de las células diana expresa el transgén. En algunas realizaciones, se administra al sujeto una segunda (tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si menos de aproximadamente un 50% de las células diana expresa el transgén. En algunas realizaciones, se
25 administra al sujeto una segunda (tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si menos de aproximadamente un 25% de las células diana expresa el transgén. En algunas realizaciones, se administra al sujeto una segunda (tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si
30 menos de aproximadamente un 10% de las células diana expresa el transgén. En algunas realizaciones, se administra al sujeto una segunda

(tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si menos de aproximadamente un 5% de las células diana expresa el transgén. En algunas realizaciones, se administra al sujeto una segunda (tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si menos de aproximadamente un 4% de las células diana expresa el transgén. En algunas realizaciones, se administra al sujeto una segunda (tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si menos de aproximadamente un 3% de las células diana expresa el transgén. En algunas realizaciones, se administra al sujeto una segunda (tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si menos de aproximadamente un 2% de las células diana expresa el transgén. En algunas realizaciones, se administra al sujeto una segunda (tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, o décima) dosis del vector lentiviral si menos de aproximadamente un 1% de las células diana expresa el transgén.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral se administra mediante inyección intravenosa. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se administra mediante inyección no intravenosa (p. ej., por vía subcutánea o intradérmica).

En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico, mientras en otros aspectos, el sujeto es un sujeto adulto. En algunas realizaciones, el sujeto es masculino. En otras realizaciones, el sujeto es femenino.

Los vectores lentivirales descritos en la presente memoria pueden usarse a dosificaciones bajas o reducidas (p. ej., 10^{10} TU/kg o menor, 10^9 TU/kg o menor, o 10^8 TU/kg o menor) *in vivo* en un mamífero, p. ej., un paciente humano, usando una estrategia de terapia génica para tratar una enfermedad o trastorno hemorrágico seleccionado del grupo que consiste en un trastorno de la coagulación hemorrágico, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma en la cabeza, sangrado gastrointestinal,

hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, y sangrado en la vaina del iliopsoas que sería terapéuticamente beneficiosa.

- 5 En una realización, la enfermedad o trastorno hemorrágico es hemofilia. En otra realización, la enfermedad o trastorno hemorrágico es hemofilia A.

En algunas realizaciones, las células diana (p. ej., hepatocitos) se tratan *in vitro* con dosis bajas (p. ej., 10^{10} TU/kg o menor, 10^9 TU/kg o menor, o 10^8 TU/kg o menor) de los vectores lentivirales descritos en la presente

10 memoria antes de administrarlas al paciente. En determinadas realizaciones, las células diana (p. ej., hepatocitos) se tratan *in vitro* con aproximadamente $3,0 \times 10^9$ TU/kg de los vectores lentivirales descritos en la presente memoria antes de administrarlas al paciente. En otra realización más, las células del

15 paciente (p. ej., hepatocitos) se tratan *ex vivo* con dosis bajas (p. ej., 10^{10} TU/kg o menor, 10^9 TU/kg o menor, o 10^8 TU/kg o menor) de los vectores lentivirales descritos en la presente memoria antes de administrarlas al paciente.

En algunas realizaciones, la actividad de FIX plasmática después de la administración de los vectores lentivirales descritos en la presente

20 memoria (administrados, p. ej., a 10^{10} TU/kg o menor, 10^9 TU/kg o menor, o 10^8 TU/kg o menor) se incrementa en al menos aproximadamente un 100%, al menos aproximadamente un 110%, al menos aproximadamente un 120%, al menos aproximadamente un 130%, al menos aproximadamente un 140%, al menos aproximadamente un 150%, al menos aproximadamente un 160%,

25 al menos aproximadamente un 170%, al menos aproximadamente un 180%, al menos aproximadamente un 190%, al menos aproximadamente un 200%, al menos aproximadamente un 210%, al menos aproximadamente un 220%, al menos aproximadamente un 230%, al menos aproximadamente un 240%, al menos aproximadamente un 250%, al menos aproximadamente un 260%,

30 al menos aproximadamente un 270%, al menos aproximadamente un 280%,

al menos aproximadamente un 290%, o al menos aproximadamente un 300%, en relación a los niveles de FIX circulantes fisiológicamente normales.

En una realización, la actividad de FIX plasmática después de la administración de un vector lentiviral de la presente descripción se incrementa en al menos aproximadamente un 3.000% a aproximadamente un 5.000% en relación a los niveles de FIX circulantes fisiológicamente normales. En algunas realizaciones, a los 21 días después de la administración de un vector lentiviral que comprende un gen con codones optimizados que codifica polipéptidos con actividad de FIX descrito en la presente memoria, la actividad de FIX plasmática se incrementa en al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces, al menos aproximadamente 180 veces, al menos aproximadamente 190 veces, o al menos aproximadamente 200 veces en relación a un sujeto al que se administra un vector lentiviral correspondiente que comprende una molécula de ácido nucleico de referencia que comprende la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

La presente descripción también proporciona métodos para tratar, prevenir, o mejorar un trastorno hemostático (p. ej., un trastorno hemorrágico tal como la hemofilia A) en un sujeto que lo necesita que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector lentiviral que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido

con actividad de FIX, en donde el vector lentiviral se administra como al menos una dosis de 5×10^{10} o menos TU/kg, 10^9 o menos TU/kg, o 10^8 o menos TU/kg.

El tratamiento, mejoría, y prevención por el vector lentiviral de la presente descripción puede ser una terapia de baipás. El sujeto que recibe la terapia de baipás puede haber desarrollado ya un inhibidor de un factor de coagulación, p. ej., FIX, o es propenso a desarrollar un inhibidor de un factor de coagulación.

Los vectores lentivirales de la presente descripción tratan o previenen un trastorno hemostásico mediante la estimulación de la formación de un coágulo de fibrina. El polipéptido que tiene actividad de FIX codificado por la molécula de ácido nucleico de la descripción puede activar un miembro de una cascada de la coagulación. El factor de la coagulación puede ser un participante en la ruta extrínseca, la ruta intrínseca o ambas.

Los vectores lentivirales de la presente descripción pueden usarse para tratar trastornos hemostásicos que se sabe que pueden tratarse con FIX. Los trastornos hemostásicos pueden tratarse usando métodos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad de von Willebrand, deficiencia del Factor XI (deficiencia de PTA), deficiencia del Factor XII, así como deficiencias o anomalías estructurales en fibrinógeno, protrombina, Factor V, Factor VII, Factor X, o Factor XIII, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma en la cabeza, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, y sangrado en la vaina del iliopsoas.

En algunas realizaciones, el trastorno hemostásico es un trastorno heredado. En una realización, el sujeto tiene hemofilia A. En otras realizaciones, el trastorno hemostásico es el resultado de una deficiencia de

FIX. En otras realizaciones, el trastorno hemostásico puede ser el resultado de un factor de la coagulación FIX defectuoso.

En otra realización, el trastorno hemostásico puede ser un trastorno adquirido. El trastorno adquirido puede producirse a partir de una enfermedad o afección secundaria subyacente. La afección no relacionada puede ser, como un ejemplo, pero no como una limitación, cáncer, una enfermedad autoinmune, o embarazo. El trastorno adquirido puede ser la consecuencia de la edad avanzada o de la medicación para tratar un trastorno secundario subyacente (p. ej., quimioterapia para el cáncer).

La descripción también se refiere a métodos para tratar a un sujeto que no tiene un trastorno hemostásico o una enfermedad o afección secundaria que da lugar a la adquisición de un trastorno hemostásico. La descripción se refiere de este modo a un método para tratar a un sujeto que necesita un agente hemostásico general que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector lentiviral de la presente descripción. Por ejemplo, en una realización, el sujeto que necesita un agente hemostásico general está siendo sometido, o va a ser sometido, a cirugía. El vector lentiviral de la descripción puede administrarse antes o después de la cirugía como un profiláctico.

El vector lentiviral de la descripción puede administrarse durante o después de la cirugía para controlar un episodio de sangrado agudo. La cirugía puede incluir, pero no está limitada a, trasplante de hígado, resección de hígado, o trasplante de células madre.

En otra realización, el vector lentiviral de la descripción puede usarse para tratar a un sujeto que tiene un episodio de sangrado agudo que no tiene un trastorno hemostásico. El episodio de sangrado agudo puede producirse a partir de un trauma severo, p. ej., cirugía, un accidente de automóvil, herida, laceración por disparo de pistola, o cualquier otro evento traumático que dé lugar a un sangrado incontrolado.

El vector lentiviral puede usarse profilácticamente para tratar a un sujeto con un trastorno hemostásico. El vector lentiviral también puede usarse para tratar un episodio de sangrado agudo en un sujeto con un trastorno hemostásico.

5 En algunas realizaciones, un vector lentiviral de la descripción se administra en combinación con al menos otro agente que estimula la hemostasis. Dicho otro agente que estimula la hemostasis es un agente terapéutico con actividad coagulante demostrada. Como un ejemplo, pero no como una limitación, el agente hemostásico puede incluir el Factor V, Factor
10 VII, Factor VIII, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, protrombina, o fibrinógeno o formas activadas de cualquiera de los anteriores. El factor de coagulación o agente hemostásico también puede incluir fármacos antifibrinolíticos, p. ej., ácido épsilon-amino-caproico, ácido tranexámico.

 En una realización de la descripción, la composición (p. ej., el vector
15 lentiviral) es una en la que el FIX está presente en forma activable cuando se administra a un sujeto. Dicha molécula activable puede activarse *in vivo* en el sitio de la coagulación después de la administración a un sujeto.

 El vector lentiviral de la descripción puede administrarse por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, o a través de cualquier superficie
20 mucosal, p. ej., por vía oral, sublingual, bucal, sublingual, nasal, rectal, vaginal o mediante la ruta pulmonar. El vector lentiviral puede implantarse en o unirse a un soporte sólido de biopolímero que permite la liberación lenta del vector en el sitio deseado.

 En una realización, la ruta de administración de los vectores
25 lentivirales es parenteral. El término parenteral, tal y como se usa en la presente memoria, incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Se prefiere la forma intravenosa de la administración parenteral. Aunque todas estas formas de administración se contemplan claramente como que están en el
30 alcance de la descripción, una forma de administración sería una disolución

para inyección, en particular para inyección o goteo intravenoso o intraarterial. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej., tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej., polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (p. ej., albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas de la presente memoria, el vector lentiviral puede administrarse directamente en el sitio de la población celular adversa, incrementando de esta manera la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

10 **C. El Vector Lentiviral**

Determinados aspectos de la presente descripción están dirigidos a vectores lentivirales, partículas de vector lentiviral, y/o métodos de uso de los mismos, en donde el vector lentiviral comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de factor IX (FIX). En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX es un FIX humano. En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX es una variante de FIX humano. En determinadas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX es una variante R338L de FIX humano. En determinadas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX es la variante Padua.

En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de FIX es una molécula de híbrido de monómero-dímero que comprende FIX. El término "híbrido de monómero-dímero" usado en la presente memoria se refiere a una proteína quimérica que comprende una primera cadena de polipéptido y una segunda cadena de polipéptido, que están asociadas entre sí por un enlace disulfuro, en donde la primera cadena comprende FIX y una primera región Fc y la segunda cadena comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una segunda región Fc sin el FIX. La construcción de híbrido de monómero-dímero es de este modo un híbrido que comprende un aspecto de monómero que tiene solo un factor de coagulación y un aspecto de dímero que tiene dos regiones Fc.

C.1. Secuencia de Nucleótidos que Codifica un Polipéptido con Actividad de FIX

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX tiene los codones optimizados. En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos

aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 85% de

5 identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente

10 un 91% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente

15 un 93% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente

20 un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente

25 un 97% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente

30 un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos

es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 91% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 93% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos

- aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 97% de identidad de secuencia con los nucleótidos
- 5 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 10 aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos es idéntica a los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.
- 15 En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos
- 20 aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos
- 25 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 30 aproximadamente un 91% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En

- algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 5 aproximadamente un 93% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En
- 10 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con los nucleótidos
- 15 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 97% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 20 aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. En
- 25 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos es idéntica a los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

- En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos
- 30 aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos

aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En

5 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con los nucleótidos

10 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 91% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos

15 aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 93% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En

20 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos

25 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos

30 aproximadamente un 97% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En

algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos

- 5 aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos es idéntica a los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

- 10 En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos
- 15 aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 20 aproximadamente un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 25 aproximadamente un 91% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 30 aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- aproximadamente un 93% de identidad de secuencia con los nucleótidos

139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En

5 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con los nucleótidos

10 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 97% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos

15 aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En

20 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos es idéntica a los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos

25 aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con los nucleótidos

30 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos

- aproximadamente un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con los nucleótidos
- 5 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 91% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 10 aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 93% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En
- 15 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos
- 20 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 25 aproximadamente un 97% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En
- 30 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos

139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos es idéntica a los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6.

- 5 En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos
- 10 aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos
- 15 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos
- 20 aproximadamente un 91% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En
- 25 algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 93% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con los nucleótidos
- 30 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos

aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 97% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos es idéntica a los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal tiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia con: (i) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en (i) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID

NO: 4; (iv) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 7.

En determinadas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende además una
 5 secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido tiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia con: (i) los
 10 nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido comprende la
 15 secuencia de nucleótidos mostrada en (i) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 7.

20 **C.1.a. Restos Heterólogos**

En algunas realizaciones, la molécula de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un resto heterólogo. En algunas realizaciones, el resto heterólogo se fusiona con el extremo C o el extremo N
 25 del polipéptido con actividad de FIX, en donde el polipéptido tiene actividad procoagulante. En algunas realizaciones, el resto heterólogo se inserta en uno o más sitios en el polipéptido con actividad de FIX, en donde el polipéptido tiene actividad procoagulante. En algunas realizaciones, el resto heterólogo es un polipéptido heterólogo. En determinados aspectos, el resto
 30 heterólogo es un XTEN. En algunos aspectos, el resto heterólogo

comprende al menos un XTEN insertado en uno o más sitios en el polipéptido con actividad de FIX. En otros aspectos, el resto heterólogo es un resto que prolonga la semivida (p. ej., un resto que prolonga la semivida *in vivo*), que se inserta en el polipéptido con actividad de FIX. En algunas realizaciones, el resto heterólogo se inserta en el polipéptido con actividad de FIX en un sitio de inserción descrito en la Publicación de Solicitud Internacional No. WO 2017/024060, que se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad. En determinadas realizaciones, el resto heterólogo se inserta en el polipéptido con actividad de FIX inmediatamente

5 aguas abajo de un aminoácido correspondiente al aminoácido 103 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 105 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 142 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 149 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 162 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 166 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 174 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 224 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 226 de la

10 SEQ ID NO: 2, aminoácido 228 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 413 de la SEQ ID NO: 2, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el resto heterólogo es una pareja de unión a FcRn (p. ej., un Fc, y albúmina, o un fragmento de la misma). En algunas realizaciones, el resto heterólogo es una pareja de unión a FcRn, que se

20 fusiona con el extremo C o el extremo N del polipéptido con actividad de FIX.

Los ejemplos no limitativos de restos heterólogos (p. ej., un resto que prolonga la semivida) incluyen albúmina, fragmentos de albúmina, fragmentos Fc de inmunoglobulinas, parejas de unión a FcRn, el péptido C-terminal (CTP) de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana, una

25 secuencia HAP, una transferrina, los polipéptidos PAS de la Solicitud de Pat de EE. UU. No. 20100292130, conectores de poliglicina, conectores de poliserina, péptidos y polipéptidos cortos de 6-40 aminoácidos de dos tipos de aminoácidos seleccionados de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) con grados diversos de estructura

30 secundaria de menos del 50% a más del 50%, entre otros.

En determinados aspectos, un resto heterólogo incrementa la semivida *in vivo* o *in vitro* del polipéptido con actividad de FIX producido a partir del vector lentiviral de la presente descripción. En otros aspectos, un resto heterólogo facilita la visualización o localización del polipéptido con actividad de FIX producido a partir del vector lentiviral de la presente descripción. La visualización y/o localización del polipéptido con actividad de FIX puede ser *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, o combinaciones de los mismos. En otros aspectos, un resto heterólogo incrementa la estabilidad del polipéptido con actividad de FIX producido a partir del vector lentiviral de la presente descripción. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "estabilidad" se refiere a una medición reconocida en la técnica del mantenimiento de una o más propiedades físicas del polipéptido con actividad de FIX en respuesta a una condición ambiental (p. ej., una temperatura elevada o disminuida). En determinados aspectos, la propiedad física es el mantenimiento de la estructura covalente del polipéptido con actividad de FIX (p. ej., la ausencia de escisión proteolítica, oxidación o desamidación no deseada). En otros aspectos, la propiedad física también puede ser la presencia del polipéptido con actividad de FIX en un estado plegado apropiadamente (p. ej., la ausencia de agregados o precipitados solubles o insolubles).

En determinados aspectos, un resto heterólogo que incrementa la semivida de la proteína de fusión de FIX de la descripción comprende, sin limitación, un polipéptido heterólogo tal como una albúmina, una región Fc de inmunoglobulina, una secuencia XTEN, el péptido C-terminal (CTP) de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana, una secuencia PAS, una secuencia HAP, una secuencia de péptido CTP, una transferrina, un resto de unión a albúmina, o cualesquiera fragmentos, derivados, variantes, o combinaciones de estos polipéptidos. En otros aspectos relacionados, un resto heterólogo puede incluir un sitio de unión para un resto no polipeptídico, tal como polietilen glicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), ácido polisiálico, o cualesquiera derivados, variantes, o combinaciones de

estos restos.

En determinados aspectos, un polipéptido con actividad de FIX de la descripción comprende uno, dos, tres o más restos heterólogos, que puede ser cada uno moléculas iguales o diferentes. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican XTEN. En otras realizaciones, el vector lentiviral comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican XTEN y uno o más dominios de Fc. En una realización particular, el vector lentiviral comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un XTEN insertado en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX y secuencia de nucleótidos que codifica un Fc fusionado a parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C del polipéptido con actividad de FIX.

C.1.a.i. XTEN

En algunas realizaciones, el al menos un resto heterólogo es un XTEN. Tal y como se usa aquí, "secuencia XTEN" se refiere a polipéptidos con longitud prolongada con secuencias no naturales, sustancialmente no repetitivas que están compuestas principalmente por aminoácidos hidrófilos pequeños, con la secuencia que tiene un grado bajo o ausencia de estructura secundaria o terciaria en condiciones fisiológicas. Como pareja de proteína de fusión, los XTEN pueden servir como un vehículo, confiriendo determinadas propiedades farmacocinéticas, físico-químicas y farmacéuticas deseadas cuando están unidos a una secuencia de FIX de la descripción para crear una proteína de fusión. Dichas propiedades deseables incluyen, pero no están limitadas a, parámetros farmacocinéticos y características de solubilidad mejoradas. Tal y como se usa en la presente memoria, "XTEN" excluye específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como anticuerpos de cadena única o fragmentos Fc de una cadena ligera o una cadena pesada.

En determinados aspectos, un vector lentiviral de la descripción comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un XTEN o

fragmento, variante, o derivado del mismo, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el XTEN se inserta en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX, en donde el polipéptido de fusión resultante tiene actividad procoagulante. En determinados aspectos, dos de los restos heterólogos son secuencias XTEN. En algunos aspectos, tres de los restos heterólogos son secuencias XTEN. En algunos aspectos, cuatro de los restos heterólogos son secuencias XTEN. En algunos aspectos, cinco de los restos heterólogos son secuencias XTEN. En algunos aspectos, seis o más de los restos heterólogos son secuencias XTEN.

En algunas realizaciones, la secuencia XTEN es un péptido o un polipéptido que tiene más de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.200, 1.400, 1.600, 1.800, o 2.000 residuos de aminoácidos. En determinadas realizaciones, XTEN es un péptido o un polipéptido que tiene más de aproximadamente 20 a aproximadamente 3.000 residuos de aminoácidos, más de 30 a aproximadamente 2.500 residuos, más de 40 a aproximadamente 2.000 residuos, más de 50 a aproximadamente 1.500 residuos, más de 60 a aproximadamente 1.000 residuos, más de 70 a aproximadamente 900 residuos, más de 80 a aproximadamente 800 residuos, más de 90 a aproximadamente 700 residuos, más de 100 a aproximadamente 600 residuos, más de 110 a aproximadamente 500 residuos, o más de 120 a aproximadamente 400 residuos. En una realización particular, el XTEN comprende una secuencia de aminoácidos con una longitud mayor de 42 aminoácidos y una longitud menos de 144 aminoácidos.

La secuencia XTEN puede comprender uno o más restos de secuencia de 5 a 14 (p. ej., 9 a 14) residuos de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos al menos un 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica al resto de la secuencia, en donde el resto comprende, consiste esencialmente en, o consiste en 4 a 6 tipos de

aminoácidos (p. ej., 5 aminoácidos) seleccionados del grupo que consiste en glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P). Véase, US 2010-0239554 A1.

Los ejemplos de secuencias XTEN que pueden usarse según la presente descripción se describen en la Publicación de Patente de EE. UU. No. 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1, o 2011/0172146 A1, o Publicaciones de Patente Internacional No. WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2, WO 2014/011819 A2, WO 2015/023891, o WO 2017/024060, cada una de las cuales se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad.

