

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 837**

51 Int. Cl.:
C12N 15/864 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/35 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05826631 .3**
96 Fecha de presentación: **15.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1828390**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Vectores quiméricos**

30 Prioridad:
15.12.2004 US 636126 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2012

73 Titular/es:
**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL
308 BYNUM HALL, CAMPUS BOX 4105
CHAPEL HILL, NC 27599-4105, US y
UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INCORPORATED**

72 Inventor/es:
BOWLES, Dawn E.;
LI, Chengwen;
RABINOWITZ, Joseph E.;
GRIEGER, Josh;
AGBANDJE-MCKENNA, Mavis y
SAMULSKI, Richard Jude

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 385 837 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores quiméricos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a vectores virales quiméricos novedosos y a los métodos de elaboración y administración de los mismos.

Antecedentes de la Invención

10 Cada vez está más claro que los vectores basados en virus adenoasociados (AAV) son los vectores de elección para ciertas aplicaciones de terapia génica tales como la liberación en el músculo. La utilización de vectores de AAV en tales protocolos se basa en las propiedades ventajosas de los AAV. Estas propiedades incluyen la carencia de patogenicidad y patología, la facilidad de preparación y purificación, la expresión a largo plazo en muchos tejidos incluyendo el músculo, y la carencia de una respuesta inmunitaria perjudicial mediada por células.

15 El serotipo 2 de AAV (AAV2) es el producto aislado de AAV mejor estudiado. A lo largo de la última década, se han realizado incursiones en la evaluación del tropismo tisular de serotipos alternativos de AAV. Estos estudios han demostrado que los distintos serotipos de AAV se pueden adaptar mejor a aplicaciones concretas. En este sentido, los serotipos 1, 6 y 7 son los más prometedores para la liberación en el músculo esquelético. Por ejemplo, en comparación con AAV2, AAV1 se puede administrar a dosis más bajas (esto es, menos partículas) y puede expresar el transgén en momentos anteriores y a niveles de expresión superiores.

20 Los esquemas de purificación para AAV2 están bien definidos. Menos optimizados están los parámetros de purificación para algunos de los otros serotipos de AAV. Sería deseable diseñar una variante de AAV2 que mostrara propiedades ventajosas, tales como una intensificación del tropismo hacia el músculo de AAV1, 6 y 7, pero que todavía conservara su facilidad de purificación. Incrementando la gama de vectores de AAV disponibles también se abordan asuntos adicionales relacionados con la re-administración y las respuestas inmunitarias.

Por consiguiente sería deseable tener disponible un conjunto más amplio de vectores de AAV.

25 Los vectores de AAV quiméricos presentan diferentes propiedades específicas de los serotipos (Bowles, 2003; J. Virol 77(1):423-432). Las quimeras fueron identificadas mediante rescate de marcadores: la inserción de una secuencia de un AAV diferente en la cápsida del AAV defectuoso rescató la función, y además proporcionó ciertas propiedades características del serotipo donador.

30 El documento WO 01/68888 describe vectores de AAV con cápsidas quiméricas, que confieren un tropismo alterado que permite la elección como diana selectiva de células deseadas. Entre las quimeras se conciben virus AAV2 con cápsidas de AAV2/AAV1 híbridas.

Compendio de la Invención

35 La presente invención proporciona vectores virales quiméricos que han sido diseñados para mostrar una o más propiedades de interés (p. ej., intensificación del tropismo hacia un tejido). Por ejemplo, los autores de la presente invención han identificado el aminoácido clave de AAV1 responsable de la intensificación de la transducción *in vivo* y han manipulado selectivamente este aminoácido en el esqueleto de AAV2 y AAV3b. En realizaciones concretas, los virus quiméricos de la invención tienen una capacidad de transducción mejorada (p. ej., transducción de músculo esquelético, músculo cardíaco, células gliales, astrocitos, hígado, retina y/o pulmón, etc.), niveles de expresión de transgenes mejorados y/o un comienzo más temprano de la expresión de los transgenes. El virus quimérico también puede tener una capacidad de transducción reducida con respecto a una o más células o tejidos (p. ej., hígado), que puede ser deseable en términos de direccionamiento del vector al tejido diana de interés y reducción de la dosificación del vector que se va a administrar.

45 Con respecto a los virus quiméricos basados en AAV2, estas quimeras se pueden diseñar para que conserven una o más de las propiedades deseables de este serotipo (tal como la facilidad de purificación y la seguridad conocida), a la vez que muestran algunas de las propiedades ventajosas de otros AAV, tales como AAV1, AAV6 y/o AAV7 (incluyendo una mejora de la transducción de músculo esquelético), y/u otras propiedades de interés que no se observan en otros AAV o se presentan en un grado menor en otros AAV. Adicionalmente, en realizaciones concretas, el virus quimérico tiene un perfil inmunológico diferente del de uno o ambos virus parentales (esto es, sólo es débilmente reconocido o no es reconocido en absoluto por los antisueros neutralizadores contra el virus parental), permitiendo de ese modo la administración a sujetos que tienen anticuerpos dirigidos contra el virus parental repetir la administración tras la administración de otro serotipo.

50 Por consiguiente, como un aspecto la invención proporciona un vector viral quimérico que comprende:

- (a) una cápsida de un AAV quimérico que comprende una inserción selectiva de un aminoácido inmediatamente después de la posición del aminoácido 264 en una subunidad de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una subunidad de la cápsida de otro AAV; y
- 5 (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia repetida terminal de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga;
- donde el ácido nucleico está empaquetado en el interior de la cápsida de un AAV quimérico.
- Asimismo se describe un vector viral quimérico que comprende:
- (a) una cápsida de un AAV quimérico que comprende:
- 10 (i) una sustitución selectiva de aminoácido de una alanina por glutamina en la posición del aminoácido 263 en una subunidad de la cápsida de AAV2;
- (ii) una inserción selectiva de aminoácido de una treonina después de la posición del aminoácido 264 en la subunidad de la cápsida de AAV2 (esto es, inmediatamente después de la posición del aminoácido 264);
- 15 (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia repetida terminal de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga;
- donde el ácido nucleico está empaquetado en el interior de la cápsida de un AAV quimérico.
- Asimismo se describe un vector viral quimérico que comprende:
- (a) una cápsida quimérica de AAV que comprende:
- 20 (i) una sustitución selectiva de aminoácido de una alanina por una glutamina en la posición del aminoácido 263 de una subunidad de la cápsida de AAV3b;
- (ii) una inserción selectiva de aminoácido de una treonina después de la posición del aminoácido 264 en la subunidad de la cápsida de AAV3b (p. ej., inmediatamente después de la posición del aminoácido 264);
- (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia repetida terminal de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga;
- 25 donde el ácido nucleico está empaquetado en el interior de la cápsida de un AAV quimérico.
- Como otro aspecto más, la invención proporciona un vector viral quimérico que comprende:
- (a) una cápsida de un AAV quimérico que comprende una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 450 y/o una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 457 en una subunidad de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una subunidad de la cápsida de otro AAV;
- 30 (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia repetida terminal de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga;
- donde el ácido nucleico está empaquetado en el interior de la cápsida de un AAV quimérico.
- Asimismo se describe un vector viral quimérico que comprende:
- 35 (a) una cápsida de un AAV quimérico que comprende una sustitución selectiva de aminoácido en la posición del aminoácido 457 en una subunidad de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en la subunidad de la cápsida de otro AAV;
- (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia repetida terminal de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga;
- o donde el ácido nucleico está empaquetado en el interior de la cápsida de un AAV quimérico.
- 40 También se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden los vectores virales quiméricos de la invención.
- La invención también proporciona los métodos *in vitro* de administración de un ácido nucleico a una célula que comprenden poner en contacto la célula con un vector viral quimérico o una formulación farmacéutica de la invención.

La invención también proporciona el uso de vectores virales quiméricos de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades.

Estos y otros aspectos de la invención se exponen con más detalle en la descripción de la invención más abajo.