C.1.a.ii. Regiones Fc o parejas de unión a FcRn

En algunas realizaciones, el al menos un resto heterólogo es una región Fc (p. ej., una pareja de unión a FcRn) o un fragmento de la misma. En determinados aspectos, un vector lentiviral de la descripción comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc (p. ej., una pareja de unión a FcRn), que se inserta en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX, fusionado a la parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C del polipéptido con actividad de FIX, o ambos, en donde el polipéptido de fusión resultante tiene actividad procoagulante. "Fc" o "región Fc" tal y como se usa en la presente memoria, puede ser una pareja de unión a un receptor de Fc neonatal funcional (FcRn) que comprende un dominio Fc, variante, o fragmento del mismo, a no ser que se especifique otra cosa. Una pareja de unión a FcRn es cualquier molécula que pueda unirse específicamente al receptor FcRn con el consecuente transporte activo por el receptor FcRn de la pareja de unión a FcRn, incluyendo, pero no limitado a, albúmina. De este modo, el término Fc incluye cualesquiera variantes de Fc de IgG que sean funcionales. La región de la parte Fc de IgG que se une al receptor FcRn se

ha descrito sobre la base de la cristalografía de rayos X (Burmeister *et al.*, *Nature* 372:379 (1994), incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad). El área de contacto principal del Fc con el FcRn es cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos
5 dentro de una única cadena pesada de Ig. Las parejas de unión a FcRn incluyen, pero no están limitadas a, IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Un Fc puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina con o sin la región bisagra de la inmunoglobulina. También se incluyen
10 fragmentos, variantes, o derivados de Fc que mantienen las propiedades deseables de una región Fc en una proteína de fusión, p. ej., un incremento de la semivida, p. ej., semivida *in vivo*. Se describe una miríada de mutantes, fragmentos, variantes, y derivados, p. ej., en las Publicaciones PCT No. WO 2011/069164 A2, WO 2012/006623 A2, WO 2012/006635 A2, o WO
15 2012/006633 A2, todas las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

La secuencia de nucleótidos que codifica el uno o más dominios de Fc puede insertarse en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX, fusionado a parte de la secuencia de
20 nucleótidos que codifica el extremo C del polipéptido con actividad de FIX, o ambos. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de Fc se fusiona en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de Fc se fusiona con el
25 extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de Fc se fusiona con una secuencia de nucleótidos que codifica otro resto heterólogo, tal como un XTEN, que se inserta en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX o
30 se fusiona a la parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C de la secuencia de nucleótidos que codifica el XTEN. En algunas

realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo dominio de Fc. El segundo dominio de Fc expresado puede estar asociado con el primer dominio de Fc, p. ej., a través de uno o más enlaces covalentes.

5 **C.1.a.iii. Albúminas**

En algunas realizaciones, el al menos un resto heterólogo es una albúmina, un dominio de unión a albúmina, o una molécula pequeña de unión a albúmina, o una variante, derivado, o fragmento de los mismos. En determinados aspectos, un vector lentiviral de la descripción comprende al

10 menos una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de albúmina o fragmento, variante, o derivado del mismo, que se inserta en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX, fusionado a la parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C del polipéptido con actividad de FIX, o ambos, en donde el polipéptido de

15 fusión resultante tiene actividad procoagulante. La albúmina de suero humano (HSA, o HA), una proteína de 609 aminoácidos en su forma de longitud completa, es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como un vehículo de ligandos endógenos y exógenos. El término "albúmina" tal y como se usa en la

20 presente memoria incluye albúmina de longitud completa o un fragmento, variante, derivado, o análogo funcional de la misma. Los ejemplos de albúmina o los fragmentos o variantes de la misma se describen en las Publ. de Pat. de EE. UU. No. 2008/0194481A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1, o 2008/0153751 A1 o Publ. de Solic. PCT No.

25 2008/033413 A2, 2009/058322 A1, o 2007/021494 A2, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Los polipéptidos de unión a albúmina (ABP) pueden comprender, sin limitación, dominios de unión a albúmina bacteriana, péptidos de unión a albúmina, o fragmentos de anticuerpo de unión a albúmina que pueden

30 unirse a la albúmina. El dominio 3 de la proteína G estreptococcal, como

describen Kraulis *et al.*, FEBS Lett. 378:190-194 (1996) y Linhult *et al.*, Protein Sci. 11:206-213 (2002) es un ejemplo de un dominio de unión a albúmina bacteriana. Los ejemplos de péptidos de unión a albúmina incluyen una serie de péptidos que tienen la secuencia central DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 15). Véase, p. ej., Dennis *et al.*, J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035-35043 (2002). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo de unión a albúmina se describen en Muller y Kontermann, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9:319-326 (2007); Roovers *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 56:303-317 (2007), y Holt *et al.*, *Prot. Eng. Design Sci.*, 21:283-288 (2008), que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

En determinados aspectos, un vector lentiviral de la descripción comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de unión para una molécula pequeña no polipeptídica, variante, o derivado de la misma que puede unirse a la albúmina (p. ej., una molécula pequeña de unión a albúmina), que se inserta en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX, fusionado a la parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C del polipéptido con actividad de FIX, o ambos, en donde el polipéptido de fusión resultante tiene actividad procoagulante. Un ejemplo de dichos restos de unión a albúmina es 2-(3-maleimidopropanamido)-6-(4-(4-yodofenil)butanamido)hexanoato (etiqueta "Albu") como describen Trussel *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 20:2286-2292 (2009).

En algunas realizaciones, la secuencia del polipéptido de unión a albúmina en el polipéptido expresado está flanqueada en el extremo C, el extremo N, o ambos extremos, por una secuencia conectora de péptido Gly-Ser. En algunas realizaciones, el conector de péptido Gly-Ser es Gly₄Ser (SEQ ID NO: 16). En otras realizaciones, el conector de péptido Gly-Ser es (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO: 17).

C.1.a.iv. CTP

En algunas realizaciones, el al menos un resto heterólogo es un

péptido C-terminal (CTP) de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana o fragmento, variante, o derivado del mismo. En determinados aspectos, un vector lentiviral de la descripción comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un CTP o fragmento, variante, o derivado del mismo, que se inserta en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX, fusionado a la parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C del polipéptido con actividad de FIX, o ambos, en donde el polipéptido de fusión resultante tiene actividad procoagulante. Se sabe que la inserción de uno o más péptidos CTP en una proteína recombinante incrementa la semivida de esa proteína. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. No. 5.712.122, incorporada por referencia en la presente memoria en su totalidad. Los péptidos CTP ejemplares incluyen DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 18) o SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 19). Véase, p. ej., la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. US 2009/0087411 A1, incorporada por referencia. En algunas realizaciones, la secuencia CTP en el polipéptido expresado está flanqueada en el extremo C, el extremo N, o ambos extremos, por una secuencia conectora de péptido Gly-Ser. En algunas realizaciones, el conector de péptido Gly-Ser es Gly₄Ser (SEQ ID NO: 16). En otras realizaciones, el conector de péptido Gly-Ser es (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO: 17).

C.1.a.v. PAS

En algunas realizaciones, el al menos un resto heterólogo es un péptido PAS. En determinados aspectos, un vector lentiviral de la descripción comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido PAS o fragmento, variante, o derivado del mismo, que se inserta en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido con actividad de FIX, fusionado a la parte de la secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C del polipéptido con actividad de FIX, o ambos, en donde el polipéptido de fusión resultante tiene actividad procoagulante. Un "péptido

PAS" o "secuencia PAS", tal y como se usa en la presente memoria, significa una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente residuos de alanina y serina o que comprende principalmente residuos de alanina, serina, y prolina, formando la secuencia de aminoácidos una conformación de enrollamiento al azar en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la

5 secuencia PAS es un bloque de construcción, un polímero de aminoácidos, o un casete de secuencia que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en alanina, serina, y prolina que pueden usarse como parte del resto heterólogo en la proteína de fusión. Un polímero de aminoácidos

10 también puede formar una conformación de enrollamiento al azar cuando los residuos distintos de alanina, serina, y prolina se añaden como un constituyente menor en la secuencia PAS. Por "constituyente menor" se quiere decir que los aminoácidos distintos de alanina, serina, y prolina pueden añadirse en la secuencia PAS hasta un cierto grado, p. ej., hasta

15 aproximadamente un 12%, es decir, aproximadamente 12 de 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta aproximadamente un 10%, hasta aproximadamente un 9%, hasta aproximadamente un 8%, aproximadamente un 6%, aproximadamente un 5%, aproximadamente un 4%,

aproximadamente un 3%, es decir, aproximadamente un 2%, o

20 aproximadamente un 1%, de los aminoácidos. Los aminoácidos diferentes de alanina, serina y prolina pueden seleccionarse del grupo que consiste en Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr, y Val. En condiciones fisiológicas, un péptido PAS forma una conformación de enrollamiento al azar y de esta manera puede mediar una estabilidad

25 incrementada *in vivo* y/o *in vitro*.

Los ejemplos no limitativos de los péptidos PAS incluyen

ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 20),

AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 21),

APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 22),

30 APSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 23),

SSPSAPSPSSPASPSPPSPA (SEQ ID NO: 24),

AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 25),
 ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 26) o cualesquiera variantes,
 derivados, fragmentos, o combinaciones de los mismos. Los ejemplos
 adicionales de secuencias PAS se conocen de, p. ej., la Publ. de Pat. de EE.
 5 UU. No. 2010/0292130 A1 y Publ. de Solic. PCT No. WO 2008/155134 A1.
 Patente europea expedida EP2173890.

En algunas realizaciones, la secuencia PAS en el polipéptido
 expresado está flanqueada en el extremo C, el extremo N, o ambos
 extremos, por una secuencia conectora de péptido Gly-Ser. En algunas
 10 realizaciones, el conector de péptido Gly-Ser es Gly₄Ser (SEQ ID NO: 16).
 En otras realizaciones, el conector de péptido Gly-Ser es (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID
 NO: 17).

C.1.a.vi. HAP

En algunas realizaciones, el al menos un resto heterólogo es un
 15 péptido de polímero de homo-aminoácidos (HAP) o fragmento, variante, o
 derivado del mismo. En determinados aspectos, un vector lentiviral de la
 descripción comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica
 un péptido de polímero de homo-aminoácidos (HAP) o fragmento, variante, o
 derivado del mismo, que se inserta en la secuencia de nucleótidos que
 20 codifica el polipéptido con actividad de FIX, fusionado a la parte de la
 secuencia de nucleótidos que codifica el extremo C del polipéptido con
 actividad de FIX, o ambos, en donde el polipéptido de fusión resultante tiene
 actividad procoagulante. Un péptido HAP puede comprender una secuencia
 repetitiva de glicina, que tiene una longitud de al menos 50 aminoácidos, al
 25 menos 100 aminoácidos, 120 aminoácidos, 140 aminoácidos, 160
 aminoácidos, 180 aminoácidos, 200 aminoácidos, 250 aminoácidos, 300
 aminoácidos, 350 aminoácidos, 400 aminoácidos, 450 aminoácidos, o 500
 aminoácidos. Una secuencia HAP es capaz de prolongar la semivida de un
 resto fusionado o unido a la secuencia HAP. Los ejemplos no limitativos de
 30 la secuencia HAP incluyen, pero no están limitados a (Gly)_n, (Gly₄Ser)_n o

S(Gly₄Ser)_n, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20. En una realización, n es 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40. En otra realización, n es 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200.

- 5 Véase, p. ej., Schlapschy M *et al.*, Protein Eng. Design Selection, 20: 273-284 (2007).

C.2. Elementos Reguladores

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un elemento de control de la expresión génica. La secuencia de control de la expresión
10 génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores de mamíferos constitutivos incluyen, pero no están limitados a, los promotores de los siguientes genes: hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato quinasa, promotor de la beta-actina, y otros promotores constitutivos. Los
15 promotores virales ejemplares que funcionan constitutivamente en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores del citomegalovirus (CMV), virus de simio (p. ej., SV40), virus de papiloma, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la
20 leucemia de Moloney, y otros retrovirus, y el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple.

También pueden usarse otros promotores constitutivos. Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la descripción también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se
25 expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de la metalotioneína se induce para estimular la transcripción y traducción en presencia de determinados iones metálicos. Pueden usarse otros promotores inducibles.

En una realización, la descripción incluye la expresión de un transgén
30 bajo el control de un promotor específico de tejido y/o potenciador. En otra

realización, el promotor u otra secuencia de control de la expresión aumenta selectivamente la expresión del transgén en células hepáticas. Los ejemplos de promotores específicos del hígado incluyen, pero no están limitados a, promotor de tiretina de ratón (mTTR), un promotor del factor VIII humano endógeno (F8), promotor de alfa-1-antitripsina humana (hAAT), promotor mínimo de albúmina humana, y promotor de albúmina de ratón. En una realización particular, el promotor comprende un promotor de mTTR. El promotor de mTTR se describe en R. H. Costa et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.* 6:4697. El promotor de F8 se describe en Figueiredo y Brownlee, 1995, *J. Biol. Chem.* 270:11828-11838. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos un promotor específico de tejido, es decir, un promotor que regularía la expresión del polipéptido con actividad de FIX en un tejido o tipo celular particular. En algunas realizaciones, un promotor específico de tejido en el vector lentiviral aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana. En algunas realizaciones, el promotor específico de tejido que aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana comprende un promotor de APOA2, promotor de SERPINA1 (hAAT), promotor de mTTR, promotor de MIR122, el promotor ET (No. de GenBank AY661265; véase también Vigna et al., *Molecular Therapy* 11(5):763 (2005)), o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la célula hepática diana es un hepatocito.

Los niveles de expresión pueden aumentarse más para conseguir una eficacia terapéutica usando uno o más potenciadores. Pueden proporcionarse uno o más potenciadores bien solos o junto con uno o más elementos promotores. Típicamente, la secuencia de control de la expresión comprende una pluralidad de elementos potenciadores y un promotor específico de tejido. En una realización, un potenciador comprende una o más copias del potenciador de α -1-microglobulina/bikunina (Rouet et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:20765-20773; Rouet et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:395-404; Rouet et al., 1998, *Biochem. J.* 334:577-584; Ill et al.,

1997, *Blood Coagulation Fibrinolysis* 8:S23-S30). En otra realización, un potenciador deriva de sitios de unión de factor de transcripción específico de hígado, tales como EBP, DBP, HNF1, HNF3, HNF4, HNF6, con Enh1, que comprende HNF1, (con sentido)-HNF3, (con sentido)-HNF4, (antisentido)-
 5 HNF1, (antisentido)-HNF6, (con sentido)-EBP, (antisentido)-HNF4 (antisentido).

Los ejemplos de otros vectores y elementos de regulación génica adecuados se describen en WO 02/092134, EP1395293, o en las Patentes de EE. UU. No. 6.808.905, 7.745.179, o 7.179.903, que se incorporan por
 10 referencia en la presente memoria en su totalidad.

En general, las secuencias de control de la expresión incluirán, según sea necesario, secuencias que no se transcriben en 5' y que no se traducen en 5' implicadas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de protección
 15 terminal, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, dichas secuencias que no se transcriben en 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico codificador unido operativamente. Las secuencias de expresión génica incluyen opcionalmente secuencias potenciadoras o secuencias activadoras
 20 aguas arriba, según se desee.

Como el vector lentiviral puede transducir todos los tipos de células hepáticas, la expresión del transgén (p. ej., FIX) en diferentes tipos de células puede controlarse usando diferentes promotores en el vector lentiviral. De este modo, el vector lentiviral puede comprender promotores
 25 específicos que controlarán la expresión del transgén de FIX en diferentes tipos de tejidos o células, tal como diferentes tipos de tejidos o células hepáticos. De este modo, en algunas realizaciones, el vector lentiviral puede comprender un promotor específico endotelial que controlará la expresión del transgén de FIX en el tejido endotelial hepático, o un promotor específico
 30 de hepatocitos que controlará la expresión del transgén de FIX en los

hepatocitos, o ambos.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un promotor específico de tejido o promotores específicos de tejido que controlan la expresión del transgén de FIX en tejidos distintos del hígado. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada se integra de manera estable en el genoma de la célula diana o tejido diana, por ejemplo, en el genoma de un hepatocito o en el genoma de una célula endotelial hepática.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos un sitio donante de corte y empalme. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende al menos un sitio aceptor de corte y empalme.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia gag, una secuencia pol, una secuencia rev, un elemento de respuesta rev (RRE), o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia gag de longitud completa. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia gag truncada. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia pol de longitud completa. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia pol truncada. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia rev de longitud completa. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia rev truncada. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia RRE de longitud completa. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una secuencia RRE truncada.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un potenciador, un promotor, una secuencia diana para un microARN (miARN), un elemento regulador postranscripcional, una señal de empaquetamiento, una secuencia poli-A, una secuencia intrónica, o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral comprende un potenciador que estimula la expresión de la secuencia de nucleótidos en una

célula hepática.

En determinadas realizaciones, será útil incluir en el vector lentiviral una o más secuencias diana de miARN que, por ejemplo, están unidas operativamente al transgén de FIX. De este modo, la descripción también
 5 proporciona al menos una secuencia diana de miARN unida operativamente a la secuencia de nucleótidos de FIX o insertada de otra manera en un vector lentiviral. Más de una copia de una secuencia diana de miARN incluida en el vector lentiviral puede incrementar la efectividad del sistema.

También se incluyen diferentes secuencias diana de miARN. Por
 10 ejemplo, los vectores lentivirales que expresan más de un transgén pueden tener el transgén bajo el control de más de una secuencia diana de miARN, que pueden ser iguales o diferentes. Las secuencias diana de miARN pueden estar en tándem, pero también se incluyen otras organizaciones. El casete de expresión del transgén, que contiene las secuencias diana de
 15 miARN, también puede insertarse en el vector lentiviral en orientación antisentido. La orientación antisentido puede ser útil en la producción de partículas virales para evitar la expresión de productos génicos que de otra manera serían tóxicos para las células productoras.

En otras realizaciones, el vector lentiviral comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
 20 u 8 copias de la misma o diferente secuencia diana de miARN. Sin embargo, en determinadas otras realizaciones, el vector lentiviral no incluirá ninguna secuencia diana de miARN. La elección de si incluir o no una secuencia diana de miARN (y cuantas) estará indicada por parámetros tales como el tejido diana pretendido, el nivel de expresión requerido, etc.

25 En una realización, la secuencia diana es una diana miR-223 que se ha informado que bloquea la expresión de forma más efectiva en progenitores con destino mielóide y al menos parcialmente en las HSPC más primitivas. La diana miR-223 puede bloquear la expresión en células mieloides diferenciadas incluyendo granulocitos, monocitos, macrófagos,
 30 células dendríticas mieloides. La diana miR-223 también puede ser

adecuada para aplicaciones de terapia génica que se basan en una expresión robusta del transgén en el linaje linfoide o eritroide. La diana miR-223 también puede bloquear la expresión de forma muy efectiva en HSC humanas.

5 En otra realización, la secuencia diana es una diana miR142 (tccataaagt aggaaacact aca (SEQ ID NO: 27)). En una realización, el vector lentiviral comprende al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis copias de secuencias diana miR-142. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende cuatro copias
10 de secuencias diana miR-142. En determinadas realizaciones, la secuencia complementaria de microARN específicos hematopoyéticos, tales como miR-142 (142T) o "142-3pT", se incorpora en la región no traducida en 3' de un vector lentiviral, haciendo que el transgén que codifica el transcrito sea susceptible a la regulación a la baja mediada por miARN. Mediante este
15 método, la expresión del transgén puede evitarse en células presentadoras de antígenos (APC) del linaje hematopoyético, mientras se mantiene en las células no hematopoyéticas (Brown et al., Nat Med 2006). Esta estrategia puede imponer un control postranscripcional rígido en la expresión del transgén y de este modo permite la administración estable y la expresión a
20 largo plazo de transgenes. En algunas realizaciones, la regulación de miR-142 evita el aclaramiento mediado por inmunidad de las células transducidas y/o induce células T reguladoras (T reg) específicas de antígeno y media una tolerancia inmunológica robusta frente al antígeno codificado por el transgén.

En algunas realizaciones, la secuencia diana es una diana miR181.
25 Chen C-Z y Lodish H, *Seminars in Immunology* (2005) 17(2):155-165 describe miR-181, un miARN expresado específicamente en células B en la médula ósea de ratón (Chen y Lodish, 2005). También describe que algunos miARN humanos están ligados a leucemias.

La secuencia diana puede ser totalmente o parcialmente
30 complementaria al miARN. El término "totalmente complementaria" significa

que la secuencia diana tiene una secuencia de ácido nucleico que es un 100% complementaria a la secuencia del miARN que la reconoce. El término "parcialmente complementaria" significa que la secuencia diana es solo en parte complementaria a la secuencia del miARN que la reconoce, por lo cual la secuencia parcialmente complementaria todavía es reconocida por el miARN. En otras palabras, una secuencia diana parcialmente complementaria en el contexto de la presente descripción es efectiva para reconocer el miARN correspondiente y efectuar la prevención o reducción de la expresión del transgén en células que expresan ese miARN. Los ejemplos de secuencias diana de miARN se describen en WO2007/000668, WO2004/094642, WO2010/055413, o WO2010/125471, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX en el vector lentiviral de la presente descripción comprende, consiste, o consiste esencialmente en un vector lentiviral que comprende coFIX-1-R338L (SEQ ID NO: 1).