Breve descripción de los dibujos

5 **Figuras. 1A-1B.** Fundamento del planteamiento de la clasificación. Se sometieron cuatro serotipos de AAV (AAV1, AAV2, AAV7, y AAV8) a un alineamiento de aminoácidos múltiple utilizando el programa Align del paquete de soporte lógico Vector NTI. Los aminoácidos similares en AAV1 (SEQ ID NO: 1) y AAV7 (SEQ ID NO: 2) y distintos de AAV2 (SEQ ID NO: 3) y AAV8 (SEQ ID NO: 4) o las posiciones que contenían aminoácidos que eran diferentes en los 4 serotipos se identificaron como candidatos potenciales. Esto condujo a los 36 candidatos potenciales para construir AAV2. La eliminación de aminoácidos que no pudieron ser modelados sobre la estructura cristalina y el modelado molecular de los candidatos sobre la superficie de la cápsida condujeron al ensayo de los aminoácidos mostrado en la **Figura 1C**.

10 **Figura 1C.** Alineamiento de AAV1 y AAV2 utilizando el programa Align del paquete de soporte lógico Vector NTI. Los aminoácidos sometidos a ensayo en el planteamiento de la clasificación se muestran con flechas. Los aminoácidos rodeados con un círculo corresponden a aquellos aminoácidos identificados previamente por Hauck et al., (2003) en *J. Virology* 77:2768-2774).

15 **Figura 2A.** El cambio del aminoácido de AAV2 de las posiciones 324, 328 no intensificó la transducción muscular. Se cambiaron los aminoácidos de las posiciones 324, 328 de AAV2 por los de AAV1. Se inyectaron 1×10^{10} partículas que contenían genoma viral en cada uno de los gastrocnemios de ratones Balb/c macho. Se tomaron imágenes de cada ratón los días 7, 14, 28, y 42 después de la inyección. El virus utilizado en este experimento se purificó utilizando gradientes de cloruro de cesio.

20 **Figura 2B.** Cuantificación de la emisión de luz a partir de músculo AAV2 versus la variante 324, 328. La cantidad de luz emitida en el experimento representado en la Figura 2A se calculó utilizando el soporte lógico CMIR_Image. Se definieron las regiones de interés (ROI) de cada pata y se utilizaron para calcular los fotones totales emitidos. Los datos se representan como la media de los 6 miembros.

25 **Figura 3A.** El cambio de los aminoácidos de AAV2 para crear la variante 2.5 intensificó enormemente el tropismo hacia el músculo de esta variante. Se inyectaron 1×10^{10} partículas que contenían genoma viral en cada uno de los gastrocnemios de ratones Balb/c macho. Se tomaron imágenes de cada ratón los días 7, 14, 28, 42, y 95 después de la inyección. El virus utilizado en este experimento se purificó utilizando HPLC con heparina. La cantidad de luz emitida de cada animal se calculó utilizando el soporte lógico CMIR_Image. Se definieron las regiones de interés (ROI) de cada pata y se utilizaron para calcular los fotones totales emitidos. Los datos se representan como una media de los 6 miembros.

30 **Figura 3B.** Localizaciones de las posiciones de aminoácidos en el monómero de la cápsida de AAV2. Se representa una estructura de cintas 3D del monómero de la cápsida de AAV2. Las localizaciones de los cambios realizados en la variante 2.5 se indican por flechas. La flecha superior apunta a las regiones 263, 265, y las 3 flechas inferiores apuntan a los aminoácidos 709, 712, 720.

35 **Figura 3C.** Posición de los aminoácidos 2.5 en el pentámero de AAV2. La localización de los aminoácidos de la variante 2.5 se indica por medio de un círculo. Aunque 2 de los aminoácidos se encuentran sobre una porción de la subunidad individual y otros 3 aminoácidos se encuentran sobre otra porción de la misma subunidad, cuando 2 subunidades se juntan para formar la cápsida de AAV, estos 5 aminoácidos se encuentran muy próximos en el eje de simetría bidimensional.

40 **Figura 4.** Los aminoácidos 263, 265 confieren una intensificación del tropismo hacia el músculo. Se generaron subgrupos (263, 265; 709, 712, 720) de la variante 2.5. Se inyectaron 1×10^{10} partículas que contenían genoma viral en cada uno de los gastrocnemios de ratones macho Balb/c. Se tomaron imágenes de cada ratón a los 7, 14, 28, y 42 días de la inyección. El virus utilizado en este experimento se purificó utilizando gradientes de cloruro de cesio. La variante 263, 265 mostró una intensificación del tropismo hacia el músculo similar a la variante 2.5, mientras la variante 709, 712, 720 mostró un perfil de tropismo hacia el músculo similar al de AAV2.

45 **Figura 5.** La inserción de treonina en la posición 265 es responsable de la mayor parte de la intensificación del tropismo hacia el músculo de 2.5. Se generaron subgrupos (263 o 265) de la variante 263, 265. Se inyectaron 1×10^{10} partículas que contenían genoma viral en cada uno de los gastrocnemios de los ratones macho Balb/c. Se tomaron imágenes de cada ratón a los 7, 14, 28, 42, y 100 días de la inyección. El virus utilizado en este experimento se purificó utilizando gradientes de cloruro de cesio. La variante 265 mostró una intensificación del tropismo hacia el músculo similar al de la variante 263, 265 mientras la variante 263 no mostró una intensificación del tropismo hacia el músculo.

Figura 6. La variante 454, 461 mostró una intensificación del tropismo hacia el músculo en momentos más tardíos después de la inyección. Se inyectaron 1×10^{10} partículas que contenían genoma viral de AAV2 o 454, 461 en cada uno de los gastrocnemios de ratones macho Balb/c. Se tomaron imágenes de cada ratón los días 7, 14, 21, 28, y 42 después de la inyección. El virus utilizado en este experimento fue purificado utilizando gradientes de cloruro de cesio. La transducción muscular de 454, 461 fue similar a la de AAV2 en los primeros momentos (días 7 y 14) pero la expresión fue mejor que la de AAV2 en los momentos más tardíos (días 21-42).

Figura 7. Identificación de la región 263, 265 de otros serotipos de AAV como un área de inserciones naturales. Las secuencias de las cápsidas de los serotipos de AAV 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se sometieron a alineamiento de secuencia múltiple utilizando el programa Align del paquete de soporte lógico Vector NTI. Se muestran en recuadro los aminoácidos de los otros serotipos correspondientes a los aminoácidos identificados en AAV1 como responsables de la intensificación del tropismo hacia el músculo.

Figura 8. Perfil de unión a heparina de las variantes de AAV. Se aplicaron partículas equivalentes de cada variante de AAV a heparina-agarosa de tipo 1 y se dejó que se unieran. Se lavaron las columnas con PBS, seguido de elución en cloruro de sodio. El número de partículas presentes en el descarte, los lavados y las eluciones se determinaron por medio de hibridación por transferencia puntual. Los datos se representan como el porcentaje de partículas no unidas (lavado y descarte) y unidas (elución).

Figura 9. Alineamiento de aminoácidos de la secuencia de la cápsida del mutante 263, 265 en un fondo de AAV2 con la secuencia de la cápsida de AAV2. El aminoácido 1 se numera con respecto a la secuencia de VP1.

Figura 10. Alineamiento de aminoácidos de la secuencia de la cápsida del mutante 263, 265 (SEQ ID NO: 14) en un fondo de AAV3b con la secuencia de la cápsida de AAV3b (SEQ ID NO: 15). El aminoácido 1 se numera con respecto a la secuencia de VP1.

Figura 11. Alineamiento de aminoácidos de la secuencia de la cápsida del mutante 2.5 (SEQ ID NO: 16) en un fondo de AAV2 con la secuencia de la cápsida de AAV2 (SEQ ID NO: 3). El aminoácido 1 se numera con respecto a la secuencia de VP1.

Figura 12. Actividad luciferasa a lo largo del tiempo (días 3, 7, 14 y 21) en ratones a los que se han inyectado partículas que contienen genoma equivalente (1×10^{10}) de AAV1, AAV2, AAV3b, o SASTG determinada mediante formación de imágenes del animal vivo *in vivo*.

Figura 13. Niveles de Factor IX humano (hFIX) detectados mediante ELISA en suero de ratones tratados con AAV2 o un vector 2.5 quimérico que porta el transgén de hFIX.