C.3. Vectores Lentivirales

Los lentivirus incluyen miembros del grupo de lentivirus bovinos, grupo de lentivirus equinos, grupo de lentivirus felinos, grupo de lentivirus ovicaprinos, y grupo de lentivirus de primates. El desarrollo de vectores lentivirales para terapia génica se ha revisado en Klimatcheva et al. (1999) *Frontiers in Bioscience* 4:481-496. El diseño y uso de vectores lentivirales adecuados para la terapia génica se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE. UU. No. 6.207.455 y 6.615.782. Los ejemplos de lentivirus incluyen, pero no están limitados a, VIH-1, VIH-2, pseudotipo VIH-1/VIH-2, VIH-1/SIV, FIV, virus de la encefalitis artritis de caprinos (CAEV), virus de la anemia infecciosa de equinos, y virus de la inmunodeficiencia de bovinos.

En FIG. 1 se presenta una representación esquemática de un vector lentiviral de la presente descripción. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la presente descripción es un vector lentiviral de "tercera

generación". Tal y como se usa en la presente memoria, el término vector lentiviral de "tercera generación" se refiere a un sistema de empaquetamiento lentiviral que tiene las características de un sistema de vector de segunda generación, y que además carece de un gen tat funcional, tal como uno en el que se ha delecionado o inactivado el gen tat.

Típicamente, el gen que codifica rev se proporciona en una construcción de expresión separada. Véase, p. ej., Dull et al. (1998) J. Virol. 72: 8463-8471.

Tal y como se usa en la presente memoria, un sistema de vector lentiviral de "segunda generación" se refiere a un sistema de empaquetamiento lentiviral que carece de genes accesorios funcionales, tal como uno en el que se han delecionado o inactivado los genes accesorios vif, vpr, vpu, y nef. Véase, p. ej., Zufferey et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:871-875.

Tal y como se usa en la presente memoria, "sistema de empaquetamiento" se refiere a un conjunto de construcciones virales que comprende genes que codifican proteínas virales implicadas en el empaquetamiento de un virus recombinante.

Típicamente, las construcciones del sistema de empaquetamiento se incorporarán finalmente en una célula de empaquetamiento.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral de tercera generación de la presente descripción es un vector lentiviral autoinactivante. En algunas realizaciones, el vector lentiviral es un vector lentiviral de pseudotipo VSV.G.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un promotor específico de mamíferos para la expresión del transgén. En algunas realizaciones, el promotor específico de mamíferos es un promotor de citomegalovirus (CMV).

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende un promotor específico de hepatocitos para la expresión del transgén. En algunas realizaciones, el promotor específico de hepatocitos es un promotor de transtiretina potenciado. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una o más secuencias diana para miR-142 para reducir la respuesta inmune frente al producto del transgén. En algunas realizaciones, la incorporación de una o más secuencias diana para miR-142 en un vector lentiviral de la presente descripción permite un perfil de

- expresión de un transgén deseado. Por ejemplo, la incorporación de una o más secuencias diana para miR-142 puede suprimir la expresión del transgén en linajes hematopoyéticos intravasculares y extravasculares, mientras que la expresión del transgén se mantiene en células no hematopoyéticas. No se ha detectado oncogénesis en ratones propensos a tumores tratados con el sistema de vector lentiviral de la presente descripción. Véase, Brown et al. (2007) Blood 110:4144-52, Brown et al. (2006) Nat. Med. 12:585-91, y Cantore et al. (2015) Sci. Transl. Med. 7(277):277ra28.
- Los vectores lentivirales de la descripción incluyen polinucleótidos que codifican los polipéptidos que tienen actividad de FIX descritos en la presente memoria. En una realización, el polipéptido que tiene actividad de FIX está unido operativamente a una secuencia de control de la expresión. Tal y como se usa en la presente memoria, dos secuencias de ácido nucleico están unidas operativamente cuando están unidas covalentemente de manera que se permite que cada secuencia de ácido nucleico componente retenga su funcionalidad. Una secuencia codificadora y una secuencia de control de la expresión génica se dice que están unidas operativamente cuando están unidas covalentemente de manera que se pone la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia codificadora bajo la influencia o control de la secuencia de control de la expresión génica. Dos secuencias de ADN se dice que están unidas operativamente si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión génica en 5' da lugar a la transcripción de la secuencia codificadora y si la naturaleza de la unión entre dos secuencias de ADN no (1) da lugar a la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de la secuencia codificadora, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente de traducirse en una proteína. De este modo, una secuencia de expresión génica estará unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico codificadora si la secuencia de expresión génica es capaz de realizar la

transcripción de esa secuencia de ácido nucleico codificadora de manera que el transcrito resultante se traduce en la proteína o polipéptido deseado.

En determinadas realizaciones, el vector lentiviral es un vector de un lentivirus recombinante capaz de transducir células que no se están
 5 dividiendo. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral es un vector de un lentivirus recombinante capaz de transducir células hepáticas (p. ej., hepatocitos). El genoma del lentivirus y el ADN proviral tienen típicamente los tres genes encontrados en los retrovirus: gag, pol y env, que están flanqueados por dos secuencias de repetición terminal largas (LTR). El gen
 10 gag codifica las proteínas estructurales internas (matriz, cápside y nucleocápside); el gen pol codifica la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa), una proteasa y una integrasa; y el gen env codifica glicoproteínas de la cubierta viral. Las LTR en 5' y 3' sirven para estimular la transcripción y poliadenilación del ARN de los viriones. La LTR contiene
 15 todas las demás secuencias que actúan en cis necesarias para la replicación viral. Los lentivirus tienen genes adicionales que incluyen vif, vpr, tat, rev, vpu, nef y vpx (en VIH-1, VIH-2 y/o SIV).

Adyacentes a la LTR en 5' se encuentran las secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador de
 20 ARNt) y para la encapsidación eficiente del ARN viral en partículas (el sitio Psi). Si las secuencias necesarias para la encapsidación (o empaquetamiento del ARN retroviral en viriones infecciosos) están ausentes en el genoma viral, el defecto en cis previene la encapsidación del ARN genómico.

25 Sin embargo, el mutante resultante sigue siendo capaz de dirigir la síntesis de todas las proteínas de los viriones. La descripción proporciona un método para producir un vector lentiviral recombinante capaz de transducir una célula que no se está dividiendo que comprende transfectar una célula huésped adecuada con dos o más vectores que portan las funciones de
 30 empaquetamiento, concretamente gag, pol y env, así como rev y tat. Como

se describirá más adelante en la presente memoria, los vectores que carecen de un gen tat funcional son deseables para determinadas aplicaciones. De este modo, por ejemplo, un primer vector puede proporcionar un ácido nucleico que codifica un gag viral y un pol viral y otro vector puede proporcionar un ácido nucleico que codifica un env viral para producir una célula de empaquetamiento. La introducción de un vector que proporciona un gen heterólogo, en la presente memoria identificado como un vector de transferencia, en una célula de empaquetamiento rinde una célula productora que libera partículas virales infecciosas que portan el gen extraño de interés.

Según la configuración de vectores y genes extraños indicada anteriormente, el segundo vector puede proporcionar un ácido nucleico que codifica un gen de la cubierta viral (env). El gen env puede derivar de casi cualquier virus adecuado, incluyendo retrovirus. En algunas realizaciones, la proteína env es una proteína de la cubierta anfotrófica que permite la transducción de células de la especie humana y otras especies.

Los ejemplos de genes env derivados de retrovirus incluyen, pero no están limitados a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV o MMLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV o HSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV o MMTV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV o GALV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del sarcoma de Rous (RSV). También pueden usarse otros genes env tales como la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (VSV G), el de los virus de la hepatitis y de influenza. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de env viral está asociada operativamente con secuencias reguladoras descritas en otro lugar de la presente memoria.

En determinadas realizaciones, el vector lentiviral tiene los genes de virulencia de VIH env, vif, vpr, vpu y nef deletados sin comprometer la capacidad del vector de transducir células que no están dividiéndose. En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una delección de la

región U3 de la LTR en 3'. La delección de la región U3 puede ser una delección completa o una delección parcial.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción que comprende la secuencia de nucleótidos del polipéptido que tiene actividad de FIX descrita en la presente memoria puede transfectarse en una célula con (a) una primera secuencia de nucleótidos que comprende los genes gag, pol, o gag y pol y (b) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen env heterólogo; en donde el vector lentiviral carece de un gen tat funcional. En otras realizaciones, la célula se transfecta además con una cuarta secuencia de nucleótidos que comprende un gen rev. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral carece de genes funcionales seleccionados de vif, vpr, vpu, vpx y nef, o una combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, un vector lentiviral de la presente descripción comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican una proteína gag, un elemento de respuesta Rev, una zona central de polipurina (cPPT), o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral contiene en su superficie uno o más polipéptidos que mejoran el direccionamiento y/o actividad del vector lentiviral o el polipéptido codificado que tiene actividad de FIX. El uno o más polipéptidos pueden incorporarse durante la gemación del vector lentiviral de una célula huésped. Durante la producción lentiviral, las partículas virales se liberan por gemación de una célula huésped productora. Durante el proceso de gemación, la partícula viral adquiere una cubierta lipídica, que deriva de la membrana lipídica de la célula huésped. Como resultado, la cubierta lipídica de la partícula viral puede incluir polipéptidos unidos a la membrana que estaban presentes previamente en la superficie de la célula huésped.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral expresa uno o más polipéptidos en su superficie que inhiben una respuesta inmune frente al vector lentiviral después de la administración a un sujeto humano. En

algunas realizaciones, la superficie del vector lentiviral comprende una o más moléculas de CD47. CD47 es una proteína "marcadora de lo propio", que se expresa de manera ubicua en las células humanas. La expresión en la superficie de CD47 inhibe la fagocitosis inducida por macrófagos de células endógenas a través de la interacción de CD47 y SIRP α expresada en macrófagos. Las células que expresan niveles altos de CD47 presentan una menor probabilidad de ser tomadas como diana y destruidas por los macrófagos humanos *in vivo*.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una alta concentración de moléculas de polipéptido CD47 en su superficie. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una línea celular que tiene un alto nivel de expresión de CD47. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una célula CD47alta, en donde la célula tiene una alta expresión de CD47 en la membrana celular. En realizaciones particulares, el vector lentiviral se produce en una célula HEK 293T CD47alta, en donde la célula HEK 293T tiene una alta expresión de CD47 en la membrana celular. En algunas realizaciones, la célula HEK 293T se modifica para tener una expresión incrementada de CD47 en relación a células HEK 293T no modificadas. En determinadas realizaciones, la CD47 es CD47 humana.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral comprende una CD47 humana que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones, el vector lentiviral tiene poca o ninguna

expresión en la superficie del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I). El MHC-I expresado en la superficie expone fragmentos de péptidos de proteínas "no propias" de dentro de una célula, tales como fragmentos de proteínas indicativos de una infección, facilitando una

5 respuesta inmune frente a la célula. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una célula MHC-I^{bajo}, en donde la célula tiene una expresión reducida de MHC-I en la membrana celular. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una célula MHC-I⁻ (o "MHC-I^{libre}", "MHC-I^{neg}" o "MHC-negativa"), en donde la célula carece de expresión

10 de MHC-I.

En realizaciones particulares, el vector lentiviral comprende una cubierta lipídica que comprende una alta concentración de polipéptidos CD47 y carece de polipéptidos MHC-I. En determinadas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una línea celular CD47^{alta}/MHC-I^{bajo}, p. ej., una

15 línea celular HEK 293T CD47^{alta}/MHC-I^{bajo}. En algunas realizaciones, el vector lentiviral se produce en una línea celular CD47^{alta}/MHC-I^{libre}, p. ej., una línea celular HEK 293T CD47^{alta}/MHC-I^{libre}. Los ejemplos de vectores lentivirales se describen en la Patente de EE. UU. No. 9.050.269 y en las Publicaciones Internacionales No. WO9931251, W09712622, W09817815,

20 W09817816, y WO9818934, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

III. Composiciones Farmacéuticas

Las composiciones que contienen un vector lentiviral, una molécula de ácido nucleico, un polipéptido codificado por la molécula de ácido

25 nucleico, o una célula huésped de la presente descripción pueden contener un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Por ejemplo, pueden contener excipientes y/o auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones diseñadas para su administración al sitio de la acción.

30 En una realización, la presente descripción está dirigida a una

composición farmacéutica que comprende (a) una molécula de ácido nucleico, un vector lentiviral, un polipéptido, o una célula huésped descritos en la presente memoria; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede formularse para administración parenteral (es decir, intravenosa, subcutánea, o intramuscular) por inyección en bolo. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en contenedores de múltiples dosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones, o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua libre de pirógenos.

En una realización, la ruta de administración de los vectores lentivirales es parenteral. El término parenteral tal y como se usa en la presente memoria incluye la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Se prefiere la forma intravenosa de la administración parenteral. Aunque todas estas formas de administración se contemplan claramente como parte del alcance de la descripción, una forma para la administración sería una disolución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej., tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej., polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (p. ej., albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas de la presente memoria, el vector lentiviral puede administrarse directamente en el sitio de la población celular adversa, incrementando de esta manera la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen

disoluciones, suspensiones, y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilen glicol, polietilen glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua,

- 5 disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios tamponados. En la descripción objeto, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, tampón fosfato 0,01-0,1M y preferiblemente 0,05M o disolución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de
- 10 fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos,
- 15 antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

- Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones (cuando sean solubles en agua) o dispersiones estériles acuosas y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables. En
- 20 dichos casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en el que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conservará preferiblemente frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de
 - 25 dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos.

- 30 La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse

por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la

5 composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las disoluciones estériles inyectables pueden prepararse por la incorporación de un compuesto activo (p. ej., un

10 polipéptido en sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en la presente memoria, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que

15 contiene un medio básico de dispersión y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones estériles inyectables, los métodos de preparación preferidos son secado en vacío y liofilización, lo que rinde un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado

20 de una disolución del mismo previamente esterilizada por filtración. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se ponen en contenedores tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en la forma de un kit. Dichos

25 artículos de fabricación tendrán preferiblemente etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece, o está predispuesto a padecer, trastornos de la coagulación.

Las formulaciones en depósito inyectables pueden prepararse formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros

30 biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la

relación de fármaco a polímero, y de la naturaleza del polímero empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Otros polímeros biodegradables ejemplares son poliortoésteres y polianhídridos. Las formulaciones en depósito inyectables también pueden prepararse
 5 atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones.

La composición farmacéutica también puede formularse para la administración rectal como un supositorio o enema de retención, p. ej., que contiene bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

10 En las composiciones pueden incorporarse compuestos activos suplementarios. En una realización, la molécula de ácido nucleico de la descripción se formula con un factor de coagulación, o una variante, fragmento, análogo, o derivado del mismo. Por ejemplo, el factor de coagulación incluye, pero no está limitado a, factor V, factor VII, factor VIII,
 15 factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, protrombina, fibrinógeno, factor de von Willebrand o factor tisular soluble recombinante (rsTF) o formas activadas de cualquiera de los anteriores. El factor de coagulación de agente hemostático también puede incluir fármacos antifibrinolíticos, p. ej., ácido épsilon-amino-caproico, ácido tranexámico.

20 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es ventajoso formular las
 25 composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980).

También se pretende que estén en el alcance de la descripción las dosis intermedias en los rangos anteriores. Pueden administrarse a los
 30 sujetos dichas dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o según

cualquier otro esquema determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar conlleva la administración en dosificaciones múltiples a lo largo de un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses.

El vector lentiviral de la descripción puede administrarse a un sujeto en diferentes estadios del desarrollo. Por ejemplo, en los seres humanos, los diferentes estadios del desarrollo pueden clasificarse como neonato (p. ej., menos de 1 mes de edad), infante (1 mes a 2 años de edad), niño (2 años a 12 años de edad), adolescente (12 años a menos de 16 años de edad), o adulto (más de 16 años de edad). En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un neonato humano. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un sujeto humano con menos de aproximadamente 1 mes de edad. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un infante humano. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un sujeto humano de menos de entre aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 años de edad. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un niño humano. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un sujeto humano de entre aproximadamente 2 años a aproximadamente 12 años de edad. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un adolescente humano. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un sujeto humano de entre aproximadamente 12 años a aproximadamente 16 años de edad. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un adulto humano. En algunas realizaciones, el vector lentiviral de la descripción se administra a un sujeto humano mayor de aproximadamente 16 años de edad. Un experto en la técnica será capaz de determinar el estadio de desarrollo en otros organismos. Por ejemplo, un experto en la técnica entenderá que un ratón de dos semanas de edad es un adolescente.

La dosificación y la frecuencia de los vectores lentivirales de la

descripción puede variar dependiendo de diversos factores conocidos para los expertos en la técnica.

El vector lentiviral de la descripción puede administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son efectivos en el
5 tratamiento del trastorno o afección que necesita tratamiento (p. ej., profiláctico o terapéutico).

Tal y como se usa en la presente memoria, la administración de vectores lentivirales de la descripción en conjunción o combinación con una terapia adyuvante significa la administración o la aplicación secuencial,
10 simultánea, coextensiva, concurrente, concomitante o contemporánea de la terapia y los polipéptidos descritos. Los expertos en la técnica apreciarán que la administración o aplicación de los diversos componentes del régimen terapéutico combinado puede ajustarse en el tiempo para aumentar la efectividad global del tratamiento. Un experto (p. ej., un médico) será capaz
15 fácilmente de discernir los regímenes terapéuticos combinados efectivos sin experimentación innecesaria sobre la base de la terapia adyuvante seleccionada y las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

Se apreciará además que los vectores lentivirales de la descripción pueden usarse en conjunción o combinación con un agente o agentes (p. ej.,
20 para proporcionar un régimen terapéutico combinado). Los agentes ejemplares con los que puede combinarse un vector lentiviral de la presente descripción incluyen agentes que representan el estándar de cuidado actual para un trastorno particular que se está tratando. Dichos agentes pueden tener una naturaleza química o biológica. El término "biológico" o "agente
25 biológico" se refiere a cualquier agente farmacéuticamente activo preparado a partir de organismos vivos y/o sus productos que se pretende para uso como un agente terapéutico.

La cantidad de agente que se va a usar en combinación con los vectores lentivirales de la presente descripción puede variar dependiendo de
30 los sujetos o puede administrarse según lo que se sabe en la técnica. Véase,

p. ej., Bruce A Chabner et al., Antineoplastic Agents, en GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 ((Joel G. Hardman et al., eds., 9ª ed. 1996). En otra realización, se administra una cantidad de dicho agente consistente con el estándar de
 5 cuidado.

En determinadas realizaciones, los vectores lentivirales de la presente invención se administran conjuntamente con un agente inmunosupresor, antialérgico, o antiinflamatorio. Estos agentes se refieren generalmente a sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmune del
 10 sujeto que se está tratando en la presente memoria. Estos agentes incluyen sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan a la baja o suprimen la expresión de autoantígenos, o enmascaran los antígenos de MHC. Los ejemplos de dichos agentes incluyen pirimidinas sustituidas con en 5 2-amino-6-arilo; azatioprina; ciclofosfamida; bromocriptina; danazol;
 15 dapsona; glutaraldehído; anticuerpos antiidiotípicos para antígenos de MHC y fragmentos de MHC; ciclosporina A; esteroides tales como glucocorticosteroides, p. ej., prednisona, metilprednisolona, y dexametasona; antagonistas de citoquinas o del receptor de citoquinas incluyendo anticuerpos anti-interferón- γ , - β , o - α , anticuerpos anti-factor de necrosis
 20 tumoral α , anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral β , anticuerpos anti-interleuquina-2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2; anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; anticuerpos anti-L3T4; anti-globulina de linfocitos heteróloga; anticuerpos T generales; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3; estreptoquinasa; TGF- β ;
 25 estreptodornasa; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; y rapamicina. En determinadas realizaciones, el agente es un antihistamínico. Un “antihistamínico” tal y como se usa en la presente memoria es un agente que antagoniza el efecto fisiológico de la histamina. Los ejemplos de antihistamínicos son clorfeniramina, difenhidramina, prometazina, cromolina
 30 de sodio, astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, hidrocloreuro de cetirizina, fumarato de

clemastina, hidroclicloruro de ciproheptadina, maleato de dexbromfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenhidrinato, hidroclicloruro de difenhidramina, succinato de doxilamina, hidroclicloruro de fexofendadina, hidroclicloruro de terfenadina, hidroclicloruro de hidroxizina, loratidina, 5 hidroclicloruro de meclizina, citrato de tripelanamina, hidroclicloruro de tripelenamina, e hidroclicloruro de triprolidina.

Los agentes inmunosupresores, antialérgicos, o antiinflamatorios pueden incorporarse en el régimen de administración del vector lentiviral. Por ejemplo, la administración de agentes inmunosupresores o 10 antiinflamatorios puede comenzar antes de la administración de los vectores lentivirales descritos y puede continuar con una o más dosis posteriormente. En determinadas realizaciones, los agentes inmunosupresores o antiinflamatorios se administran como premedicación de los vectores lentivirales.

15 Como se ha discutido previamente, los vectores lentivirales de la presente descripción, pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente efectiva para el tratamiento in vivo de trastornos de la coagulación. A este respecto, se apreciará que los vectores lentivirales de la descripción pueden formularse para facilitar la administración y estimular la 20 estabilidad del agente activo. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas según la presente descripción comprenden un vehículo estéril, no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como disolución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden 25 administrarse en dosis únicas o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente efectiva del polipéptido.

Además del compuesto activo, la forma de dosificación líquida puede contener ingredientes inertes tales como agua, alcohol etílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilen glicol, 30 1,3-butilen glicol, dimetilformamida, aceites, glicerol, alcohol

tetrahidrofurfurílico, polietilen glicoles, y ésteres de ácidos grasos de sorbitán.

Los ejemplos no limitativos de vehículos farmacéuticos adecuados también se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. Algunos ejemplos de excipientes incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilen glicol, agua, etanol, y similares. La composición también puede contener reactivos para tamponar el pH, y agentes humectantes o emulsionantes.

En algunas realizaciones, la composición se administra por una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración tópica, administración intraocular, administración intratecal, y administración subdural. La administración parenteral puede ser administración intravenosa o subcutánea.

En algunas realizaciones, la composición se usa para tratar una enfermedad o afección hemorrágica en un sujeto que lo necesita. La enfermedad o afección hemorrágica se selecciona del grupo que consiste en un trastorno de la coagulación hemorrágico, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma en la cabeza, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, sangrado en la vaina del iliopsoas y cualquier combinación de las mismas. En otras realizaciones más, está programado que el sujeto se someta a cirugía. En otras realizaciones más, el tratamiento es profiláctico o a demanda.

Están disponibles varios ensayos para evaluar la función del sistema de la coagulación: el ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), ensayo cromogénico, ensayo ROTEM®, ensayo de tiempo de

protrombina (PT) (también usado para determinar el INR), ensayo de fibrinógeno (frecuentemente por el método de Clauss), recuento de plaquetas, ensayo de la función plaquetaria (frecuentemente por PFA-100), TCT, tiempo de sangrado, ensayo de mezclado (donde una anomalía se corrige si el plasma del paciente se mezcla con plasma normal), ensayos de factores de coagulación, anticuerpos antifosfolípido, dímero D, ensayos genéticos (p. ej., factor V de Leiden, mutación en protrombina G20210A), tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (dRVVT), ensayos de función plaquetaria misceláneos, tromboelastografía (TEG o Sonoclot), tromboelastometría (TEM[®], p. ej., ROTEM[®]), o tiempo de lisis de euglobulina (ELT).

El ensayo de aPTT es un indicador de comportamiento que mide la eficacia de las rutas de coagulación tanto "intrínseca" (también referida como la ruta de activación por contacto) como la común. Este ensayo se usa comúnmente para medir la actividad de coagulación de factores de coagulación recombinantes disponibles comercialmente, p. ej., FVIII o FIX. Se usa conjuntamente con el tiempo de protrombina (PT), que mide la ruta extrínseca.

El análisis ROTEM[®] proporciona información sobre la cinética completa de la hemostasis: tiempo de coagulación, formación de coágulos, estabilidad de los coágulos y lisis. Los diferentes parámetros en la tromboelastometría dependen de la actividad del sistema de coagulación plasmático, función plaquetaria, fibrinólisis, o muchos factores que influyen en estas interacciones. Este ensayo puede proporcionar una visión completa de la hemostasis secundaria.

IV. Moléculas de Ácidos Nucleicos

La descripción también proporciona moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican un polipéptido que tiene actividad de FIX. En determinadas realizaciones, la molécula de ácido aislada comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente un 70%,

al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 91% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 93% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 97% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos

tiene al menos aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido aislada comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal tiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia con: (i) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en (i) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 7.

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido aislada comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido tiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia con: (i) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 85-138 de la

SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en

5 (i) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 2; (ii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 3; (iii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 4; (iv) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 5; (v) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 6; o (vi) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 7.

La descripción también proporciona vectores que comprenden una

10 molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el vector es un vector lentiviral, p. ej., cualquier vector lentiviral descrito en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos

15 aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o

20 aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7.

En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos

25 aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En

30 algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos

que tiene al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con la

5 secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 91% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene

10 al menos aproximadamente un 92% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 93% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas

15 realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia con la

20 secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene

25 al menos aproximadamente un 97% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 98% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas

30 realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia con la

secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el vector comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el vector comprende además uno o más elementos reguladores descritos en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el vector comprende un promotor específico de tejido. En determinadas realizaciones, el promotor específico de tejido aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana. En determinadas realizaciones, el promotor específico de tejido que aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana comprende un promotor de APOA2, promotor de SERPINA1 (hAAT), promotor de mTTR, promotor de MIR122, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la célula hepática diana es un hepatocito.

V. Expresión Específica de Tejido

En determinadas realizaciones, será útil incluir en el vector lentiviral una o más secuencias diana de miARN que, por ejemplo, están unidas operativamente al transgén de FIX optimizado. De este modo, la descripción también proporciona al menos una secuencia diana de miARN unida operativamente a la secuencia de nucleótidos de FIX optimizada o insertada de otra manera en un vector lentiviral. Más de una copia de una secuencia diana de miARN incluida en el vector lentiviral puede incrementar la efectividad del sistema.

También se incluyen diferentes secuencias diana de miARN. Por ejemplo, los vectores lentivirales que expresan más de un transgén pueden tener el transgén bajo el control de más de una secuencia diana de miARN, que pueden ser iguales o diferentes. Las secuencias diana de miARN pueden estar en tándem, pero también se incluyen otras organizaciones. El casete de expresión del transgén, que contiene las secuencias diana de miARN, también puede insertarse en el vector lentiviral en orientación

antisentido. La orientación antisentido puede ser útil en la producción de partículas virales para evitar la expresión de productos génicos que de otra manera serían tóxicos para las células productoras.

En otras realizaciones, el vector lentiviral comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 copias de la misma o diferente secuencia diana de miARN. Sin embargo, en determinadas otras realizaciones, el vector lentiviral no incluirá ninguna secuencia diana de miARN. La elección de si incluir o no una secuencia diana de miARN (y cuantas) estará indicada por parámetros conocidos tales como el tejido diana pretendido, el nivel de expresión requerido, etc.

En una realización, la secuencia diana es una diana de miR-223 que se ha informado que bloquea la expresión de forma más efectiva en progenitores con destino mieloides y al menos parcialmente en las HSPC más primitivas. La diana de miR-223 puede bloquear la expresión en células mieloides diferenciadas incluyendo granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas mieloides. La diana de miR-223 también puede ser adecuada para aplicaciones de terapia génica que se basan en una expresión robusta del transgén en el linaje linfoides o eritroide. La diana de miR-223 también puede bloquear la expresión de forma muy efectiva en HSC humanas.

En otra realización, la secuencia diana es una diana de miR142 (p. ej., tccataaagt aggaacact aca (SEQ ID NO: 27)). En una realización, el vector lentiviral comprende 4 copias de secuencias diana de miR-142. En determinadas realizaciones, la secuencia complementaria de microARN específicos hematopoyéticos, tales como miR-142 (142T) o "142-3pT", se incorpora en la región no traducida en 3' de un vector lentiviral, haciendo que el transgén que codifica el transcrito sea susceptible a la regulación a la baja medida por miARN. Mediante este método, la expresión del transgén puede evitarse en células presentadoras de antígenos (APC) del linaje hematopoyético, mientras se mantiene en las células no hematopoyéticas (Brown et al., Nat Med 2006). Esta estrategia puede imponer un control

postranscripcional rígido en la expresión del transgén y de este modo permite la administración estable y la expresión a largo plazo de transgenes. En algunas realizaciones, la regulación de miR-142 evita el aclaramiento mediado por inmunidad de las células transducidas y/o induce células T reguladoras (T reg) específicas de antígeno y media una tolerancia inmunológica robusta frente al antígeno codificado por el transgén.

En algunas realizaciones, la secuencia diana es una diana de miR181. Chen C-Z y Lodish H, *Seminars in Immunology* (2005) 17(2):155-165 describe miR-181, un miARN expresado específicamente en células B en la médula ósea de ratón (Chen y Lodish, 2005). También describe que algunos miARN humanos están ligados a leucemias.

La secuencia diana puede ser totalmente o parcialmente complementaria al miARN. El término "totalmente complementaria" significa que la secuencia diana tiene una secuencia de ácido nucleico que es un 100% complementaria a la secuencia del miARN que la reconoce. El término "parcialmente complementaria" significa que la secuencia diana es solo en parte complementaria a la secuencia del miARN que la reconoce, por lo cual la secuencia parcialmente complementaria todavía es reconocida por el miARN. En otras palabras, una secuencia diana parcialmente complementaria en el contexto de la presente descripción es efectiva para reconocer el miARN correspondiente y efectuar la prevención o reducción de la expresión del transgén en células que expresan ese miARN. Los ejemplos de secuencias diana de miARN se describen en WO2007/000668, WO2004/094642, WO2010/055413, o WO2010/125471, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

VI. Células Huésped y Métodos de Preparación

La descripción también proporciona una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico o vector lentiviral de la descripción. Determinados aspectos de la descripción están dirigidos a preparar o producir vectores lentivirales que comprenden transfectar y/o

transformar una célula huésped con un vector lentiviral descrito en la presente memoria. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "transformación" debe usarse en un sentido amplio para hacer referencia a la introducción de ADN en una célula huésped receptora que cambia el genotipo y consecuentemente da lugar a un cambio en la célula receptora.

"Células huésped" se refiere a células que han sido transformadas con un vector lentiviral descrito en la presente memoria. Las células huésped de la presente descripción tienen preferiblemente un origen de mamíferos; lo más preferiblemente origen humano o de ratón. Los expertos en la técnica poseen la capacidad de determinar preferentemente las líneas de células huésped particulares que son más adecuadas para su propósito. Las líneas de células huésped ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, CHO, DG44 y DUXB11 (líneas de Ovario de Hámster Chino, DHFR menos), HELA (carcinoma de cuello uterino humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con el antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3.times.63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano), PER.C6[®], NS0, CAP, BHK21, y HEK 293 (riñón humano). En una realización particular, la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en: una célula CHO, una célula HEK293 (p. ej., una célula HEK293T), una célula BHK21, una célula PER.C6[®], una célula NS0, una célula CAP y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, las células huésped de la presente descripción tienen origen de insecto. En una realización particular, las células huésped son células SF9. Las líneas de células huésped están disponibles típicamente en servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection, o a partir de la bibliografía publicada.

La introducción de las moléculas de ácido nucleico o vectores de la descripción en la célula huésped puede conseguirse por diversas técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero no están

limitadas a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN recubierto, microinyección, e infección con virus intacto. Véase, Ridgway, A. A. G. "*Mammalian Expression Vectors*" Capítulo 24.2, p. 470-472 Vectors, Rodriguez y Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Lo más
 5 preferiblemente, la introducción de plásmidos en el huésped es mediante electroporación. Las células transformadas se crecen en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se ensayan para determinar la síntesis de proteínas de la cadena pesada y/o
 10 ligera. Las técnicas de ensayo ejemplares incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o análisis de separación celular activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Las células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico
 15 aisladas o los vectores lentivirales de la descripción se crecen en un medio de crecimiento apropiado. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "medio de crecimiento apropiado" significa un medio que contiene los nutrientes requeridos para el crecimiento de las células. Los nutrientes requeridos para el crecimiento de las células pueden incluir una fuente de
 20 carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales, y factores de crecimiento. Opcionalmente, el medio puede contener uno o más factores de selección. Opcionalmente, el medio puede contener suero de ternera bovino o suero de ternera fetal (FCS). En una realización, el medio no contiene sustancialmente IgG. El medio de
 25 crecimiento seleccionará generalmente las células que contienen la construcción de ADN, por ejemplo, por selección con fármacos o deficiencia de un nutriente esencial que se complementa por el marcador seleccionable en la construcción de ADN o se contranfecta con la construcción de ADN. Las células de mamífero cultivadas se crecen generalmente en medios que
 30 contienen suero o libres de suero disponibles comercialmente (p. ej., MEM, DMEM, DMEM/F12). En una realización, el medio es CDoptiCHO

(Invitrogen, Carlsbad, CA.). En otra realización, el medio es CD17 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). La selección de un medio apropiado para la línea celular particular usada está dentro del nivel de los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la célula huésped se modifica además
 5 como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, la célula huésped puede modificarse para sobreexpresar CD47, como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula huésped se modifica para carecer de MHC-I expuesto en la superficie. En algunas realizaciones, la célula huésped se modifica para tener MHC-I expuesto en la superficie
 10 disminuido, en relación a una célula huésped no modificada. En determinadas realizaciones, la célula huésped es una célula HEK 293T CD47^{alta}/MHC-I^{bajo}.

Determinados aspectos de la descripción están dirigidos a métodos para producir un vector lentiviral que comprenden cultivar una célula
 15 huésped descrita en la presente memoria en condiciones adecuadas y aislar el vector lentiviral. En determinados aspectos, la descripción está dirigida a métodos para producir un vector lentiviral descrito en la presente memoria, que comprenden cultivar una célula huésped descrita en la presente memoria en condiciones adecuadas y aislar el vector lentiviral.

20 Todos los diversos aspectos, realizaciones, y opciones descritas en la presente memoria pueden combinarse en cualquiera y todas las variaciones.

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente memoria por referencia en el mismo grado que si se indicará que cada
 25 publicación, patente, o solicitud de patente individual estuviera específicamente e individualmente incorporada por referencia.

Habiendo descrito generalmente esta descripción, puede obtenerse una comprensión adicional por referencia a los ejemplos proporcionados en la presente memoria. Estos ejemplos solo son para propósitos de ilustración

y no se pretende que sean limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expresión de FIX a largo plazo mediada por LV-coFIX-1-R338L y respuesta a la dosis en ratones HemB adultos

5 Una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica una variante de FIX humano que tiene una sustitución R338L ("Padua") (coFIX-1-R338L; SEQ ID NO: 1) se clonó en un vector lentiviral para crear LV-coFIX-1-R338L (FIG. 1). Para determinar el perfil de respuesta a la dosis de LV-FIX en modelos animales, se evaluó el LV-coFIX-1-R338L generado
10 en células 293T en ratones HemB adultos. Se trataron ratones HemB de ocho semanas de edad con LV-coFIX-1-R338L mediante inyección en la vena de la cola a una dosis de 3E9, 7,5E9, 2E10, o 6E10 TU/kg (n=2 a 10 animales/nivel de dosis). La actividad de FIX plasmática mediada por LV-FIX y el nivel de antígeno se monitorizaron por ensayo cromogénico y ELISA de
15 FIX. El nivel plasmático de FIX en estado estacionario de cada animal se muestra en la FIG. 2A, y la curva de respuesta a la dosis de LV-coFIX-1-R338L se muestra en la FIG. 2B. En un modelo de ratones HemB, LV-coFIX-1-R338L ha demostrado un perfil de respuesta a la dosis Log-Log, y se determinó que el nivel de dosis de LV-coFIX-1-R338L requerido para
20 conseguir un 10-200% de la actividad de FIX circulante normal estaba entre un rango de 5E9 a 2E10 TU/kg en los ratones HemB.

El perfil de expresión de FIX a largo plazo de los animales tratados con LV-coFIX-1-R338L en los grupos con los 3 niveles de dosis mayores se monitorizó durante 6 meses después del tratamiento con LV. La actividad de
25 FIX circulante (FIG. 3A) y los niveles de antígeno (FIG. 3B) se representaron gráficamente. Se observó un nivel consistente de expresión de FIX mediada por LV en todos los animales experimentales, no se detectó una pérdida en la expresión de FIX a lo largo de la duración del estudio, lo que demostró la estabilidad a largo plazo del tratamiento de terapia génica de integración.
30 Además, se observó un menor porcentaje de nivel de antígeno FIX normal

(FIG. 3A) en comparación con el de la actividad de FIX (FIG. 3B), lo que refleja el uso de la mutación de ganancia de función R338L en el transgén de FIX.

Ejemplo 2: LV-coFIX-1-R338L tiene una eficiencia de transducción similar en animales adultos y neonatales

El vector lentiviral puede integrarse en el genoma del huésped para mediar una expresión del transgén duradera, de manera que, a diferencia de la pérdida rápida de la expresión de transgenes mediada por AVV en el tratamiento post neonatal, la expresión de transgenes mediada por lentivirales se espera que mantenga un perfil de expresión de los transgenes persistente, no solo en animales adultos, sino también en animales neonatales tratados con LV-FIX. Para evaluar la eficiencia de la transducción y el perfil de expresión del transgén del tratamiento post neonatal con FIX lentiviral, se trataron crías de HemB de dos días de edad con LV-coFIX-1-R338L a través de una inyección en la vena temporal a 7,5E9, 2E10 y 6E10 TU/kg. En comparación con el tratamiento en el estadio adulto (administrado a las 8-semanas), el LV-coFIX-1-R338L administrado sistémicamente medió un nivel de expresión de FIX similar persistente, a lo largo del periodo de estudio de seis meses en cada nivel de dosis, lo que sugiere que la administración de FIX lentiviral podría tratar de manera efectiva tanto a pacientes adultos como pediátricos. También se evaluó el tratamiento de ratones adolescentes (administrado a las dos semanas) con LV-coFIX-1-R338L a través de una inyección en la vena temporal a una dosis de 3E9, 7,5E9, o 2E10 TU/kg. Los niveles de expresión de FIX en cada nivel de dosis fueron mayores que las dosis comparables en los ratones a los que se administró el tratamiento a las 8 semanas o dos días (n=6 animales/nivel de dosis/edad; FIG. 4A).

La actividad de FIX se midió para determinar la respuesta a la dosis de LV-coFIX-1-R338L en ratones HemB a los que se administró a las 8 semanas y dos días a través de una inyección en la vena temporal a una

dosis de 7,5E9, 2E10, y 6E10 TU/kg, y dos semanas a una dosis de 3E9, 7,5E9, o 2E10 TU/kg. Consistente con los datos a largo plazo en la FIG. 4A, los ratones a los que se administró el tratamiento a las dos semanas (ratones adolescentes) presentaron una mayor actividad de FIX en
 5 comparación con ratones a los que se administró el tratamiento a los dos días u ocho semanas (FIG. 4B).

Ejemplo 3: Evaluación de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L en primates no humanos

Se generó una línea celular HEK293T que sobreexpresaba CD47
 10 humana para modular las propiedades inmunes de los vectores lentivirales. Las partículas de vector lentiviral con un nivel alto en la superficie de CD47 humana habían mostrado una menor captación de células Kupffer y una mayor transducción de hepatocitos en ratones NOD (los ratones NOD pueden reconocer la CD47 humana). Además, los macrófagos captaron
 15 menos partículas de vector lentiviral que tenían una alta expresión en la superficie de CD47 humana, en relación a vectores lentivirales control que no sobreexpresaban CD47 (FIG. 5).

Para evaluar adicionalmente el efecto del alto nivel en superficie de CD47 humana en la transducción de hígado *in vivo*, se comparó CD47^{alta}
 20 LV-coFIX-1-R338L con LV-coFIX-1-R338L en primates no humanos (NHP) después de la administración intravenosa a una dosis de 7,5E9 TU/kg, n=3/grupo de tratamiento. Se usaron monos *Macaca nemestrina* para evitar la restricción del vector lentiviral en NHP después del tratamiento.

El nivel circulante de FIX humano después del tratamiento con el
 25 vector lentiviral se midió por la actividad específica de FIX humano (FIG. 6A) y ensayo de antígeno (FIG. 6B). CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L confiere una expresión de FIX humano tres veces mayor después del tratamiento con vector lentiviral en comparación con LV-coFIX-1-R338L, a un 200-300% y 50-150% del nivel normal de actividad de FIX, respectivamente (FIG. 6A). El
 30 uso de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L podría disminuir potencialmente LV-FIX y

reducir la toxicidad aguda asociada con el tratamiento con vector lentiviral.

Además de los niveles de expresión de FIX humano, también se monitorizó la hemostasis de los animales tratados por el ensayo APTT (FIG. 6C). Aunque el tiempo de APTT de los animales tratados con vehículo permaneció en el mismo rango, se observó un tiempo de APTT significativamente acortado para todos los animales tratados con LV-FIX (FIG. 6C), lo que indica que la proteína FIX humana resultante del tratamiento con vector lentiviral es funcionalmente activa.

Ejemplo 4: Respuesta a la dosis de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L en primates no humanos

Para determinar el perfil de respuesta a la dosis de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L en NHP, se ensayaron dos dosis menores de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L a 1,5E9 y 3E9 TU/kg (n=3/nivel de dosis). La expresión de FIX humano mediada por el vector lentiviral se monitorizó analizando la actividad específica de FIX humano circulante en estado estacionario (FIG. 7A) y el nivel de antígeno (FIG. 7B).

Consistente con los resultados observados en ratones HemB, también se observó una curva de respuesta a la dosis log/log para LV-coFIX-1-R338L en los NHP. El rango de dosis de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L requerido para conseguir un 10-100% del nivel circulante normal de FIX es entre 3,5-6E9 TU/kg que es menor que el de los ratones HemB. El desplazamiento en el rango de dosis terapéutico se debe al nivel de expresión de FIX humano 5 a 10 veces mayor en los NHP en comparación con los ratones HemB al mismo nivel de dosis, que podría atribuirse a la variación de la especie animal y al reconocimiento de CD47 humana (la CD47 humana no es reconocida en los ratones HemB).