Figura 14. Expresión del transgén de la proteína fluorescente verde (GFP) en células neuronales (flecha izquierda) y no neuronales (flecha derecha) en el córtex de cerebro de ratón después de la administración de un vector 2.5 quimérico que porta el transgén de GFP.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las cápsidas de parvovirus (incluyendo AAV) pueden ser diseñadas para incorporar regiones pequeñas y selectivas de otros parvovirus que confieren propiedades deseables. Los autores de la presente invención han descubierto que en algunos casos incluso una sola inserción o sustitución de aminoácido de un primer parvovirus (por ejemplo, un AAV) en la estructura de la cápsida de otro parvovirus (por ejemplo, un AAV) para crear un parvovirus quimérico es suficiente para conferir una o más de las propiedades deseables del primer parvovirus al parvovirus quimérico resultante y/o para conferir otras propiedades que no están presentes en el primer parvovirus o están presentes en menor medida.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos, en los que se muestran las realizaciones preferidas de la invención. Esta invención, sin embargo, puede ser representada de diferentes formas y no se debe interpretar que está limitada a las realizaciones expuestas en la presente memoria. En lugar de eso, estas realizaciones se proporcionan de manera que esta descripción será exhaustiva y completa, y transmitirá plenamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención en la presente memoria tiene únicamente el propósito de describir las realizaciones concretas y no se pretende que sea limitante de la invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

La designación de todas las posiciones de los aminoácidos en las subunidades de la cápsida de AAV en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas es con respecto a la numeración de la subunidad de la cápsida de VP1.

Salvo que se indique lo contrario, los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse para la construcción de constructos de AAVr, proteínas de la cápsida modificadas, vectores de empaquetamiento que expresan las secuencias rep y/o cap de parvovirus y células de empaquetamiento transfectadas transitoriamente y establemente. Tales mecanismos son conocidos por los expertos en la técnica. Véanse, por ejemplo, SAMBROOK *et al*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); FM AUSUBEL *et al*. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Definiciones.

Los siguientes términos se utilizan en la presente descripción de la presente memoria y las reivindicaciones adjuntas:

Tal como se utiliza en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, se pretende que las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyan también las formas en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "parvovirus" según se utiliza en la presente memoria abarca la familia *Parvoviridae*, incluyendo parvovirus y dependovirus autónomamente replicantes. Los parvovirus autónomos incluyen miembros de los géneros, *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus* y *Contravirus*. Los ejemplos de parvovirus autónomos incluyen, pero no están limitados a, el virus diminuto del ratón, el parvovirus bovino, el parvovirus canino, el parvovirus de pollo, el virus de la panleucopenia felina, el parvovirus felino, el parvovirus de ganso, el parvovirus H1, el parvovirus de pato de Berbería, y el virus B19. Otros parvovirus autónomos son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS *et al.*, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers).

El género *Dependovirus* contiene los virus adeno-asociados (AAV), incluyendo pero no limitados a, AAV de tipo 1, AAV de tipo 2, AAV de tipo 3 (incluyendo los tipos 3A y 3B), AAV de tipo 4, AAV de tipo 5, AAV de tipo 6, AAV de tipo 7, AAV de tipo 8, AAV de tipo 9, AAV de tipo 10, AAV de tipo 11, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino y AAV ovino y o cualquier otro AAV conocido ahora o descubierto más tarde. Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS *et al.*, VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers). Recientemente, se han identificado varios nuevos serotipos y clados de AAV (véase, por ejemplo, Gao *et al.*, (2004) *J. Virology* 78:6381-6388 y la **Tabla 1**).

Las secuencias genómicas de los diversos serotipos de AAV y de los parvovirus autónomos, así como las secuencias de las repeticiones terminales (TR), proteínas Rep y subunidades de cápsidas son conocidas en la técnica. Tales secuencias pueden encontrarse en la literatura o en bases de datos públicas, tales como GenBank. Véase, por ejemplo, los números de acceso GenBank NC 002077, NC 001401, NC 001729, NC 001863, NC 001829, NC 001862, NC 000883, NC 001701, NC 001510, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC 001358, NC 001540, AF513851, AF513852, AY530579, AY631965, AY631966, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria en su totalidad. Véase también, por ejemplo, Srivistava *et al.*, (1983) *J. Virology* 45:555; Chiorini *et al*, (1998) *J. Virology* 71:6823; Chiorini *et al*, (1999) *J. Virology* 73:1309; Bantel-Schaal *et al*, (1999). *J. Virology* 73:939; Xiao *et al*, (1999). *J. Virology* 73:3994; Muramatsu *et al*, (1996). *Virology* 221:208; Shade *et al*, (1986) *J. Virol* 58:921; Gao *et al*, (2002). *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 99:11854; publicaciones de patente internacionales WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244, Patente de los Estados Unidos Núm. 6.156.303; cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria en su totalidad. Véase también la Tabla 1. Una primera descripción de las secuencias repetidas terminales de AAV1, AAV2 y AAV3 es proporcionada por Xiao, X., (1996), "Characterization of adeno-associated virus (AAV) DNA replication and integration", Ph. D. Dissertation, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA (que se incorpora en la presente memoria en su totalidad).

Tabla 1

Genomas Completos	Número de Acceso GenBank		Número de Acceso GenBank		Número de Acceso GenBank
			HuT88	AY695375	Clado E
Virus Adenoasociado 1	NC_002077, AF063497		HuT71	AY695374	Rh38
Virus Adenoasociado 2	NC_001401		HuT70	AY695373	Hu66
Virus Adenoasociado 3	NC_001729		HuT40	AY695372	Hu42
Virus Adenoasociado 3B	NC_001863		HuT32	AY695371	Hu67
Virus Adenoasociado 4	NC_001829		HuT17	AY695370	Hu40
Virus Adenoasociado 5	Y18065, AF085716		HuLG15	AY695377	Hu41
Virus Adenoasociado 6	NC_001862				Hu37
AAV Aviar ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828		Clado C		Rh40
AAV Aviar cepa DA-1	NC_006263, AY629583		Hu9	AY530629	Rh2
AAV Bovino	NC_005889, AY388617		Hu10	AY530576	Bb1
			Hu11	AY530577	Bb2
Clado A			Hu53	AY530615	Rh10
AAV1	NC_002077, AF063497		Hu55	AY530617	Hu17
AAV6	NC_001862		Hu54	AY530616	Hu6
Hu 48	AY530611		Hu7	AY530628	Rh25
Hu 43	AY530606		Hu18	AY530583	Pi2
Hu 44	AY530607		Hu15	AY530580	Pi1
HU 46	AY530609		Hu16	AY530581	Pi3
			Hu25	AY530591	Rh57
Clado B			Hu60	AY530622	Rh50
Hu 19	AY530584		Ch5	AY243021	Rh49
Hu 20	AY530586		Hu3	AY530595	Rh39
Hu 23	AY530589		Hu1	AY530575	Rh58
Hu22	AY530588		Hu4	AY530602	Rh61
Hu24	AY530590		Hu2	AY530585	Rh52
Hu21	AY530587		Hu61	AY530623	Rh53
Hu27	AY530592				Rh51
Hu28	AY530592		Clado D		Rh64
Hu29	AY530594		Rh62	AY530573	Rh43
Hu63	AY530624		Rh48	AY530561	AAV8
Hu64	AY530625		Rh54	AY530567	Rh8
Hu13	AY530578		Rh55	AY530568	Rh1
Hu56	AY530618		Cy2	AY243020	
Hu57	AY530619		AAV7	AY513851	Clado F
Hu49	AY530612		Rh35	AY243000	Hu14 (AAV9)
Hu58	AY530620		Rh37	AY242998	Hu31
Hu34	AY530598		Rh36	AY242999	Hu32
Hu35	AY530598		Cy6	AY243016	
AAV2	NC_001401		Cy4	AY243018	Producto Aislado Clonal
Hu45	AY530608		Cy3	AY243019	AAV5
Hu47	AY530610		Cy5	AY243017	AAV 3
Hu51	AY530613		Rh13	AY243013	AAV 3B
Hu52	AY530614				AAV4
Hu T41	AY695378				Rh34
Hu S17	AY695376				Rh33
					Rh32
					AY243003

El término "tropismo" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la entrada preferencial del virus en ciertos tipos de células o tejidos o a la interacción preferente con la superficie de la célula que facilita la entrada en ciertos tipos de células o tejidos, opcionalmente y preferiblemente seguido de la expresión (por ejemplo, transcripción y, opcionalmente, traducción) de las secuencias portadas por el genoma viral en la célula, por ejemplo, para un virus recombinante, la expresión de la secuencia o secuencias de nucleótidos heterólogos. Los expertos en

la técnica apreciarán que la transcripción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga del genoma viral no puede ser iniciada en ausencia de factores que actúan en trans, por ejemplo, para un promotor inducible o secuencia de ácido nucleico regulada de otro modo. En el caso de un genoma de AAVr, la expresión de los genes del genoma viral puede ser de un provirus integrado de forma estable, de un episoma no integrado, así como de cualquier otra forma en la que el ácido nucleico del virus pueda ser incluido dentro de la célula.

Según se utiliza en la presente memoria, "transducción" de una célula por AAV o una partícula de virus quimérico significa la transferencia de material genético a la célula por medio de la incorporación de ácido nucleico a la partícula de AAV o de virus quimérica y la posterior transferencia a la célula.

Según se utiliza en la presente memoria, un virus o cápsida del virus "receptor" es el virus o cápsida del virus parentales en los que se introduce la modificación para producir la quimera. Un virus o cápsida de virus "donador" según se utiliza en la presente memoria, es un virus o cápsida del virus parental del cual se extrae la modificación y se transfiere al receptor para producir la quimera.

A menos que se indique lo contrario, "intensificación de la transducción" o "intensificación del tropismo", o términos similares, por los vectores y cápsidas virales quiméricos de la invención significa que hay un aumento en la transducción o tropismo en comparación con el virus parental que actuó como receptor y en el que se introdujo la modificación para producir la quimera y/o el vector o la cápsida virales quiméricos exhiben "intensificación de la transducción" o "intensificación del tropismo," o términos similares, en comparación con el virus parental donador, es decir, hay un aumento en la transducción o tropismo en comparación con el virus parental que actuó como un donador y del que la modificación se tomó y se introdujo en el receptor para producir la quimera. En realizaciones concretas, el virus o cápsida quiméricos tienen intensificación del tropismo o transducción hacia células musculares (incluyendo el músculo esquelético, el músculo diafragma y/o el músculo cardíaco), hígado, células del ojo (incluyendo la retina, el epitelio pigmentario de la retina y/o la córnea), células del cerebro (incluyendo células gliales, astrocitos, neuronas y/u oligodendrocitos), pulmón, células epiteliales (incluyendo células epiteliales intestinales y/o respiratorias), células dendríticas, células pancreáticas (incluidas las células de los islotes), células óseas (por ejemplo, células pluripotenciales de médula ósea), células pluripotenciales hematopoyéticas, células de bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de la próstata, células progenitoras o células germinales.

De un modo similar, a menos que se indique lo contrario, por "reducción de la transducción" o "reducción del tropismo" o términos similares por los vectores y cápsidas virales quiméricos de la invención, se entiende que hay una disminución en la transducción o tropismo en comparación con el virus parental que actuó como receptor y en el que la modificación se introdujo para producir la quimera y/o el vector o cápsida de virus quimérico exhibe "reducción de la transducción" o "reducción del tropismo", o términos similares, en comparación con el virus parental donador, es decir, hay una disminución en la transducción o tropismo en comparación con el virus parental que actuó como donador y del que se tomó la modificación y se introdujo en el receptor para producir la quimera. En realizaciones concretas, el virus o cápsida quiméricos tienen reducción del tropismo o la transducción para células musculares (incluyendo el músculo esquelético, el músculo diafragma y/o el músculo cardíaco), hígado, células del ojo (incluyendo la retina, el epitelio pigmentario de la retina y/o la córnea), las células del cerebro (incluyendo las células gliales, astrocitos, neuronas y/u oligodendrocitos), pulmón, las células epiteliales (incluyendo células epiteliales intestinales y/o respiratorias), células dendríticas, células pancreáticas (incluidas las células de los islotes), células óseas (por ejemplo, células pluripotenciales de médula ósea), células pluripotenciales hematopoyéticas, células de bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de la próstata, células progenitoras o células germinales.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" abarca tanto péptidos como proteínas, a menos que se indique lo contrario.

Un "polinucleótido" es una secuencia de bases nucleotídicas, y puede ser ARN, ADN o secuencias híbridas de ADN-ARN (incluyendo nucleótidos tanto de origen natural como de origen no natural), pero son preferiblemente secuencias de ADN de cadena sencilla o doble.

Según se utiliza en la presente memoria, un polinucleótido "aislado" (por ejemplo, un "ADN aislado" o un "ARN aislado") significa un polinucleótido separado o sustancialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo de origen natural o virus, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o virales u otros polipéptidos o ácidos nucleicos encontrados comúnmente asociados con el polinucleótido.

Del mismo modo, un polipéptido "aislado" significa un polipéptido que se separa o está sustancialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo de origen natural o virus, por ejemplo, la célula o los componentes estructurales virales u otros polipéptidos o ácidos nucleicos encontrados comúnmente asociados con el polipéptido.

Un "polipéptido terapéutico" es un polipéptido que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un "polipéptido terapéutico" es un

polipéptido que confiere por otra parte un beneficio a un sujeto, por ejemplo, efectos anti-cancerosos o mejora en la supervivencia a un trasplante.

Por los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento de" (o términos gramaticalmente equivalentes) se entiende que la gravedad del estado del sujeto se reduce o se mejora o corrige al menos parcialmente y/o que se logra algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico y/o hay un retraso en la progresión de la afección y/o prevención o retraso de la aparición de una enfermedad o trastorno. Por lo tanto, los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento de" (o términos gramaticalmente equivalentes) se refieren a los regímenes, tanto profilácticos como terapéuticos.

Una "secuencia de nucleótidos heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo" es típicamente una secuencia que no se encuentra naturalmente presente en el virus. Generalmente, el ácido nucleico o secuencia de nucleótidos heterólogos comprenden un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido o ARN no traducido.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "vector" o "vector liberado" puede referirse a una partícula de parvovirus (por ejemplo, AAV) que funciona como un vehículo de liberación de ácido nucleico, y que comprende ADN viral (es decir, el genoma del vector) empaquetado dentro de una cápsida de parvovirus (por ejemplo, AAV). Alternativamente, en ciertos contextos, el término "vector" se utiliza para referirse al genoma del vector/ADNv en ausencia de la cápsida.

Según se utiliza en la presente memoria, un "genoma vector de parvovirus recombinante" es un genoma de parvovirus (es decir, ADNv) que comprende al menos una repetición terminal (por ejemplo, dos repeticiones terminales) y una o más secuencias de nucleótidos heterólogas. Una "partícula de parvovirus recombinante" comprende un genoma de vector parvovirus recombinante empaquetado dentro de una cápsida del parvovirus.

Un "genoma vector de AAVr" o "genoma de AAVr" es un genoma de AAV (es decir, ADNv) que comprende al menos una repetición terminal (por ejemplo, dos repeticiones terminales) y una o más secuencias de nucleótidos heterólogas. Los vectores de AAVr generalmente requieren sólo la repetición o repeticiones terminales de 145 de bases (TR) en cis para generar virus. Todas las otras secuencias virales son prescindibles y pueden ser suministradas en trans (Muzyczka, (1992) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 158:97). Típicamente, el genoma del vector de AAVr sólo conservará la secuencia o secuencias TR mínimas con el fin de maximizar el tamaño del transgén que pueda ser eficientemente empaquetado por el vector. Las secuencias codificantes de proteínas estructurales y no estructurales puede ser proporcionadas en trans (por ejemplo, de un vector, tal como un plásmido, o integrando establemente las secuencias en una célula de empaquetamiento). El genoma del vector de AAVr comprende opcionalmente dos TR de AAV, que se encontrarán generalmente en los extremos 5' y 3' de la secuencia o secuencias de nucleótidos heterólogas, pero no se necesita que sean contiguas. Las TR pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Una "partícula de AAVr" comprende un genoma del vector de AAVr empaquetado dentro de una cápsida de AAV.