Los animales a los que se administró LV-coFIX-1-R338L presentaron respuestas inmunes agudas muy suaves, como se indica por los niveles de

ALT (FIG. 8A), niveles de AST (FIG. 8B), niveles de linfo (FIG. 8C) y temperatura corporal (FIG. 8D) después de la administración. Se observó una respuesta de citoquinas disminuida después de la administración de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L en relación al vector LV control (FIG. 9A-9C).

5 Mientras se observaron incrementos suaves en MIP-1a, MIP-1b, y MCP-1 después de la administración de LV control, la expresión de MIP-1a, MIP-1b, y MCP-1 fue menor y, en algunos casos indetectable, después de la administración de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L. Como se esperaba, el LV-coFIX-1-R338L se localizó principalmente en el hígado y bazo, que tienen un
10 número de copias del vector (VCN) en el hígado y bazo que fue mayor de 100 veces mayor que en otros órganos (FIG. 10). Estos datos sugieren que CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L induce una respuesta inmune aloespecífica reducida, con resistencia incrementada a la fagocitosis y transferencia génica en hepatocitos mejorada.

15 **Ejemplo 5: Ensayo adicional de la respuesta a la dosis de CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L en primates no humanos**

Un *Macaca nemestrina* adicional se trató con CD47^{alta} LV-coFIX-1-R338L a una dosis de 2,5E9 TU/kg mediante administración intravenosa. La expresión de FIX humano mediada por el vector lentiviral se monitorizó
20 analizando la actividad específica de FIX humano circulante em estado estacionario (FIG. 11A) y nivel de antígeno (FIG. 11B). Después del tratamiento con LV, la actividad de FIX humano circulante em estado estacionario es aproximadamente un 33% del normal y la cantidad de antígeno FIX humano circulante está a 700 ng/mL lo que se correlacionó con
25 un 14% de nivel de antígeno FIX normal.

La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará completamente la naturaleza general de la descripción que otros pueden, aplicando el conocimiento de la experiencia en la técnica, modificar y/o
30 adaptar fácilmente dichas realizaciones específicas para diversas

aplicaciones, sin experimentación innecesaria, sin apartarse del concepto general de la presente descripción. Por lo tanto, se pretende que dichas adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado y rango de equivalentes de las realizaciones descritas, sobre la base de la enseñanza y

5 directrices presentadas en la presente memoria. Debe entenderse que la fraseología o terminología de la presente memoria es para el propósito de descripción y no de limitación, de manera que la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva debe interpretarse por el experto en la técnica a la vista de las enseñanzas y directrices.

10 Otras realizaciones de la descripción serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la descripción descrita en la presente memoria. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo como ejemplares, indicándose un alcance y espíritu verdaderos de la descripción

15 por las siguientes reivindicaciones.

Todas las patentes y publicaciones citadas en la presente memoria se incorporan por referencia en la presente memoria en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto una dosis efectiva de un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de factor IX (FIX), en donde el vector lentiviral se empaqueta en células HEK293T que sobreexpresan CD47 que comprenden un nivel mayor de expresión de la proteína CD47 en la superficie que un vector lentiviral control producido en células HEK293T no modificadas (ATCC® CRL-11268™), y en donde la dosis efectiva se reduce en relación a una dosis control del vector lentiviral control necesaria para inducir la misma actividad de FIX que el vector lentiviral.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el vector lentiviral control comprende 19 moléculas/ μm^2 de CD47 en la superficie del vector lentiviral control.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el vector lentiviral comprende al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2,0 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3,0 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4,0 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5,0 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6,0 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7,0 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8,0 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9,0 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente

40 veces más de proteína CD47 en la superficie del vector lentiviral que el vector lentiviral control producido en células HEK293T (ATCC® CRL-11268™).

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en
 5 donde la dosis efectiva es menos de aproximadamente 5×10^{10} unidades de transducción/kg (TU/kg), menos de 4×10^{10} TU/kg, menos de 3×10^{10} TU/kg, menos de 2×10^{10} TU/kg, menos de 1×10^{10} TU/kg, menos de 9×10^9 TU/kg, menos de 8×10^9 TU/kg, menos de 7×10^9 TU/kg, menos de 6×10^9 TU/kg, menos de 5×10^9 TU/kg, menos de 4×10^9 TU/kg, menos de 3×10^9 TU/kg,
 10 menos de 2×10^9 TU/kg menos de 1×10^9 TU/kg, menos de aproximadamente 9×10^8 TU/kg, o menos de aproximadamente 8×10^8 TU/kg.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el sujeto presenta uno o más de las siguientes propiedades después de la administración:

15 (a) una transducción disminuida de macrófagos del vector lentiviral en relación al vector lentiviral control;

(b) una respuesta inmune aloespecífica reducida frente al vector lentiviral en relación al vector lentiviral control;

(c) una actividad de FIX de al menos un 30%, en relación a la
 20 actividad de FIX normal al menos 3 semanas después de la administración;

(d) una expresión específica de tejido del vector lentiviral en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo; y

(e) cualquier combinación de (a)-(d).

6. El método de la reivindicación 5, en donde la respuesta inmune
 25 aloespecífica comprende la liberación de una citoquina en respuesta al vector lentiviral.

7. El método de la reivindicación 6, en donde la citoquina se selecciona del grupo que consiste en MIP-1a, MIP-1b, MCP-1, y cualquier

combinación de las mismas.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MIP-1a después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de MIP-1a después de la administración del vector lentiviral control.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MIP-1b después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de MIP-1b después de la administración del vector lentiviral control.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el sujeto presenta un nivel menos de expresión de MCP-1 después de la administración del vector lentiviral en relación a la expresión de MCP-1 después de la administración del vector lentiviral control.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el sujeto presenta una actividad de FIX de al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 100%, al menos aproximadamente un 125%, al menos aproximadamente un 150%, al menos aproximadamente un 175%, al menos aproximadamente un 200%, al menos aproximadamente un 225%, al menos aproximadamente un 250%, al menos aproximadamente un 275%, o al menos aproximadamente un 300%, en relación a la actividad de FIX normal, al menos tres semanas después de la administración del vector lentiviral.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el sujeto presenta una actividad de FIX de al menos aproximadamente un 150%, en relación a la actividad de FIX normal, al menos tres semanas después de la administración del vector lentiviral.

13. El método de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la actividad de FIX plasmática a las 24 horas a 48 horas después de la administración del vector lentiviral se incrementa en relación a un sujeto al que se le

administra la dosis control del vector lentiviral control.

14. El método de la reivindicación 13, en donde la actividad de FIX plasmática se incrementa después de la administración en al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos
5 aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos
10 aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos
15 aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente
20 170 veces, al menos aproximadamente 180 veces, al menos aproximadamente 190 veces, o al menos aproximadamente 200 veces, en relación a un sujeto al que se le administra la dosis control del vector lentiviral control.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en
25 donde el sujeto presenta una localización incrementada del vector lentiviral en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto.

16. El método de la reivindicación 15, en donde la localización
30 incrementada se caracteriza por un número de copias del vector (VCN) del

vector lentiviral que es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos
5 aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente 14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos
10 aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces,
15 al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces, al menos aproximadamente 180 veces, al menos aproximadamente 190 veces, o al menos aproximadamente 200 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el
20 hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto.

17. El método de la reivindicación 15 o 16, en donde la localización incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que es al menos 10 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el hígado como el bazo
25 después de la administración del vector lentiviral, en relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en donde la localización incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que es al menos 50 veces mayor en el hígado, bazo, o tanto en el
30 hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en

relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde la localización incrementada se caracteriza por un VCN del vector lentiviral que es al menos 100 veces mayor en el hígado, bazo o tanto en el hígado como el bazo después de la administración del vector lentiviral, en
5 relación a un órgano distinto del hígado y el bazo en el sujeto.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la CD47 es una CD47 humana.

21. El método de la reivindicación 20, en donde la CD47 humana
10 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos un 97%, al menos aproximadamente un
15 98%, al menos un 99%, o aproximadamente un 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 14.

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde el vector lentiviral no comprende un polipéptido MHC-I.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en
20 donde el vector lentiviral se produce en una célula huésped que expresa una alta concentración de la CD47 en comparación con las células HEK293T (ATCC® CRL-11268™).

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos aproximadamente un
25 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de

identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7.

25. Un método para prevenir o tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita que comprende administrar al sujeto menos de 5×10^{10} unidades de transducción/kg (TU/kg) de un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de factor IX (FIX), en donde el vector lentiviral comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7.

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en

donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

30. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en
5 donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en
10 donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6.

32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en
15 donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 139-1386 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

33. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en
donde la dosis es aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, aproximadamente
4,5 $\times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 4×10^{10} TU/kg, aproximadamente 3,5 $\times 10^{10}$
TU/kg, aproximadamente 3×10^{10} TU/kg, aproximadamente 2,5 $\times 10^{10}$ TU/kg,
20 aproximadamente 2×10^{10} TU/kg, aproximadamente 1,5 $\times 10^{10}$ TU/kg,
aproximadamente 1×10^{10} TU/kg, aproximadamente 9,5 $\times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 9×10^9 TU/kg, aproximadamente 8,5 $\times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 8×10^9 TU/kg, aproximadamente 7,5 $\times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 7×10^9 TU/kg, aproximadamente 6,5 $\times 10^9$ TU/kg,
25 aproximadamente 6×10^9 TU/kg, aproximadamente 5,5 $\times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 5×10^9 TU/kg, aproximadamente 4,5 $\times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 4×10^9 TU/kg, aproximadamente 3,5 $\times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 3×10^9 TU/kg, aproximadamente 2,5 $\times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 2×10^9 TU/kg, aproximadamente 1,5 $\times 10^9$ TU/kg,
30 aproximadamente 1×10^9 TU/kg, aproximadamente 9,5 $\times 10^8$ TU/kg,

- aproximadamente 9×10^8 TU/kg, aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 8×10^8 TU/kg, aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 7×10^8 TU/kg, aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 6×10^8 TU/kg, aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 5×10^8 TU/kg, aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 4×10^8 TU/kg, aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 3×10^8 TU/kg, aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, aproximadamente 2×10^8 TU/kg, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg, o aproximadamente 1×10^8 TU/kg.
34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en donde la dosis es menos de 5×10^{10} TU/kg, menos de $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 4×10^{10} TU/kg, menos de $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 3×10^{10} TU/kg, menos de $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 2×10^{10} TU/kg, menos de $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 1×10^{10} TU/kg, menos de $9,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 9×10^9 TU/kg, menos de $8,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 8×10^9 TU/kg, menos de $7,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 7×10^9 TU/kg, menos de $6,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 6×10^9 TU/kg, menos de $5,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 5×10^9 TU/kg, menos de $4,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 4×10^9 TU/kg, menos de $3,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 3×10^9 TU/kg, menos de $2,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 2×10^9 TU/kg, menos de $1,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 1×10^9 TU/kg, menos de aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 9×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 8×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 7×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 6×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 5×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 4×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 3×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 2×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg, o menos de aproximadamente 1×10^8 TU/kg.

35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en donde la dosis es entre 1×10^8 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^8 y 5×10^9 TU/kg, entre 1×10^8 y 1×10^9 TU/kg, entre 1×10^8 y 1×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 2×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 3×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 4×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 5×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 2×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 3×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 4×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 5×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 6×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 7×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 8×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 9×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $1,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg, entre 2×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $2,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg, entre 3×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $3,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg, entre 4×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, o entre $4,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg.

36. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en donde la dosis es entre 1×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 4×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 3×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 2×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y 9×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 8×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 7×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 5×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 4×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 3×10^9 TU/kg, y entre 1×10^9 y 2×10^9 TU/kg.

37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en donde la dosis es entre 1×10^{10} y 2×10^{10} TU/kg, entre $1,1 \times 10^{10}$ y $1,9 \times 10^{10}$ TU/kg, entre $1,2 \times 10^{10}$ y $1,8 \times 10^{10}$ TU/kg, entre $1,3 \times 10^{10}$ y $1,7 \times 10^{10}$ TU/kg, o entre $1,4 \times 10^{10}$ y $1,6 \times 10^{10}$ TU/kg.

38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, en donde la dosis es aproximadamente 4×10^9 TU/kg a aproximadamente 6×10^9 TU/kg.

39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, en donde el vector lentiviral se administra como una dosis única o dosis múltiples.

40. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 39, en donde el vector lentiviral se administra mediante inyección intravenosa.

41. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en donde el sujeto es un sujeto pediátrico.

5 42. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en donde el sujeto es un sujeto adulto.

43. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en donde el sujeto es un sujeto adolescente.

44. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, en
10 donde el polipéptido con actividad de FIX comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12.

45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 44, en donde el polipéptido con actividad de FIX comprende la secuencia de
15 aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12.

46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 45, en donde el vector lentiviral comprende un promotor específico de tejido.

47. El método de la reivindicación 46, en donde el promotor específico de tejido aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con
20 actividad de FIX en una célula hepática diana.

48. El método de la reivindicación 47, en donde el promotor específico de tejido que aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana comprende un promotor de APOA2, promotor de SERPINA1 (hAAT), promotor de mTTR, promotor
25 de MIR122, o cualquier combinación de los mismos.

49. El método de la reivindicación 47 o 48, en donde la célula hepática diana es un hepatocito.

50. El método de la reivindicación 49, en donde la molécula de ácido nucleico aislada se integra de manera estable en el genoma del hepatocito.

51. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50, en
5 donde el vector lentiviral comprende un sitio donante de corte y empalme.

52. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51, en donde el vector lentiviral comprende un sitio aceptor de corte y empalme.

53. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 52, en donde el vector lentiviral comprende una secuencia gag, una secuencia pol,
10 una secuencia rev, un elemento de respuesta rev (RRE), o cualquier combinación de los mismos.

54. El método de la reivindicación 53, en donde la secuencia gag es una secuencia gag de longitud completa o truncada.

55. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 54, en
15 donde el vector lentiviral comprende un potenciador, una secuencia diana para un microARN, un elemento regulador postranscripcional, una señal de empaquetamiento, una secuencia poli-A, una secuencia intrónica, o cualquier combinación de los mismos.

56. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, en
20 donde la dosis del vector lentiviral se administra en una vez o dividida en al menos dos subdosis.

57. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55, en donde la dosis del vector lentiviral se repite al menos dos veces.

58. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 57, en
25 donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal.

59. El método de la reivindicación 58, en donde la secuencia de

ácido nucleico que codifica un péptido señal tiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia con:

- 5 (i) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 2;
- (ii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 3;
- (iii) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 4;
- (iv) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 5;
- (v) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 6; o
- 10 (vi) los nucleótidos 1-84 de la SEQ ID NO: 7.

60. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 59, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido.

- 15 61. El método de la reivindicación 60, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica un propéptido tiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, o un 100% de identidad de secuencia con:

- 20 (i) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 2;
- (ii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 3;
- (iii) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 4;
- (iv) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 5;
- (v) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 6; o
- 25 (vi) los nucleótidos 85-138 de la SEQ ID NO: 7.

62. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 61, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad de FIX comprende además una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una secuencia de aminoácidos heteróloga.

- 30 63. El método de la reivindicación 62, en donde la secuencia de

aminoácidos heteróloga es una albúmina, una región Fc de inmunoglobulina, una secuencia XTEN, el péptido C-terminal (CTP) de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana, una secuencia PAS, una secuencia HAP, una secuencia de péptido CTP, una transferrina, un resto de unión a
 5 albúmina, o cualesquiera fragmentos, derivados, variantes, o combinaciones de estos polipéptidos.

64. El método de la reivindicación 62 o 63, en donde la secuencia de aminoácidos heteróloga está unida al extremo N o al extremo C de la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que
 10 codifica un polipéptido con actividad de FIX o insertada entre dos aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

65. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 62 a 64, en donde el resto heterólogo se inserta en el polipéptido con actividad de FIX inmediatamente aguas abajo de un aminoácido correspondiente al
 15 aminoácido 103 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 105 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 142 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 149 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 162 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 166 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 174 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 224 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 226 de la SEQ ID NO: 2, aminoácido 228 de la SEQ ID NO: 2,
 20 aminoácido 413 de la SEQ ID NO: 2, o cualquier combinación de los mismos.

66. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 65, en donde el polipéptido FIX es una variante R338L del polipéptido FIX.

67. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 66, en
 25 donde el vector lentiviral se produce en una célula huésped.

68. El método de la reivindicación 67, en donde la célula huésped expresa CD47.

69. El método de la reivindicación 68, en donde la célula huésped se modifica para sobreexpresar CD47.

70. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 67 a 69, en donde la célula huésped no expresa MHC-I.

71. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 67 a 70, en donde la célula huésped es CD47^{alta}/MHC-I⁻.

5 72. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 69 a 71, en donde la célula huésped es una célula HEK 293T CD47^{alta}/MHC-I⁻.

73. Un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende (i) un promotor específico de tejido, y (ii) una secuencia de ácido nucleico como se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde
10 el promotor específico de tejido dirige la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula hepática.

74. Un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende (i) un sitio donante de corte y empalme; (ii) un sitio aceptor de corte y empalme; (iii) una secuencia gag; (iv) un elemento de
15 respuesta Rev; (v) un potenciador; (vi) un elemento regulador postranscripcional, (vii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos
20 aproximadamente un 96%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un 98%, al menos aproximadamente un 99%, o aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 7, y (viii) una
25 secuencia diana para un microARN.

75. El vector lentiviral de la reivindicación 73 o 74, en donde la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido con actividad de FIX, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la

SEQ ID NO: 12.

76. El vector lentiviral de la reivindicación 75, en donde el polipéptido con actividad de FIX comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 12.

5 77. Un vector lentiviral de una cualquiera de las reivindicaciones 74 a 76, en donde la superficie del vector lentiviral comprende un nivel mayor de proteína CD47 que un vector lentiviral control producido en células HEK293T (ATCC® CRL-11268™).

78. El vector lentiviral de la reivindicación 77, en donde la
10 superficie del vector lentiviral no comprende MHC-I.

79. Un método para tratar la hemofilia en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis efectiva del vector lentiviral de una cualquiera de las reivindicaciones 73 a 78.

80. El método de la reivindicación 79, en donde la dosis efectiva es
15 menos de aproximadamente 5×10^{10} unidades de transducción/kg (TU/kg), menos de 4×10^{10} TU/kg, menos de 3×10^{10} TU/kg, menos de 2×10^{10} TU/kg, menos de 1×10^{10} TU/kg, menos de 9×10^9 TU/kg, menos de 8×10^9 TU/kg, menos de 7×10^9 TU/kg, menos de 6×10^9 TU/kg, menos de 5×10^9 TU/kg, menos de 4×10^9 TU/kg, menos de 3×10^9 TU/kg, menos de 2×10^9 TU/kg,
20 menos de 1×10^9 TU/kg, menos de aproximadamente 9×10^8 TU/kg, o menos de aproximadamente 8×10^8 TU/kg.

81. El método de la reivindicación 79 u 80, en donde la dosis efectiva es aproximadamente 5×10^{10} TU/kg, aproximadamente $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 4×10^{10} TU/kg, aproximadamente $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg,
25 aproximadamente 3×10^{10} TU/kg, aproximadamente $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 2×10^{10} TU/kg, aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, aproximadamente 1×10^{10} TU/kg, aproximadamente $9,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 9×10^9 TU/kg, aproximadamente $8,5 \times 10^9$ TU/kg, aproximadamente 8×10^9 TU/kg, aproximadamente $7,5 \times 10^9$ TU/kg,

aproximadamente 7×10^9 TU/kg, aproximadamente $6,5 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 6×10^9 TU/kg, aproximadamente $5,5 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 5×10^9 TU/kg, aproximadamente $4,5 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 4×10^9 TU/kg, aproximadamente $3,5 \times 10^9$ TU/kg,
5 aproximadamente 3×10^9 TU/kg, aproximadamente $2,5 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 2×10^9 TU/kg, aproximadamente $1,5 \times 10^9$ TU/kg,
aproximadamente 1×10^9 TU/kg, aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente 9×10^8 TU/kg, aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente 8×10^8 TU/kg, aproximadamente $7,5 \times 10^8$ TU/kg,
10 aproximadamente 7×10^8 TU/kg, aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente 6×10^8 TU/kg, aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente 5×10^8 TU/kg, aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente 4×10^8 TU/kg, aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg,
aproximadamente 3×10^8 TU/kg, aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg,
15 aproximadamente 2×10^8 TU/kg, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg, o
aproximadamente 1×10^8 TU/kg.

82. El método de la reivindicación 79 u 80, en donde la dosis efectiva es menos de 5×10^{10} TU/kg, menos de $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 4×10^{10} TU/kg, menos de $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 3×10^{10} TU/kg, menos de
20 $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 2×10^{10} TU/kg, menos de $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, menos de 1×10^{10} TU/kg, menos de $9,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 9×10^9 TU/kg, menos de $8,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 8×10^9 TU/kg, menos de $7,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 7×10^9 TU/kg, menos de $6,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 6×10^9 TU/kg, menos de $5,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 5×10^9 TU/kg, menos de $4,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de
25 4×10^9 TU/kg, menos de $3,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 3×10^9 TU/kg, menos de $2,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 2×10^9 TU/kg, menos de $1,5 \times 10^9$ TU/kg, menos de 1×10^9 TU/kg, menos de aproximadamente $9,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 9×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $8,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 8×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente
30 $7,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 7×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $6,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 6×10^8 TU/kg,

menos de aproximadamente $5,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 5×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $4,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 4×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $3,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 3×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $2,5 \times 10^8$ TU/kg, menos de aproximadamente 2×10^8 TU/kg, menos de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ TU/kg, o menos de aproximadamente 1×10^8 TU/kg.