Una "repetición terminal de parvovirus" puede ser de cualquier parvovirus, incluyendo parvovirus autónomos y AAV (todos definidos anteriormente). Una "repetición de AAV terminal" puede ser de cualquier AAV, por ejemplo, los serotipos 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. El término "repetición terminal" incluye secuencias sintéticas que funcionan como una repetición terminal invertida de AAV, tales como la "secuencia de doble D" como se describe en Patente de los Estados Unidos Núm. 5.478.745 de Samulski et al., cuya descripción se incorpora en la presente memoria en su totalidad como referencia. No se necesita que las repeticiones terminales de AAV tengan una secuencia con repeticiones terminales de tipo salvaje (por ejemplo, se puede alterar una secuencia de tipo salvaje mediante mutaciones por inserción, deleción, truncamiento o sin sentido), siempre y cuando la repetición terminal medie las funciones deseadas, por ejemplo, la replicación, el empaquetamiento del virus, la integración, y/o el rescate de provirus, y similares.

La estructura de la cápsida de los parvovirus autónomos y de AAV son descritas con más detalle por BERNARD N. FIELDS et al., *VIROLOGY*, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4^a ed., Lippincott-Raven Publishers).

El vector viral quimérico de la invención puede ser adicionalmente un vector viral "dirigido" (por ejemplo, que tiene un tropismo dirigido) y/o un parvovirus "híbrido" (es decir, en el que el genoma y la cápsida viral de AAVr son de parvovirus diferentes) como se describe en la publicación de patente internacional WO 00/28004 y Chao et al., (2000) *Molecular Therapy* 2:619. En realizaciones concretas, el genoma y la cápsida viral de AAVr son de AAV diferentes.

En realizaciones concretas, todas las subunidades de la cápsida viral derivan del mismo esqueleto de proteínas de la cápsida de AAV. En otras realizaciones, la cápsida viral comprende proteínas de la cápsida que derivan de diferentes esqueletos de AAV.

Los virus quiméricos de la invención pueden ser adicionalmente partículas de parvovirus que forman dúplex como se describe en la publicación de patente internacional WO 01/92551.

Por consiguiente, según se utiliza en la presente memoria, los términos "parvovirus quimérico" y "AAV quimérico" abarcan partículas de virus híbridas, dirigidas y que forman dúplex, así como otras formas modificadas de parvovirus y AAV.

5 Vectores Virales Quiméricos.

Regiones seleccionadas dentro de la cápsida de AAV puede conferir propiedades deseables a otros AAV, incluyendo pero no limitadas a, la capacidad de intensificación de la transducción (por ejemplo, intensificación de la transducción de las células del músculo esquelético), mayor expresión de un transgén liberado por el genoma recombinante y/o el comienzo más temprano de la expresión del transgén. Estas regiones seleccionadas pueden ser transferidas u "organizadas" en otras cápsidas de AAV para conferir la propiedad o propiedades de interés a la partícula quimérica resultante. Como ilustración, en el caso de AAV2, los autores de la presente invención han descubierto que con una inserción de un único aminoácido de AAV1, AAV2 puede adquirir la mejora de la capacidad de transducción de AAV1, manteniendo al mismo tiempo la facilidad de purificación (es decir, conserva la capacidad de unirse a heparina) y las conocidas características de seguridad de AAV2. Adicionalmente, en realizaciones concretas, el virus quimérico resultante tiene un perfil inmunológico diferente al del virus parental (por ejemplo, es escasamente o en absoluto reconocido por el antisuero neutralizador del virus parental), permitiendo de este modo la administración repetida a los sujetos que han desarrollado anticuerpos contra el virus parental. Por ejemplo, el vector 2.5 quimérico descrito en la presente memoria es sólo escasamente reconocido por los antisueros neutralizadores contra AAV2.

En los presentes estudios, los autores de la presente invención han comparado las secuencias de aminoácidos lineales de dos serotipos con altos niveles de transducción de músculo esquelético (AAV1 y AAV7) con dos que son menos eficaces en la transducción de músculo esquelético (AAV2 y AAV8). Aunque estos cuatro serotipos exhiben en general un alto grado de similitud de secuencias, hay regiones de divergencia y las características de estos cuatro serotipos como vectores de liberación son distintas. Utilizando el análisis de secuencia, un número de aminoácidos candidato en AAV 1 y/o AAV7 fueron identificados para su incorporación en AAV2 para determinar si conferirían la mejora de la transducción del músculo esquelético de AAV1/7 a AAV2. Este grupo inicial de posiciones candidato se redujo considerablemente basándose en el análisis de la estructura cristalina conocida de AAV2, por ejemplo, para identificar las posiciones de aminoácidos que se encuentran en regiones que es probable que afecten a la biología del virus. Este grupo más pequeño de aminoácidos fue a continuación sustituido y/o insertado en AAV2, individualmente o combinado y algunos de los mutantes resultantes demostraron la mejora de la transducción del músculo esquelético de AAV1. Se pueden introducir fácilmente las modificaciones correspondientes en otros AAV basándose en la presente descripción. Una modificación "correspondiente" puede ser una inserción y/o una sustitución y/o una delección. Por ejemplo, una modificación que es una inserción en AAV2 puede ser una mutación por sustitución en otro AAV. Adicionalmente, en otro AAV más, una mutación por delección puede llevar un aminoácido a la posición deseada dentro de las subunidades de la cápsida. Las modificaciones "correspondientes" en otros AAV serán evidentes para los expertos en la técnica.

De acuerdo con la presente invención, se introducen uno o varios cambios de aminoácidos "selectivos" en la cápsida viral. Este enfoque está en contraste con trabajos anteriores con la subunidad completa o permutas grandes de dominio entre los serotipos de AAV (véase, por ejemplo, la patente internacional WO 00/28004 y Hauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774). Un cambio de amino ácidos "selectivo" da como resultado la inserción y/o la sustitución y/o la delección de menos de aproximadamente 20, 18, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 aminoácidos contiguos. En realizaciones concretas, solo se insertan y/o sustituyen y/o suprimen dos aminoácidos contiguos o incluso mutaciones puntuales (es decir, un aminoácido) en las subunidades de la cápsida.

Se pueden introducir uno o más cambios selectivos de aminoácidos en diferentes posiciones dentro de las subunidades de la cápsida. Por ejemplo, en realizaciones concretas, se pueden introducir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más cambios selectivos de aminoácidos en las subunidades de la cápsida de AAV.

Se entenderá que el término "vector viral quimérico" o "cápsida quimérica" excluye aquellos vectores o cápsidas de virus que tienen los aminoácidos indicados en las posiciones especificadas en su estado nativo (por ejemplo, en el virus receptor y/o en el virus de tipo salvaje).

La invención contempla que los virus quiméricos de la invención pueden ser producidos mediante la modificación de las cápsidas de cualquier AAV ahora conocido o descubierto más adelante. Además, el AAV parental receptor que se va a modificar puede ser uno de los AAV caracterizados, por ejemplo, AAV2, AAV3a o 3b, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9, AAV10 o AAV11 (véase también la Tabla 1). Alternativamente, el virus parental receptor ya puede tener modificaciones o alteraciones en comparación con los virus de origen natural (es decir, se deriva de un AAV de tipo salvaje, por ejemplo, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV 10 y/o AAV11 o cualquier otro AAV ahora conocido o descubierto más adelante). Tales virus están también dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, el virus receptor puede ser un AAV que se deriva de AAV8, pero tiene un dominio de unión a sulfato de heparano (por ejemplo, de la cápsida de AAV2) incorporado en el mismo o

puede ser un AAV que se ha modificado para contener una secuencia poli-His para facilitar la purificación. Como otro ejemplo ilustrativo, el AAV se puede derivar de cualquiera de los serotipos o clados conocidos, pero tiene una secuencia diana de péptidos incorporada en el mismo. Como otra posibilidad, la cápsida de AAV puede comprender subunidades de la cápsida de serotipos diferentes. Así, en realizaciones concretas, el virus receptor comprende una cápsida de un serotipo o clado de AAV que ha sido modificado para incluir secuencias que no son las del serotipo o clado (por ejemplo, son exógenas al virus de tipo salvaje). Además, un AAV parental donador de una modificación que se va a transferir a un receptor puede ser uno de los AAV caracterizados, por ejemplo, AAV2, AAV3a o 3b, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9, AAV10 o AAV11, pero no está tan limitado.

En realizaciones representativas, la invención proporciona un vector viral quimérico que comprende: (a) una cápsida de AAV quimérica que comprende una inserción selectiva de aminoácido después de cualquiera de las posiciones de los aminoácidos 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267 y/o 268 (por ejemplo, después de la posición de aminoácido 264) en una o más de las subunidades de la cápsida de AAV2 (numeración VP1) o un cambio correspondiente en una o más subunidades de la cápsida de otro AAV, y (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia repetida terminal de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga; donde el ácido nucleico está empaquetado dentro de la cápsida de AAV quimérica. En realizaciones concretas, el vector viral quimérico tiene transducción o tropismo intensificados, un perfil inmunológico alterado, una expresión del transgén intensificada y/o un inicio más temprano de la expresión del transgén en comparación con el vector de AAVr parental receptor y/o un vector de AAVr parental donador. Por "después de la posición del aminoácido X" se pretende que la inserción siga inmediatamente a la posición de aminoácido indicada (por ejemplo, "después de la posición de aminoácido 264" indica un punto de inserción en la posición 265 o una inserción más grande, por ejemplo, desde las posiciones 265 a 268, etc.) o está dentro de dos o tres aminoácidos de la posición de aminoácido indicada.

La designación de todas las posiciones de aminoácidos en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas es con respecto a la numeración de VP1. Los expertos en la técnica entenderán que las modificaciones descritas en la presente memoria pueden dar como resultado modificaciones en todas las subunidades de la cápsida de VP1, VP2 y VP3. En realizaciones concretas, las modificaciones de la invención se encuentran en una, dos o tres de las subunidades de la cápsida de AAV.

Los expertos en la técnica apreciarán que para algunos AAV la modificación correspondiente será una inserción y/o una sustitución, dependiendo de si las posiciones de aminoácidos correspondientes están presentes parcial o completamente en el virus o, alternativamente, están completamente ausentes. Asimismo, cuando se modifica un AAV que no sea AAV2, la posición o posiciones específicas de los aminoácidos pueden ser diferentes de la posición en AAV2. La posición o posiciones de los aminoácidos correspondientes serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica utilizando mecanismos bien conocidos de alineamiento de secuencias (véase, por ejemplo, la **Figura 7**).

En realizaciones concretas, las modificaciones descritas en la presente memoria se pueden introducir en la subunidad o subunidades de la cápsida en la posición que corresponde a la posición o posiciones de los aminoácidos de interés en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV1, AAV6 y/o AAV7 o cualquier otro AAV del que se derive la modificación. Basándose en el análisis de la estructura cristalina, resultará evidente que en algunos casos la inserción/sustitución se puede mover 1, 2, 3, 4 o 5 o incluso más aminoácidos en cualquier dirección y todavía conferir la característica deseada. Debido a que se realizan muchas de las modificaciones en las estructuras del bucle, los expertos en la técnica entenderán que el resultado de la modificación se puede impulsar más por la presentación física sobre la superficie del virión que por la posición del aminoácido específico.

Los aminoácidos que se van a sustituir y/o insertar de acuerdo con la presente invención pueden ser aminoácidos de origen natural, formas modificadas de los mismos, o aminoácidos sintéticos cualesquiera.

En realizaciones representativas, la inserción y/o sustitución y/o delección de la subunidad o subunidades de la cápsida dan como resultado la inserción, sustitución y/o reposición de un aminoácido que mantiene la estructura de bucle hidrófilo en esa región y/o un aminoácido que altera la configuración de la estructura de bucle, un aminoácido cargado, o un aminoácido que puede ser fosforilado o sulfatado o adquiere de otro modo una carga por modificación post-traduccional (por ejemplo, glicosilación) después de cualquiera de las posiciones de aminoácido 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267 y/o 268 (por ejemplo, después de la posición 264) en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV. En realizaciones concretas, el vector viral quimérico tiene una transducción intensificada para uno o más tipos de células en comparación con el vector de AAVr parental receptor y/o un vector de AAVr parental donador. Los aminoácidos adecuados incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, asparragina, o glutamina. En realizaciones concretas, se inserta o se sustituye una treonina en la subunidad de la cápsida.

De acuerdo con este aspecto de la invención, en realizaciones concretas el vector viral quimérico comprende una cápsida de AAV quimérica que comprende una inserción de aminoácido después de la posición del aminoácido 264 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2, AAV3a o AAV3b o en la posición correspondiente en una cápsida de AAV2, AAV3a o AAV3b que ha sido modificada para incluir secuencias que no

sean de AAV2, AAV3a o AAV3b, respectivamente (es decir, se deriva de AAV2, AAV3a o AAV3b). El aminoácido correspondiente a la posición 264 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 (o AAV3a o AAV3b) será fácilmente identificable en el virus de partida que se ha derivado de AAV2 (o AAV3a o AAV3b), que luego se puede modificar adicionalmente de acuerdo con la presente invención.

5 En realizaciones concretas, los vectores virales quiméricos pueden comprender una cápsida de AAV2, AAV3a o AAV3b quimérica que comprende una inserción de aminoácidos después de la posición de aminoácido 264 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2, AAV3a o AAV3b. Las inserciones de aminoácidos adecuadas se han descrito anteriormente. Los ejemplos ilustrativos de las mutaciones correspondientes en otro AAV se muestran en la **Tabla 2** (Posición 2). Las sustituciones y las inserciones de aminoácidos son las descritas anteriormente. En realizaciones concretas, la inserción o sustitución es una treonina (exceptuando AAV1, AAV6 y otro AAV que tengan una treonina en esta posición).

Tabla 2

Serotipo	Posición 1	Posición 2
AAV1	A263X	T265X
AAV2	Q263X	-265X
AAV3a	Q263X	-265X
AAV3b	Q263X	-265X
AAV4	S257X	-259X
AAV5	G253X	V255X
AAV6	A263X	T265X
AAV7	E264X	A266X
AAV8	G264X	S266X
AAV9	S263X	S265X

Donde, (X) → mutación a cualquier aminoácido
 (-) → inserción de cualquier aminoácido

Nota: Las inserciones en la posición 2 están indicadas por el sitio de inserción

15 La invención proporciona adicionalmente vectores virales quiméricos que comprenden una cápsida de AAV quimérica que comprende una o más inserciones y/o sustituciones selectivas de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) una inserción selectiva de aminoácidos después de cualquier posición del aminoácido 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267 y/o 268 (por ejemplo, después de la posición de aminoácido 264) en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV;

20 (b) una sustitución selectiva de aminoácido en un aminoácido de la posición 260 a 266 (por ejemplo, la posición 263) en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV;

(c) una sustitución selectiva de aminoácido en la posición del aminoácido 705 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV;

25 (d) una sustitución selectiva de aminoácido en la posición del aminoácido 708 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV;

(e) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 716 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV;

(f) una sustitución selectiva de aminoácidos en un aminoácido de la posición 447 a 453 (por ejemplo, la posición 450) en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV, y

5 (g) una sustitución selectiva de aminoácidos en un aminoácido de la posición 454 a 460 (por ejemplo, la posición 457) en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV.

Estas modificaciones se pueden utilizar solas o combinándolas de cualquier manera entre sí o combinándolas de cualquier manera con cualquiera de las otras modificaciones descritas en la presente memoria.

10 En realizaciones concretas, el vector viral quimérico tiene una transducción intensificada, una expresión del transgén aumentada, un inicio más temprano de expresión del transgén y/o un perfil inmunológico alterado en comparación con el vector de AAVr parental receptor y/o un vector de AAVr parental donador.

15 En realizaciones representativas, el vector viral quimérico comprende una cápsida de AAV2 quimérica que comprende una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 263 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o en la posición correspondiente en una cápsida AAV2 que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2. Alternativamente, el vector viral quimérico puede comprender una cápsida de AAV3b quimérica que comprende una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 263 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV3b o en la posición correspondiente en una cápsida de AAV3b que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV3b.