83. El método de la reivindicación 79 u 80, en donde la dosis efectiva es entre 1×10^8 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^8 y 5×10^9 TU/kg, entre 1×10^8 y 1×10^9 TU/kg, entre 1×10^8 y 1×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 2×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 3×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 4×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 5×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 2×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 3×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 4×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 5×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 6×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 7×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 8×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 9×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $1,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg, entre 2×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $2,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg, entre 3×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, entre $3,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg, entre 4×10^{10} y 5×10^{10} TU/kg, o entre $4,5 \times 10^{10}$ y 5×10^{10} TU/kg.

84. El método de la reivindicación 79 u 80, en donde la dosis efectiva es entre 1×10^9 y 5×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $4,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 4×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $3,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 3×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $2,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 2×10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y $1,5 \times 10^{10}$ TU/kg, entre 1×10^9 y 10^{10} TU/kg, entre 1×10^9 y 9×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 8×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 7×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 6×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 5×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 4×10^9 TU/kg, entre 1×10^9 y 3×10^9 TU/kg, y entre 1×10^9 y 2×10^9 TU/kg.

85. El método de la reivindicación 79 u 80, en donde la dosis efectiva es entre 1×10^{10} y 2×10^{10} TU/kg, entre $1,1 \times 10^{10}$ y $1,9 \times 10^{10}$ TU/kg, entre $1,2 \times 10^{10}$ y $1,8 \times 10^{10}$ TU/kg, entre $1,3 \times 10^{10}$ y $1,7 \times 10^{10}$ TU/kg, o entre $1,4 \times 10^{10}$ y $1,6 \times 10^{10}$ TU/kg.

86. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 85, en donde la dosis efectiva es aproximadamente 4×10^9 TU/kg a aproximadamente 6×10^9 TU/kg.

87. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 86,
5 en donde el vector lentiviral se administra como una dosis única o dosis múltiples.

88. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 87, en donde el vector lentiviral se administra mediante inyección intravenosa.

89. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 88,
10 en donde el sujeto es un sujeto pediátrico.

90. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79 a 88, en donde el sujeto es un sujeto adulto.

91. Una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

92. Un vector que comprende la secuencia de ácido nucleico de la
15 reivindicación 91.

93. El vector de la reivindicación 92, que comprende un promotor específico de tejido.

94. El vector de la reivindicación 93, en donde el promotor
20 específico de tejido aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana.

95. El vector de la reivindicación 94, en donde el promotor específico de tejido que aumenta selectivamente la expresión del polipéptido con actividad de FIX en una célula hepática diana comprende un promotor
25 de APOA2, promotor de SERPINA1 (hAAT), promotor de mTTR, promotor de MIR122, o cualquier combinación de los mismos.

96. El vector de la reivindicación 94 o 95, en donde la célula

hepática diana es un hepatocito.

97. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 94 a 96, que comprende un sitio donante de corte y empalme.

98. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 94 a 97,
5 que comprende un sitio aceptor de corte y empalme.

99. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 94 a 98, que comprende una secuencia gag, una secuencia pol, una secuencia rev, un elemento de respuesta rev (RRE), o cualquier combinación de los mismos.

100. El vector de la reivindicación 99, en donde la secuencia gag es una secuencia gag de longitud completa o truncada.

101. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 92 a 100, que comprende un potenciador, una secuencia diana para un microARN, un elemento regulador postranscripcional, una señal de empaquetamiento, una
15 secuencia poli-A, una secuencia intrónica, o cualquier combinación de los mismos.

102. Una célula que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 91 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 92 a 101.

103. La célula de la reivindicación 102, que es una célula de mamífero.

104. La célula de la reivindicación 102, que es una célula CHO, una célula HEK293, una célula BHK21, una célula PER.C6®, una célula NS0, y una célula CAP.

105. La célula de la reivindicación 102 o 103, en donde la célula es una célula humana.

106. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 102 a 105,

en donde la célula expresa una proteína CD47.

107. La célula de la reivindicación 106, en donde la célula se modifica para sobreexpresar CD47.

108. La célula de la reivindicación 107, en donde la célula
5 comprende al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos
aproximadamente 2,0 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al
menos aproximadamente 3,0 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces,
al menos aproximadamente 4,0 veces, al menos aproximadamente 4,5
veces, al menos aproximadamente 5,0 veces, al menos aproximadamente
10 5,5 veces, al menos aproximadamente 6,0 veces, al menos
aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7,0 veces, al
menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8,0 veces,
al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9,0
veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, al menos aproximadamente
15 10 veces, al menos aproximadamente 11 veces, al menos aproximadamente
12 veces, al menos aproximadamente 13 veces, al menos aproximadamente
14 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente
20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente
30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente
20 40 veces más de proteína CD47 en la superficie de la célula en comparación
con una célula control que no se modifica para sobreexpresar CD47.

109. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 106 a 108,
en donde la CD47 es una CD47 humana.

110. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 102 a 109,
25 en donde la célula no expresa MHC-I.

111. Un método para producir un vector lentiviral que comprende
cultivar la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 102 a 110 en
condiciones adecuadas.

RESUMEN

La presente descripción proporciona vectores lentivirales que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de factor IX (FIX), y métodos para usar dichos vectores lentivirales. Los vectores lentivirales dirigidos al hígado descritos en la presente memoria pueden usarse para terapia génica, en donde la administración génica lentiviral permite la integración estable del casete de expresión del transgén en el genoma de las células diana (p. ej., hepatocitos) de sujetos pediátricos (p. ej., neonatales) o adultos, consiguiendo una mejoría en la expresión de FIX a dosis bajas del vector lentiviral. La presente descripción también proporciona métodos para tratar trastornos hemorrágicos tales como la hemofilia (p. ej., hemofilia B) que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita un vector lentiviral dirigido al hígado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de secuencia de FIX a dosificaciones bajas.

FIG. 1

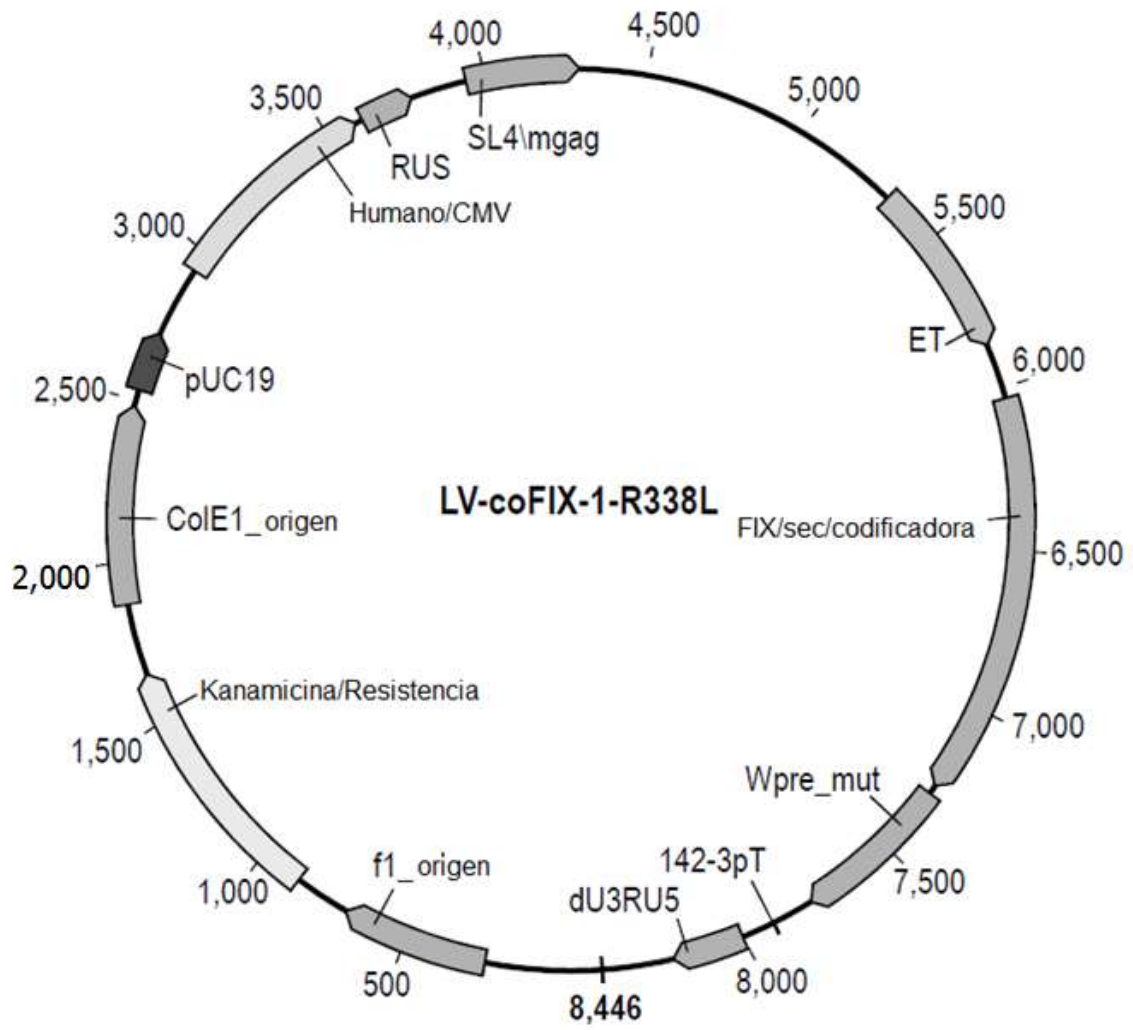


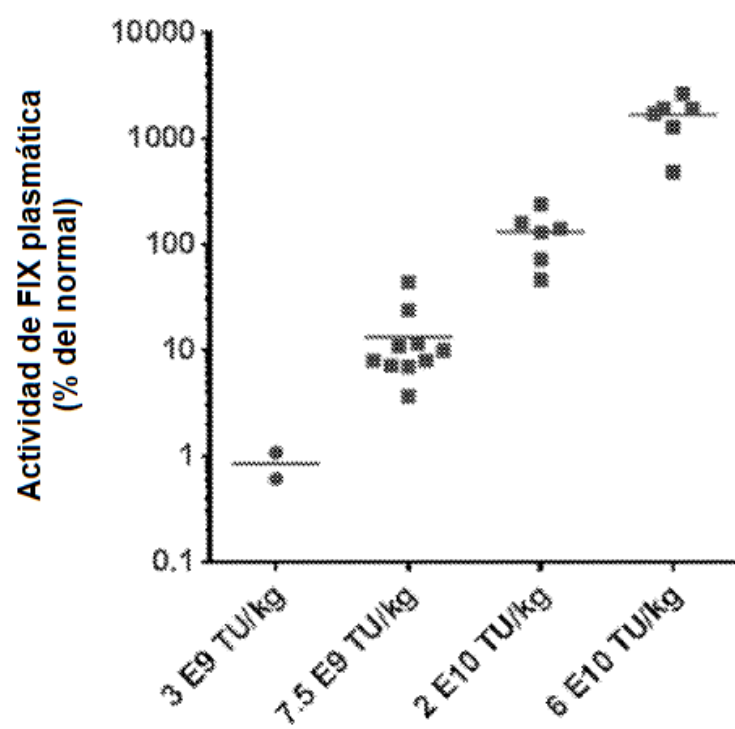
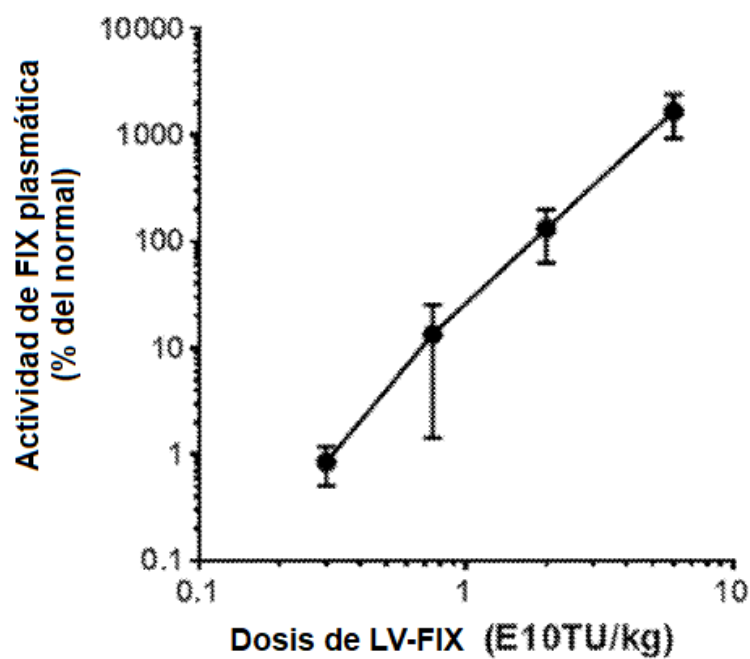
FIG. 2A**FIG. 2B**

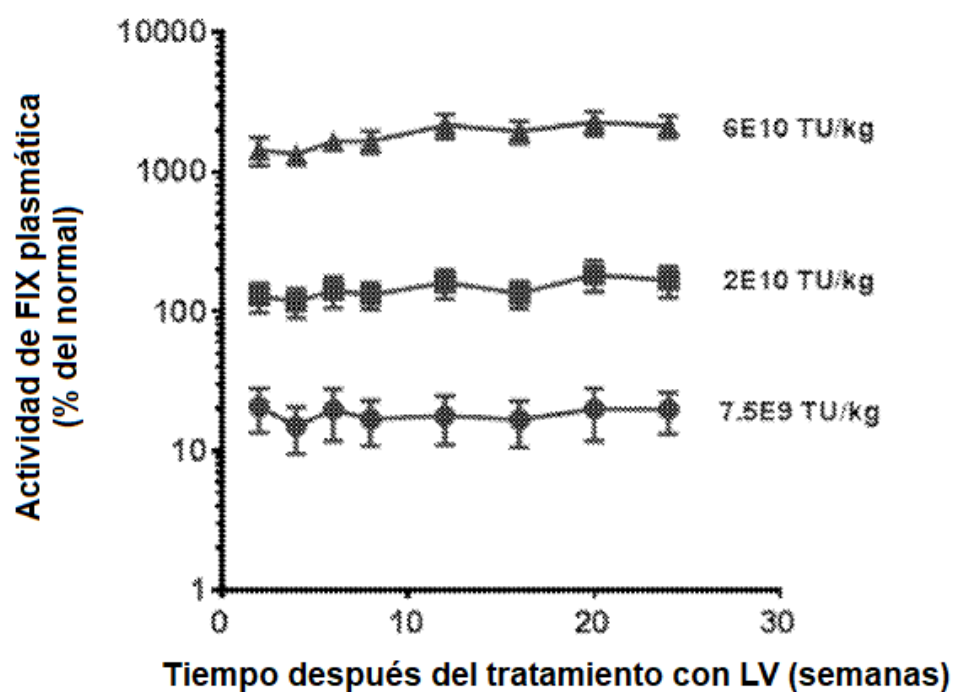
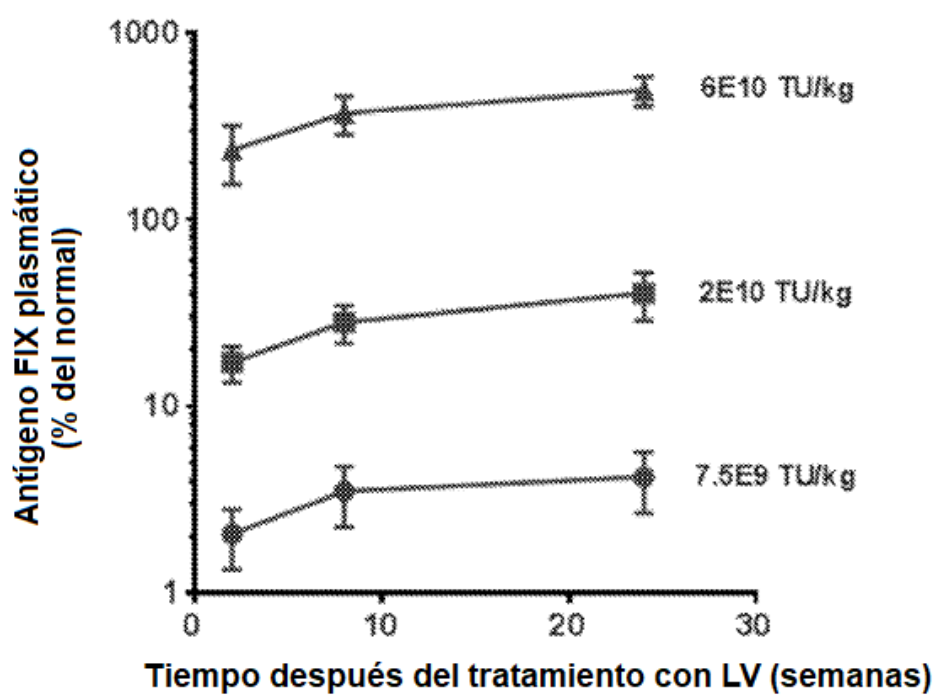
FIG. 3A**FIG. 3B**