20 Se pueden realizar las modificaciones correspondientes en otro AAV. Por ejemplo, en otras realizaciones, la sustitución es en la posición del aminoácido 263 de AAV1, una sustitución en la posición del aminoácido 263 en AAV3a o AAV3b, o en la posición o posiciones correspondientes en una cápsida de AAV de cualquiera de los serotipos anteriores que se ha modificado para incluir secuencias exógenas. Los ejemplos no limitantes de las mutaciones correspondientes se muestran en la **Tabla 2** (Posición 1). Las sustituciones de aminoácidos adecuadas se describen a continuación. En realizaciones concretas, una alanina está sustituida en la subunidad o subunidades de la cápsida en la posición indicada (exceptuando AAV1 y AAV6 y otro AAV que tengan una alanina en esta posición).

30 Las sustituciones de aminoácidos adecuadas incluyen, pero no se limitan a las sustituciones de pequeños aminoácidos no polares tales como alanina, glicina, valina, leucina o isoleucina o incluso prolina, asparragina, serina o treonina en las subunidades de la cápsida (por ejemplo, la sustitución de estos aminoácidos por la glutamina encontrada en la posición 263 en las subunidades de la cápsida de AAV2, AAV3a o AAV3b). En realizaciones concretas, se sustituye una alanina en la subunidad o subunidades de la cápsida.

35 Otro vector viral quimérico de la invención comprende una cápsida de AAV2 quimérica que comprende una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 705 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o en la posición correspondiente en una subunidad de la cápsida de AAV2 que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2.

40 Se pueden realizar los cambios correspondientes en otro AAV. Por ejemplo, en otras realizaciones, la invención proporciona un vector viral quimérico que tiene una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 706 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV1, una sustitución en la posición del aminoácido 706 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV3a, una sustitución en la posición del aminoácido 706 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV3, una sustitución en la posición del aminoácido 707 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV7, una sustitución en la posición del aminoácido 708 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV8, o una la sustitución en la posición del aminoácido 706 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV9; o en la posición o posiciones correspondientes en una cápsida AAV de cualquiera de los serotipos anteriores que se ha modificado para incluir secuencias exógenas o en la posición o posiciones correspondientes de cualquier otro AAV.

50 En realizaciones representativas de la invención descritas en los dos párrafos anteriores, las sustituciones de aminoácidos adecuadas incluyen, pero no se limitan a las sustituciones de serina, treonina, tirosina, prolina, glutamina, alanina, glicina, valina, leucina o isoleucina (por ejemplo, sustituidas por la asparragina en esta posición en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2). En realizaciones concretas, la alanina se sustituye en la subunidad o subunidades de la cápsida.

Un vector viral quimérico adicional de acuerdo con la invención comprende una cápsida de AAV2 quimérica que comprende una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 708 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o en la posición correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 que han sido modificadas para incluir secuencias que no son de AAV2.

55 Se pueden realizar las modificaciones correspondientes en otro AAV. En algunas realizaciones, la invención proporciona un vector viral quimérico que tiene una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 709 de

una o varias subunidades de la cápsida de AAV1, una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 709 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV3a, un sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 709 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV3, una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 710 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV7, una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 711 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV8, o una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 709 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV9, o en la posición correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de AAV de cualquiera de los AAV anteriores que ha sido modificado para incluir secuencias exógenas o en una posición correspondiente en cualquier otro AAV.

En realizaciones representativas de la invención descritas en los dos párrafos anteriores, la sustitución da como resultado una sustitución de serina, treonina, tirosina, prolina, asparragina, glutamina, alanina, glicina, leucina o isoleucina en la subunidad o subunidades de la cápsida (por ejemplo, por la valina en esta posición en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2). Una sustitución ilustrativa es una sustitución de alanina en la subunidad o subunidades de la cápsida.

La invención también proporciona un vector viral quimérico que comprende una cápsida de AAV2 quimérica que comprende una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 716 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o en la posición correspondiente en una cápsida AAV2 que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2.

Se pueden realizar las modificaciones correspondientes en otro AAV. En realizaciones concretas, la invención proporciona un vector viral quimérico que tiene una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 717 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV1, una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 717 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV3a, un sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 717 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV3, una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 718 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV7, una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 719 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV8, o una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 717 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV9, o en la posición correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de AAV de cualquiera de los AAV anteriores que ha sido modificado para incluir secuencias exógenas o en la posición correspondiente en cualquier otro AAV.

En aspectos concretos de las realizaciones descritas en los dos párrafos anteriores, la sustitución es una sustitución de un aminoácido que no puede ser fosforilado por un aminoácido que puede ser fosforilado (por ejemplo, treonina). Alternativamente, la sustitución puede ser una sustitución de una serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, valina, leucina, isoleucina, asparragina o glutamina en la subunidad de la cápsida (por ejemplo, la sustitución de la treonina en esta posición en AAV2). Un virus quimérico concreto comprende una asparragina sustituida en esta posición en la subunidad o subunidades de la cápsida.

Un vector viral quimérico adicional de acuerdo con la invención es un vector viral quimérico que comprende una cápsida de AAV2 quimérica que comprende una sustitución de aminoácido en cualquiera de las posiciones de los aminoácidos 447, 448, 449, 450, 451, 452 y/o 453 (por ejemplo, en la posición 450) en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o en la posición correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2 o en la posición correspondiente de cualquier otro AAV. En realizaciones concretas, la sustitución es una sustitución de un aminoácido que no puede ser fosforilado por un aminoácido que puede ser fosforilado (por ejemplo, treonina). Alternativamente, la sustitución puede ser una sustitución de una serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, valina, leucina, isoleucina, asparragina o glutamina en la subunidad de la cápsida (por ejemplo, la sustitución de la treonina en la posición 450 en AAV2). Un virus quimérico concreto comprende una asparragina sustituida en esta posición en las subunidades de la cápsida.

También se proporciona un vector viral quimérico que comprende una cápsida de AAV2 quimérica que comprende una sustitución de aminoácido en cualquiera de las posiciones de los aminoácidos 454, 455, 456, 457, 458, 459 y/o 460 (por ejemplo, en la posición 457) en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o en la posición correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2 o en la posición correspondiente de cualquier otro AAV. Las sustituciones de aminoácidos adecuados incluyen la sustitución de una glicina, alanina, valina, lisina, isoleucina, prolina, serina, treonina o asparragina en la subunidad o subunidades de la cápsida. En realizaciones representativas, se sustituye una asparragina en la subunidad de la cápsida (por ejemplo, una asparragina es sustituida por la glutamina encontrada en la posición 457 en las subunidades de la cápsida de AAV2).

Un ejemplo no limitante de un vector viral quimérico de la invención comprende: (a) una cápsida de AAV quimérica (por ejemplo, la cápsida de AAV2) que comprende: (i) una inserción selectiva de aminoácido después de la posición del aminoácido 264 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV, y (ii) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 263 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en la subunidad o subunidades de la cápsida de otro AAV, y (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia TR de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga; donde el ácido nucleico está empaquetado dentro de la cápsida

de AAV quimérica. En realizaciones concretas, el virus quimérico tiene una transducción intensificada, una expresión del transgén intensificada, una expresión del transgén más temprana y/o un perfil inmunológico alterado en comparación con el vector de AAVr parental receptor y/o un vector de AAVr parental donador. Por ejemplo, el vector viral quimérico puede comprender una cápsida AAV2, AAV3a o AAV3b quimérica en la que se ha insertado una treonina después de la posición del aminoácido 264 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o AAV3b y una alanina ha sido sustituida por glutamina en la posición del aminoácido 263 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2, AAV3a o AAV3b; o estos cambios pueden realizarse en las posiciones correspondientes en una cápsida de AAV2, AAV3a o AAV3b que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2, de AAV3a o de AAV3b, respectivamente, o en las posiciones correspondientes en cualquier otro AAV. La secuencia de la variante 263, 265 descrita en la presente memoria se muestra en los fondos de AAV2 (**Figura 9**) y AAV3b (**Figura 10**) y se compara con la secuencia del virus parental receptor.