FIG. 4A

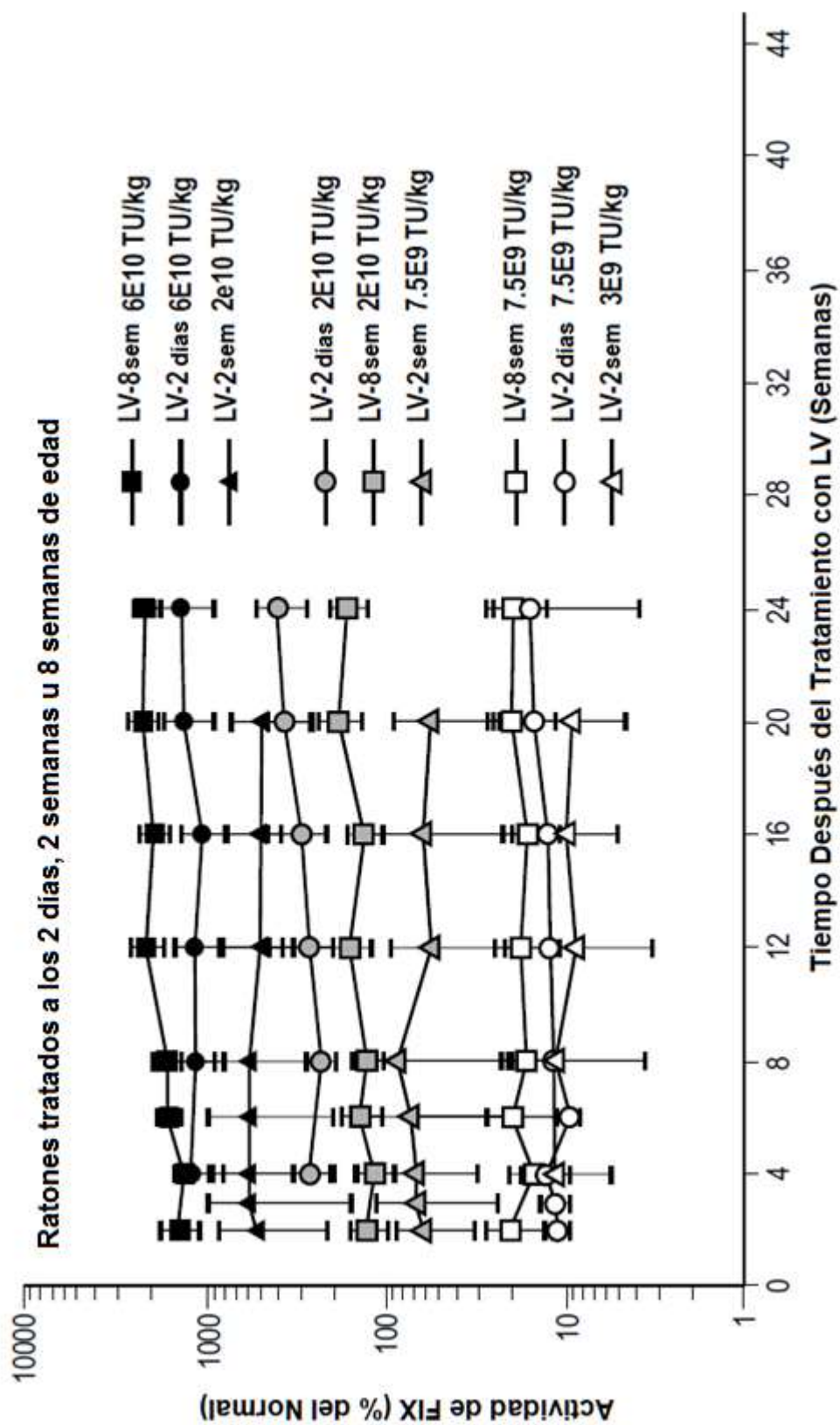


FIG. 4B

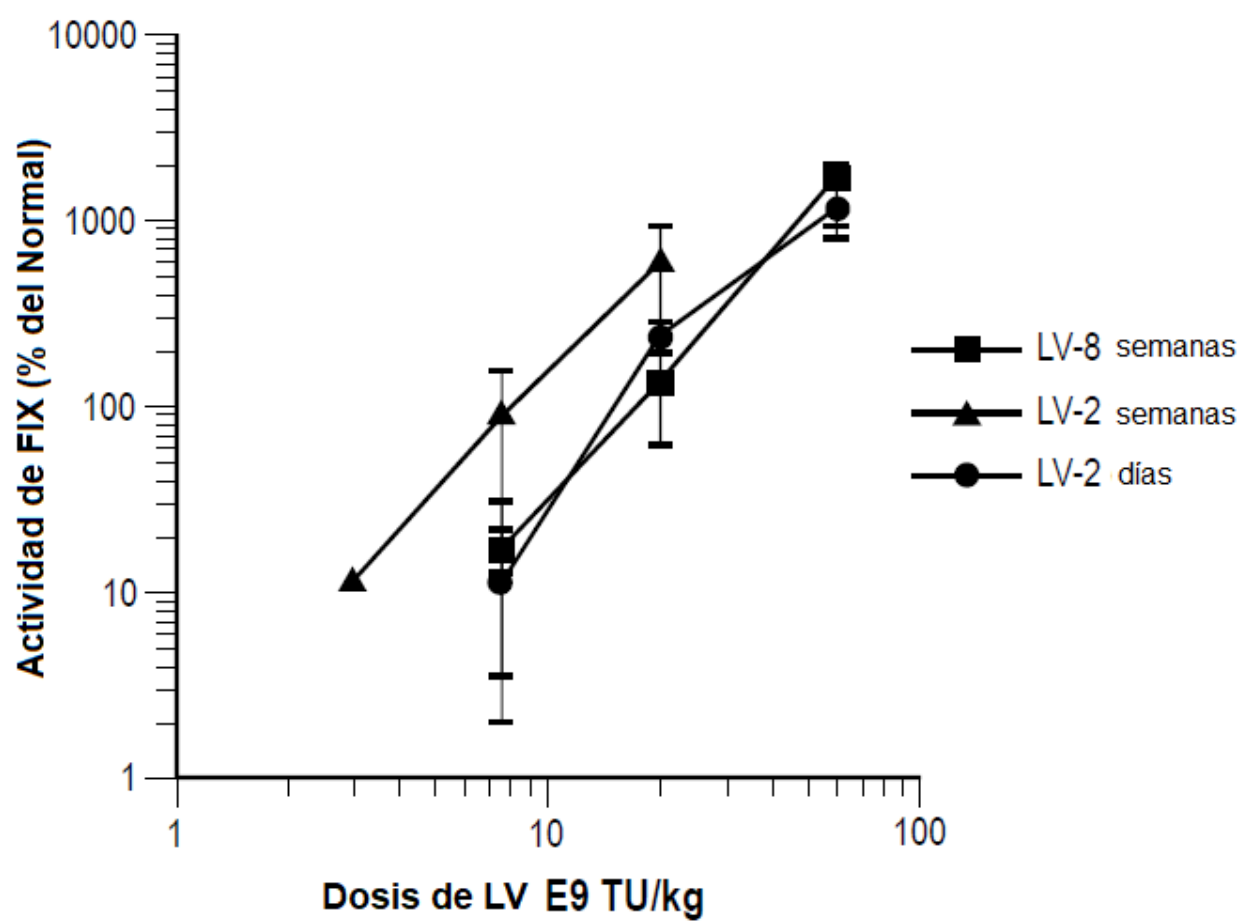
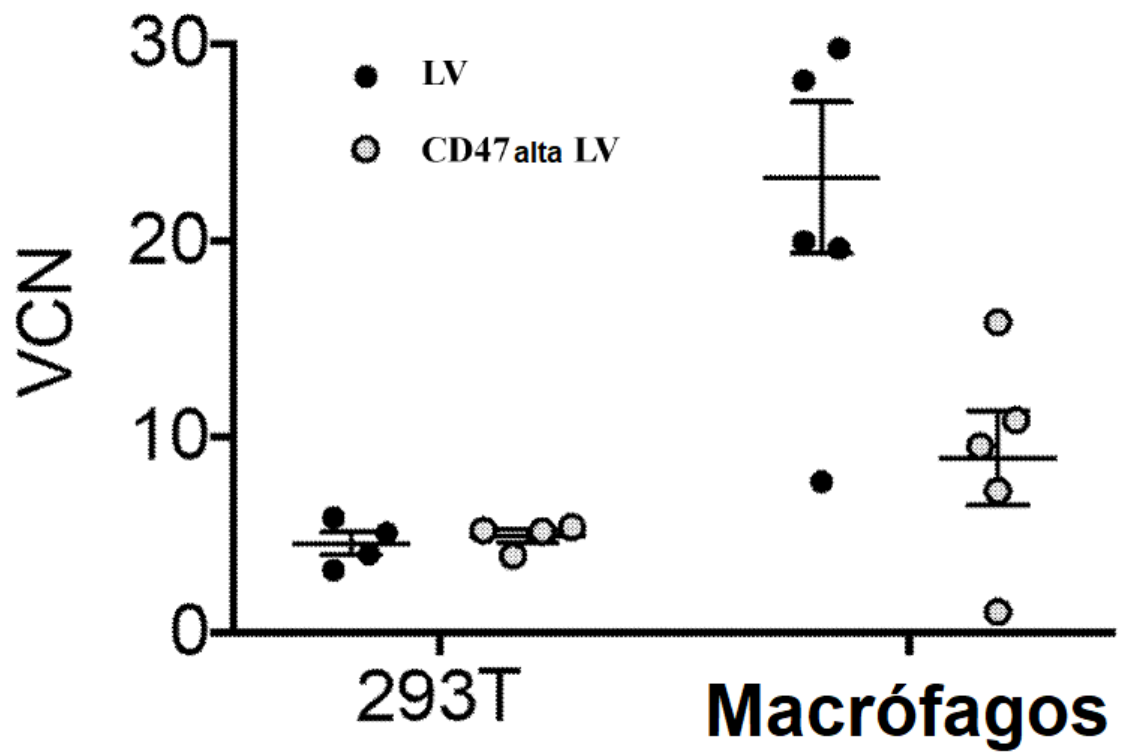
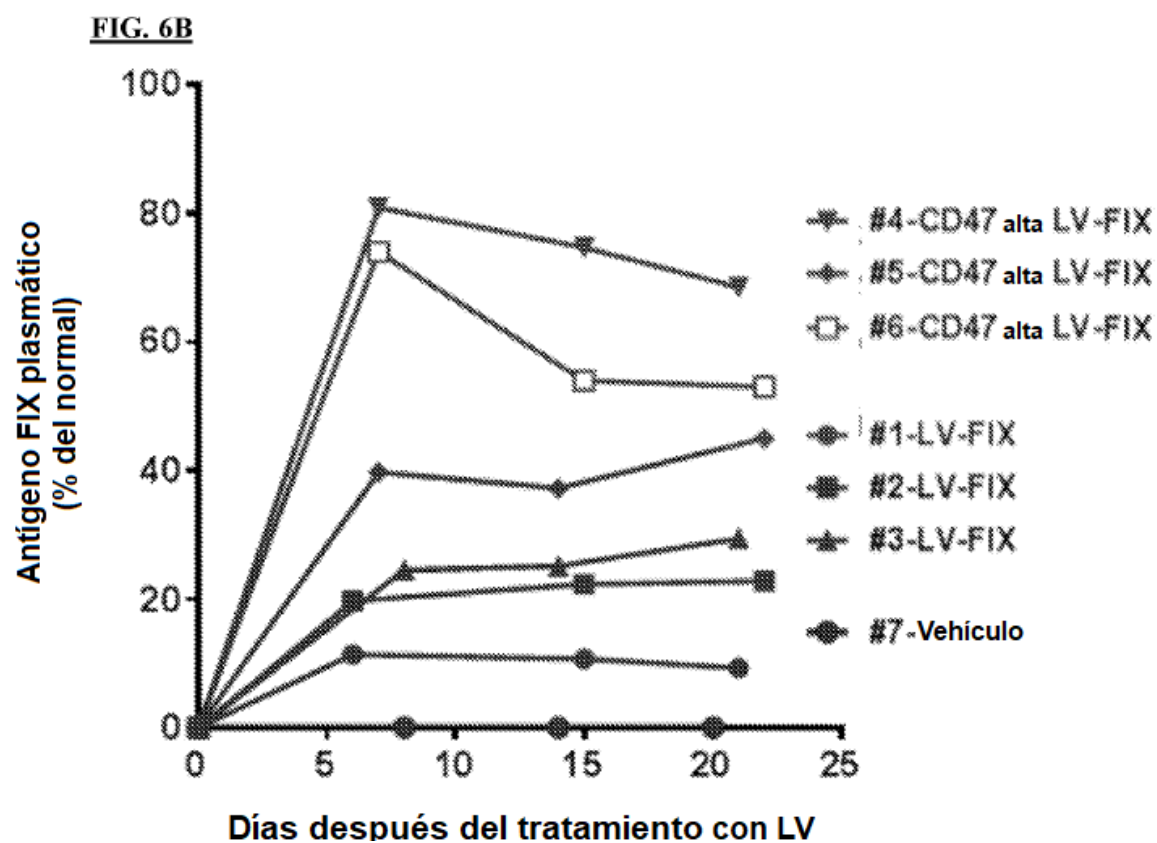
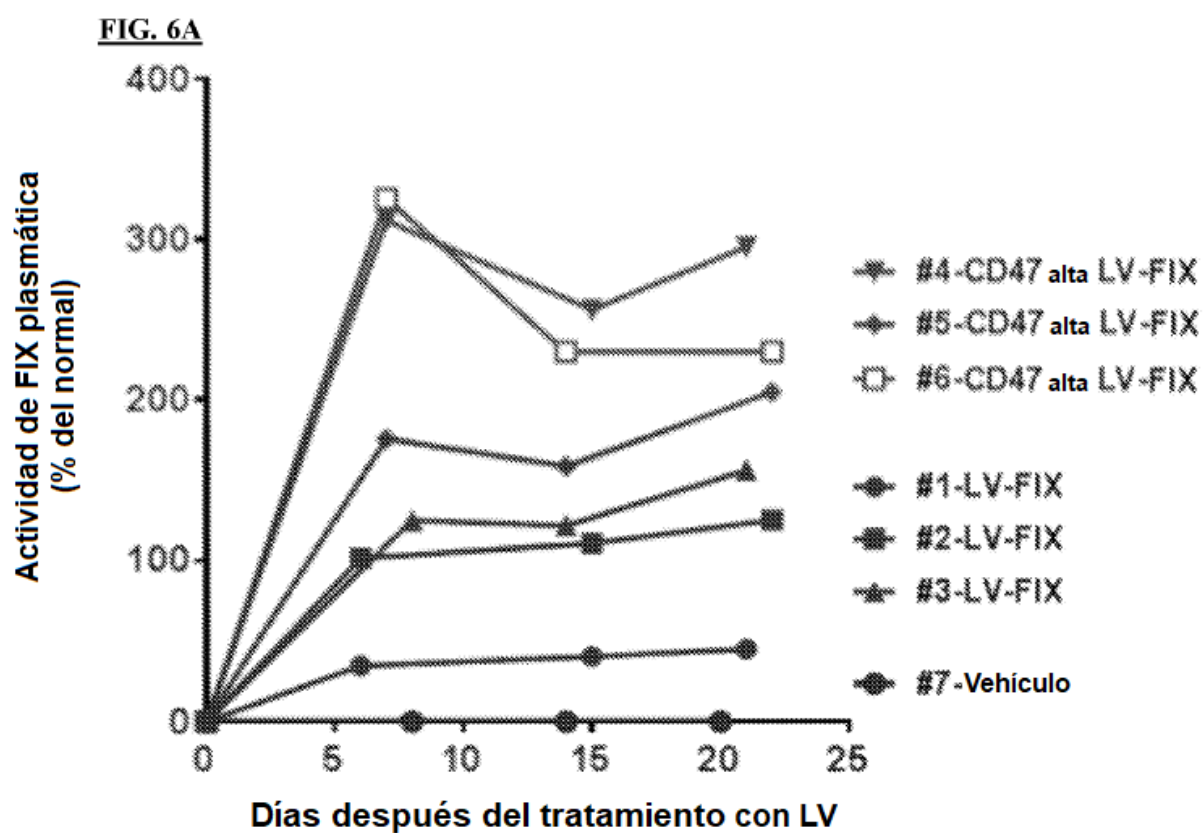


FIG. 5



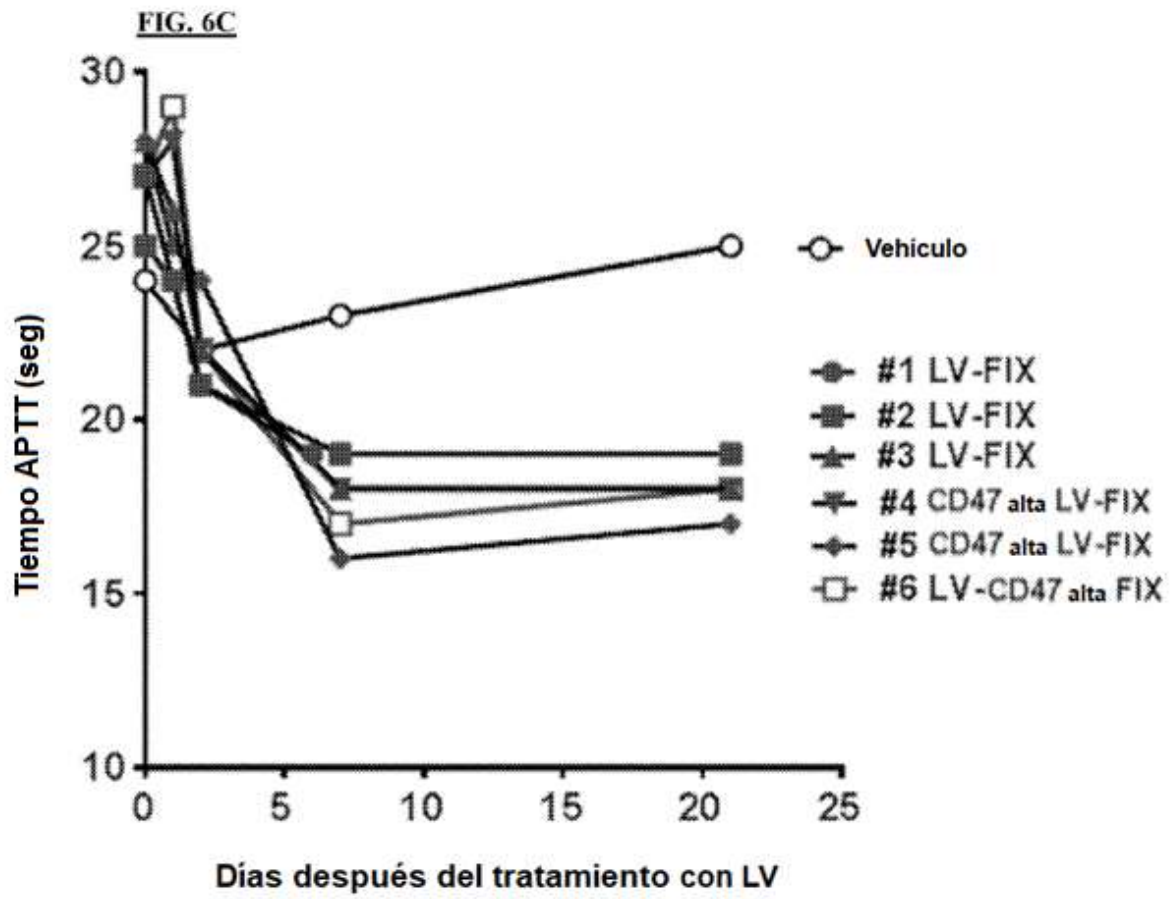


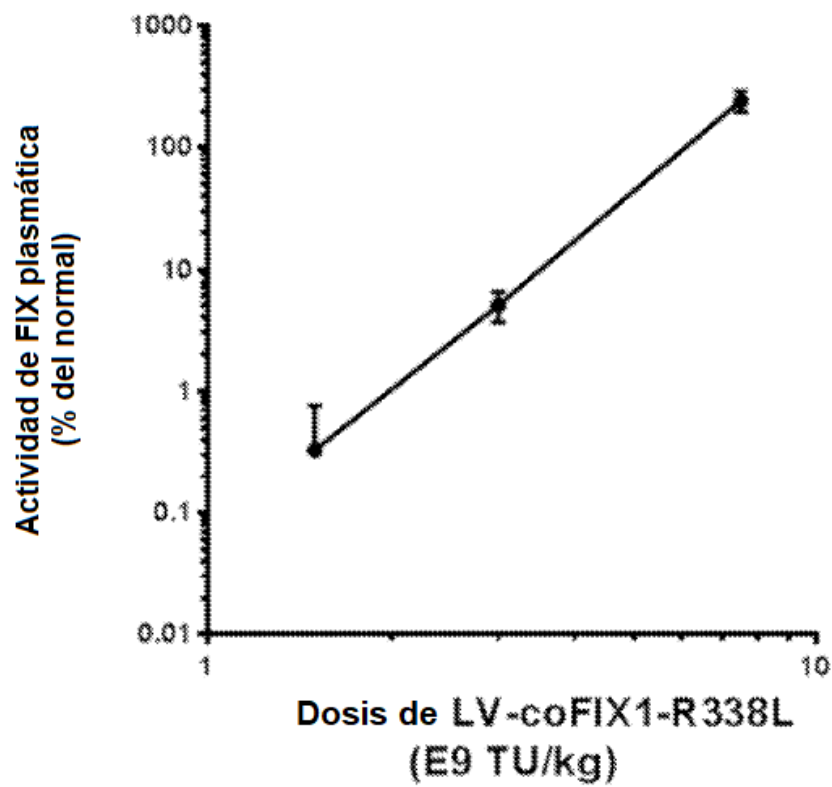
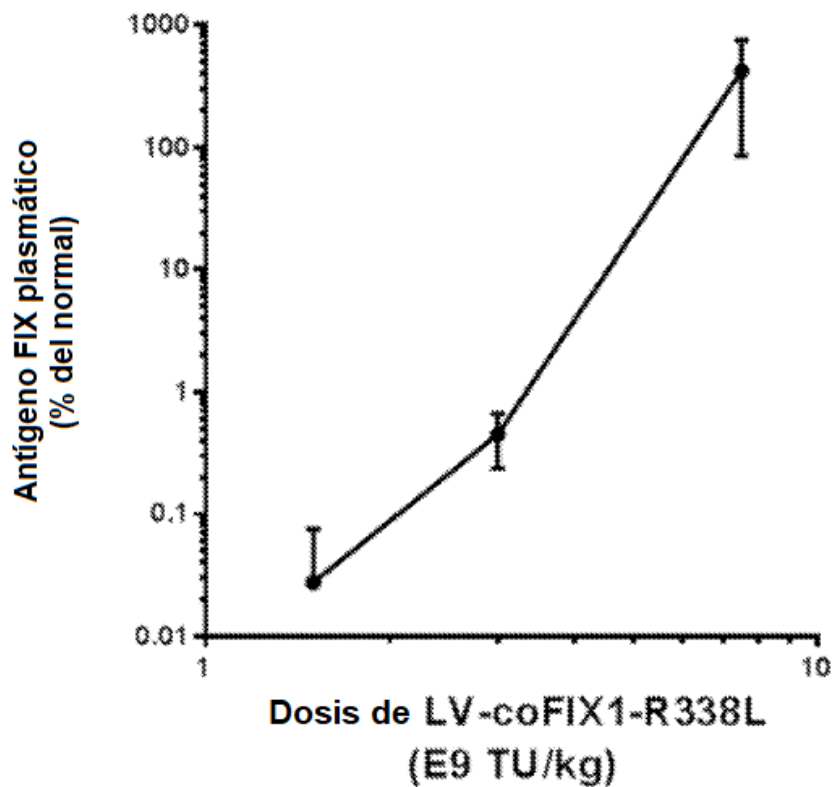
FIG. 7A**FIG. 7B**

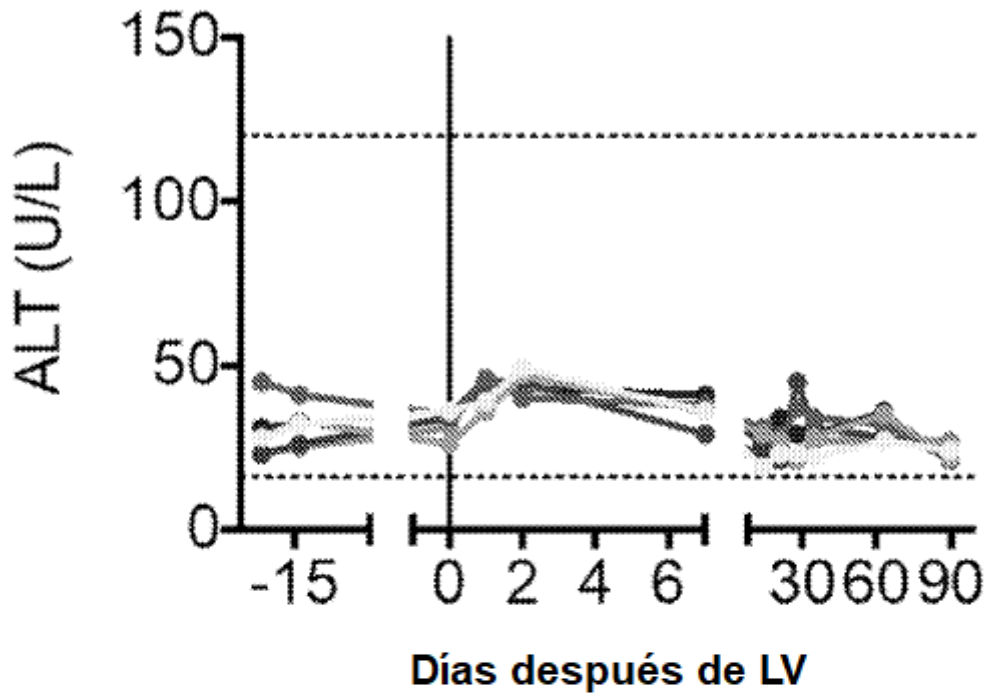
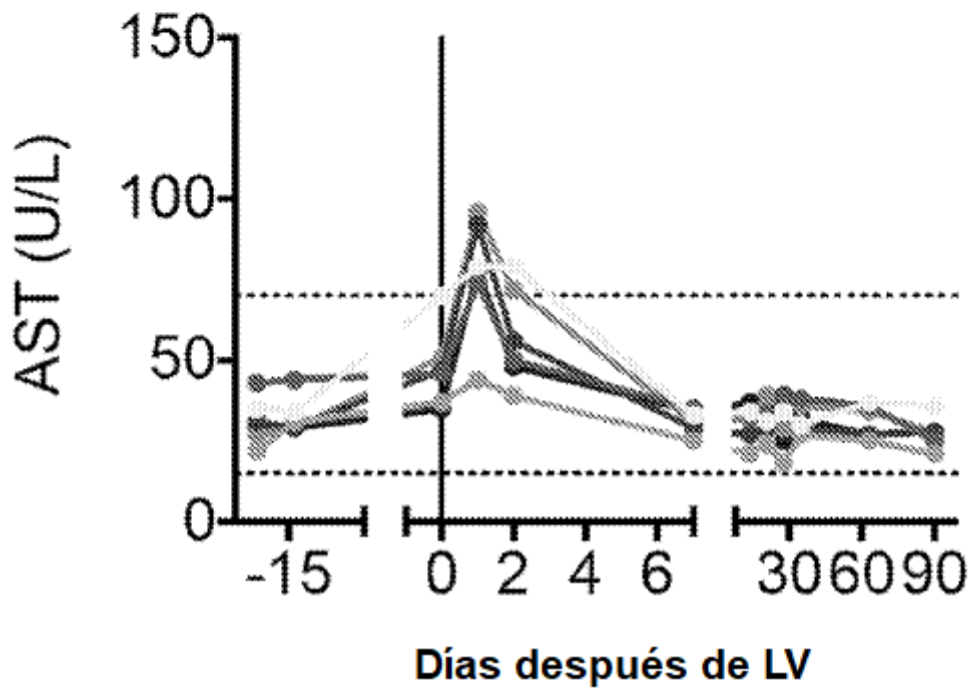
FIG. 8A**FIG. 8B**

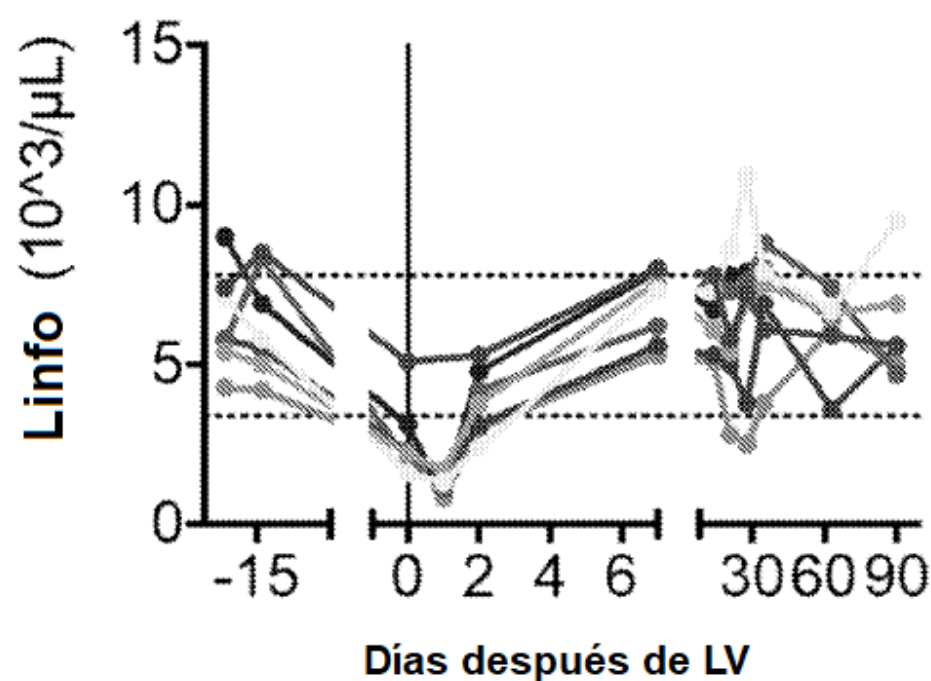
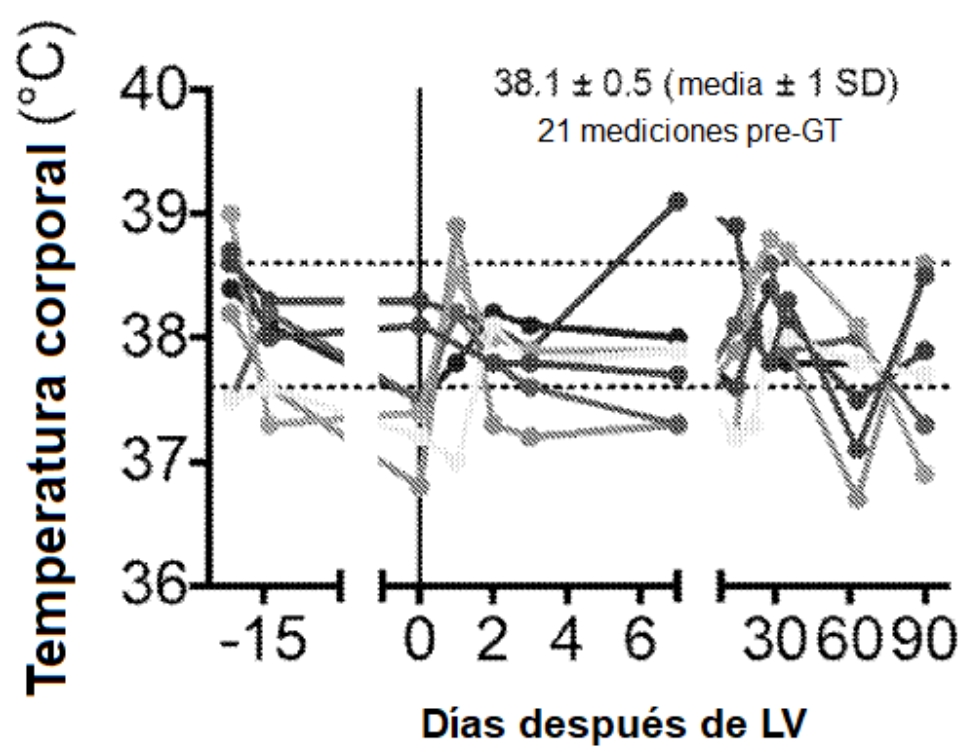
FIG. 8C**FIG. 8D**

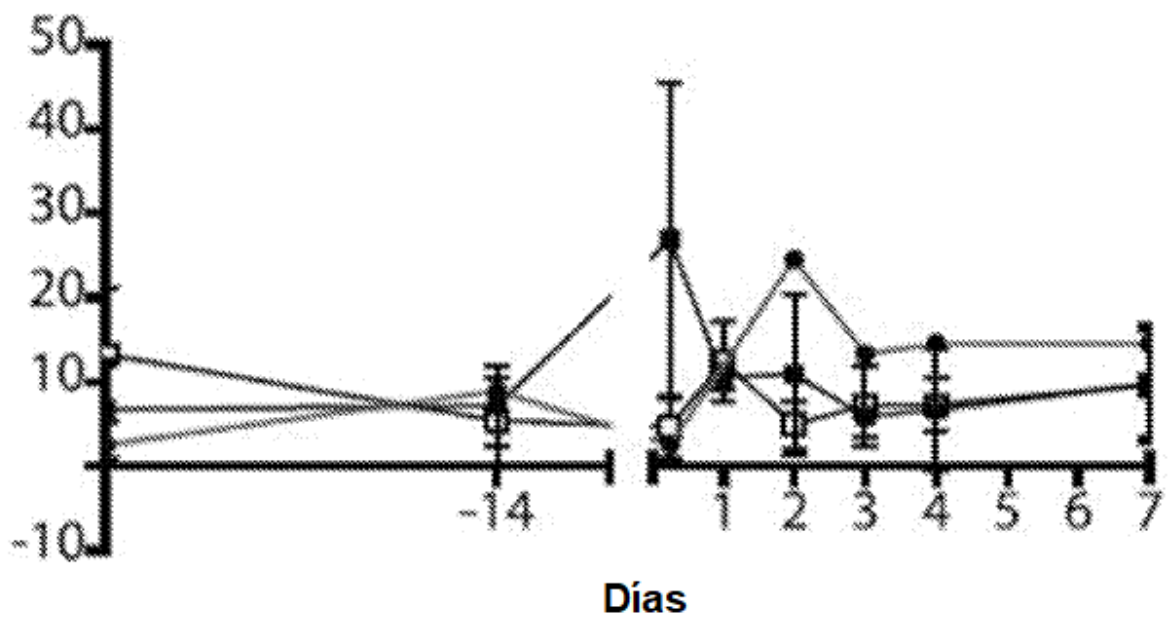
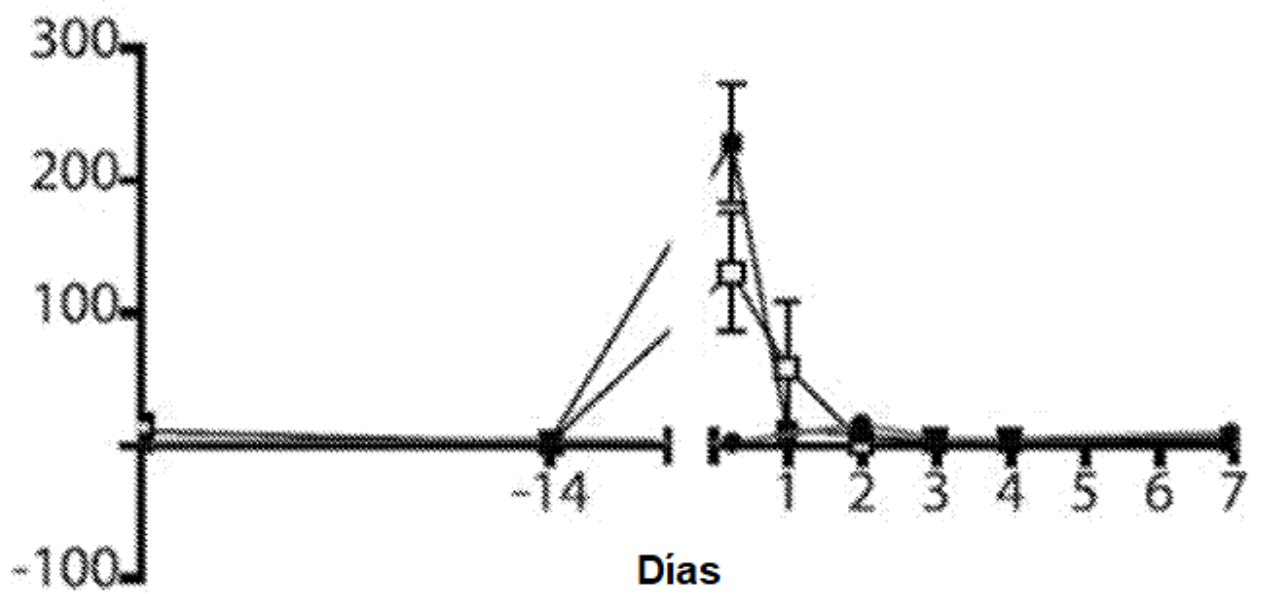
FIG. 9A**FIG. 9B**

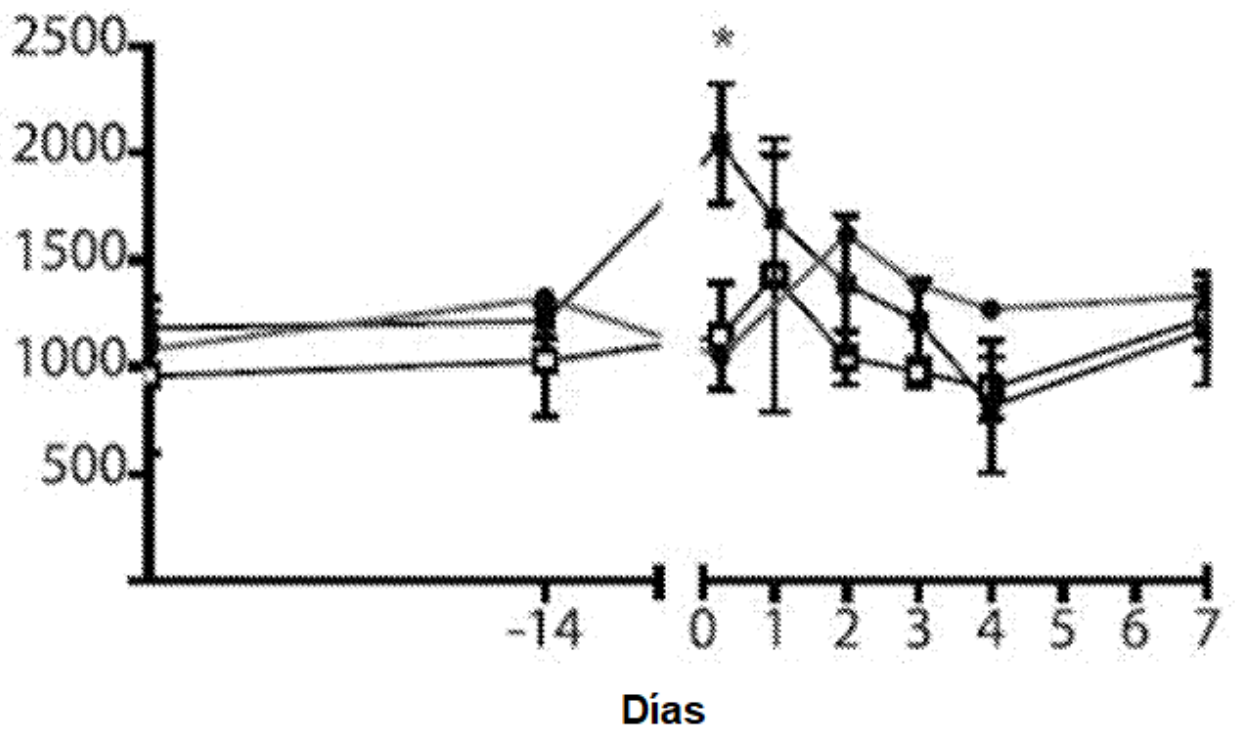
FIG. 9C

FIG. 10

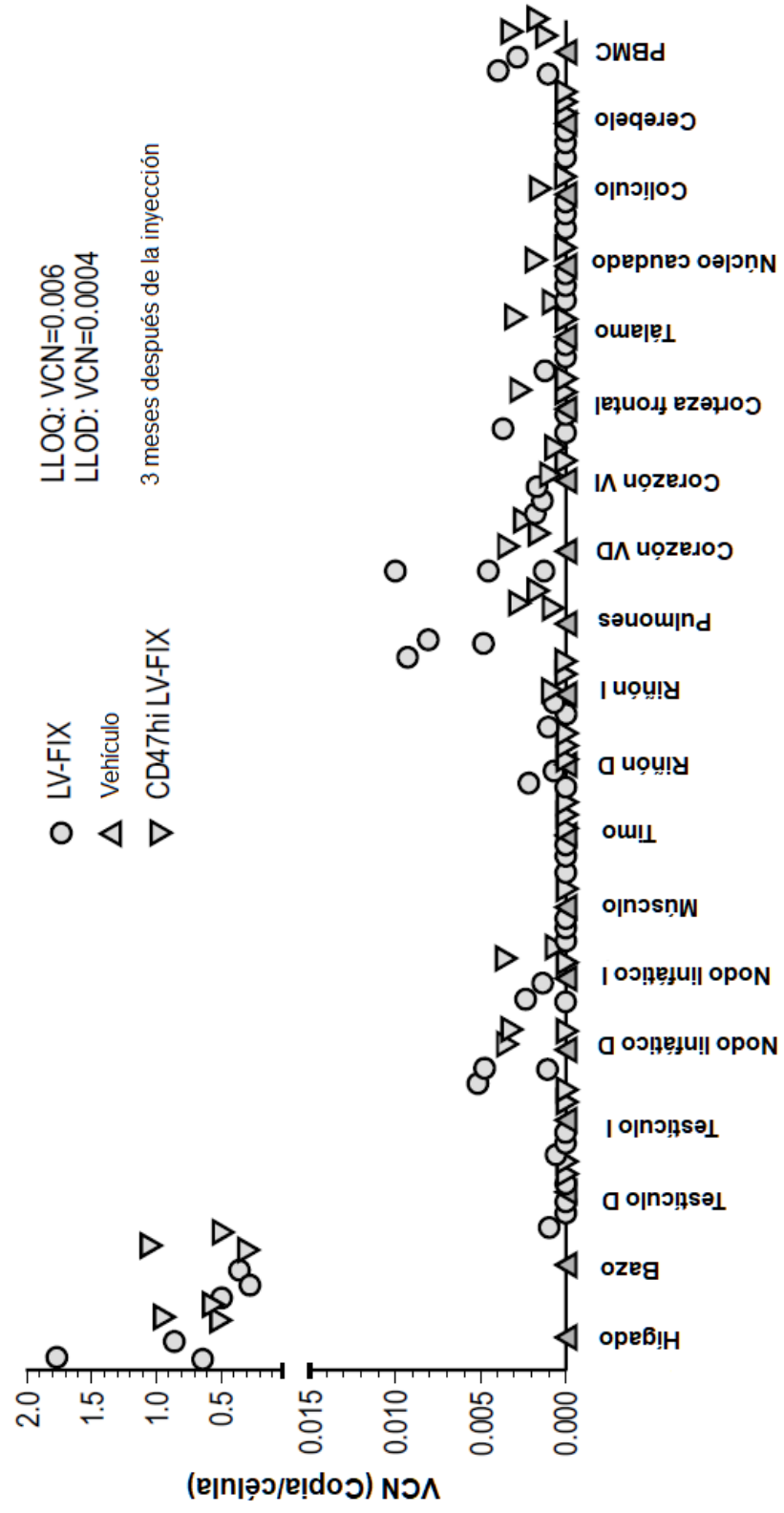
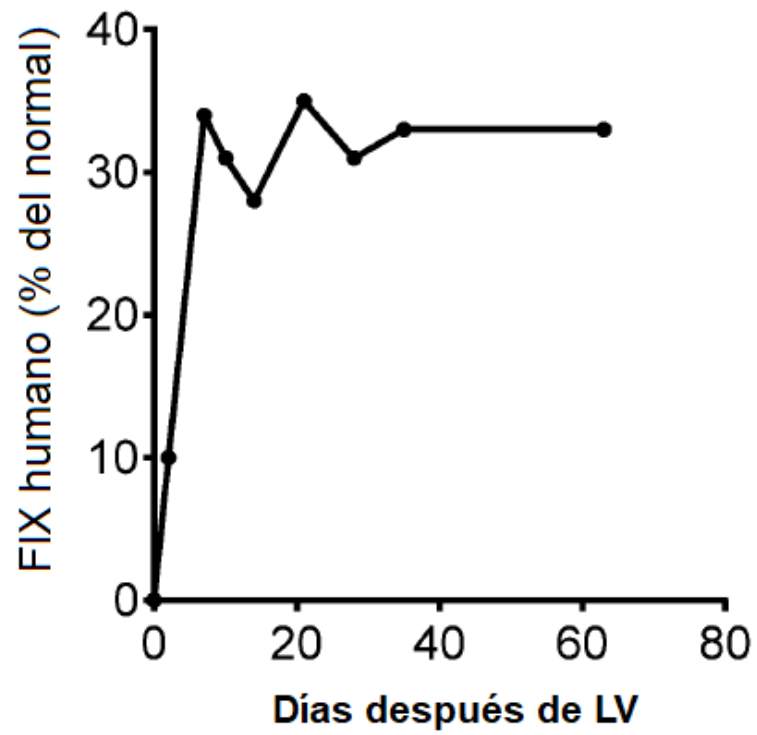


FIG. 11A**FIG. 11B**