Otro vector viral quimérico ilustrativo de la invención comprende (a) una cápsida de AAV quimérica por ejemplo, (una cápsida de AAV2) que comprende: (i) una inserción selectiva de aminoácidos después de la posición del aminoácido 264 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV, y (ii) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 263 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en la subunidad o subunidades de la cápsida de otro AAV, (iii) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 705 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en la subunidad o subunidades de la cápsida de otro AAV, (iv) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 708 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en la subunidad o subunidades de la cápsida de otro AAV, y (v) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 716 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en subunidad o subunidades de la cápsida de otro AAV, y (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia TR de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga; donde el ácido nucleico está empaquetado dentro de la cápsida de AAV quimérica. En realizaciones concretas, el virus quimérico tiene una transducción intensificada, una expresión del transgén intensificada, una expresión más temprana del transgén y/o un perfil inmunológico alterado en comparación con el vector de AAVr receptor y/o un vector de AAVr parental donador.

De acuerdo con esta realización, el vector viral quimérico puede comprender una cápsida de AAV quimérica (por ejemplo, la cápsida de AAV2) que comprende:

(a) una inserción de treonina después de la posición del aminoácido 264 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2;

(b) una alanina para la sustitución de glutamina en la posición del aminoácido 263 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2;

(c) una alanina para la sustitución de asparragina en la posición 705 del aminoácido en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2;

(d) una alanina para la sustitución de valina en la posición del aminoácido 708 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2, y

(e) una asparragina para la sustitución de treonina en la posición del aminoácido 716 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2;

o estos cambios se pueden realizar en las posiciones correspondientes en una cápsida AAV2 que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2 o en las posiciones correspondientes en otro AAV.

En realizaciones concretas, el vector viral quimérico puede ser la variante quimérica 2.5 descrita en la presente memoria. La secuencia del mutante 2.5 en comparación con AAV2 se muestra en la **Figura 11**.

La invención proporciona adicionalmente un vector viral quimérico que comprende:

(a) una cápsida de AAV quimérica (por ejemplo, la cápsida de AAV2) que comprende:

(i) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 450 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV, y

(ii) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 457 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV, y

(b) un ácido nucleico que comprende una secuencia TR de AAV y una secuencia de ácido nucleico heteróloga; donde el ácido nucleico está empaquetado dentro de la cápsida de AAV quimérica.

En realizaciones concretas, el vector viral quimérico tiene una transducción intensificada, una expresión del transgén intensificada, una expresión más temprana del transgén y/o un perfil inmunológico alterado en comparación con el vector del virus parental receptor y/o un vector de AAVr parental donador.

5 De acuerdo con realizaciones concretas, una cápsida de AAV2 quimérica comprende (i) una asparragina para la sustitución de treonina en la posición del aminoácido 450 en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2, y (ii) una asparragina por glutamina en la posición de sustitución del aminoácido 457 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2; o estos cambios se pueden realizar en las posiciones correspondientes en una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2 o en las posiciones correspondientes de cualquier otro AAV.

10 Otro vector viral quimérico ilustrativo de la invención comprende:

(a) una cápsida de AAV quimérica (por ejemplo, la cápsida de AAV2) que comprende:

(i) una inserción selectiva de aminoácidos después de la posición del aminoácido 264 de una o varias subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV;

15 (ii) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 450 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV, y

(iii) una sustitución selectiva de aminoácidos en la posición del aminoácido 457 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una o varias subunidades de la cápsida de otro AAV, y

20 (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia TR de AAV y una secuencia de ácido nucleico heterólogo; donde el ácido nucleico está empaquetado dentro de la cápsida de AAV quimérica.

En realizaciones concretas, el vector viral quimérico tiene una transducción intensificada, una expresión del transgén intensificada, una expresión más temprana del transgén y/o un perfil inmunológico alterado en comparación con el vector del virus parental receptor y/o un vector de AAVr parental donador.

25 Según aspectos concretos de esta realización de la invención, el vector viral quimérico comprende una cápsida de AAV2 quimérica que comprende:

(a) una inserción de treonina después de la posición del aminoácido 264 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2;

(b) una asparragina para la sustitución de treonina en la posición del aminoácido 450 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2, y

30 (c) una asparragina por glutamina en la posición de sustitución de aminoácido 457 en la subunidad o subunidades de la cápsida de AAV2;

o estos cambios se pueden realizar en las posiciones correspondientes en una cápsida de AAV2 que ha sido modificada para incluir secuencias que no son de AAV2 o en las posiciones correspondientes de cualquier otro AAV.

35 Los vectores virales quiméricos de la invención comprenden generalmente un genoma de vector de AAVr, es decir, el genoma del vector de AAV comprende uno o más ácidos nucleicos heterólogos que codifican un polipéptido o un ARN no traducido. Los ácidos nucleicos heterólogos se comentan con más detalle mas adelante.

Cápsidas quiméricas.

40 La presente invención abarca además cápsidas virales quiméricas esencialmente como se ha descrito anteriormente, es decir, en ausencia de un genoma del vector de AAVr.

45 Las cápsidas virales quiméricas pueden ser utilizadas como "vehículos cápsida", como se ha descrito en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.863.541 (cuya descripción se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad). Las moléculas que pueden ser empaquetadas por las cápsidas virales quiméricas y transferidas a una célula incluyen ADN heterólogo, ARN, polipéptidos, moléculas orgánicas pequeñas, o combinaciones de los mismos. Las moléculas heterólogas se definen como aquellas que no se encuentran naturalmente en una infección por AAV, es decir, aquellas que no están codificadas por un genoma de AAV de tipo salvaje. Además, las moléculas terapéuticamente útiles pueden estar asociadas con el exterior de la cápsida viral quimérica para la transferencia de las moléculas a las células diana anfitrionas. Tales moléculas asociadas pueden incluir ADN, ARN, moléculas orgánicas pequeñas, carbohidratos, lípidos y/o polipéptidos. En una realización de la invención la molécula terapéuticamente útil está unida covalentemente (es decir, conjugada o acoplada

químicamente) a las proteínas de la cápsida. Los métodos para unir covalentemente moléculas son conocidos por los expertos en la técnica.

Las cápsidas virales quiméricas de la invención también encuentran uso en la producción de anticuerpos contra las estructuras de la cápsida novedosas. Como una alternativa adicional, se puede insertar una secuencia exógena de aminoácidos en la cápsida del parvovirus para la presentación de antígenos a una célula, por ejemplo, para la administración a un sujeto para producir una respuesta inmunitaria a la secuencia exógena de aminoácidos.

De acuerdo con algunas realizaciones, se pueden administrar cápsidas quiméricas de virus a un sujeto al mismo tiempo (por ejemplo, en cuestión de minutos u horas entre sí) con un vector de AAV o vector viral quimérico según la invención. Además, la invención proporciona composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden las cápsidas virales quiméricas de la invención y un vector de AAV o vector viral quimérico de la invención.

La invención también proporciona ácidos nucleicos (opcionalmente, ácidos nucleicos aislados) que codifican las cápsidas virales quiméricas y subunidades de la cápsida de la invención. Además se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos, y las células (in vivo o en cultivo) que comprenden los ácidos nucleicos y/o vectores de la invención. Tales ácidos nucleicos, vectores y células se pueden utilizar, por ejemplo, como reactivos (por ejemplo, constructos de empaquetamiento auxiliares o células de empaquetamiento) para la producción de cápsidas o vectores virales quiméricos como se describe en la presente memoria.

Métodos de Producción de Vectores Virales Quiméricos.

La presente invención proporciona adicionalmente métodos para producir el vector viral quimérico de la invención.

En una realización concreta, la presente invención proporciona un método para producir un vector viral quimérico recombinante, que comprende proporcionar a una célula, (a) un molde de AAVr que comprende (i) una o más secuencias de nucleótidos heterólogas, y (ii) secuencias señal de empaquetamiento suficientes para la encapsidación del molde de AAV en las partículas virales quiméricas, y (b) secuencias de AAV suficientes para la replicación y encapsidación del molde de AAVr en partículas virales quiméricas (por ejemplo, las secuencias rep y cap quiméricas de AAV que comprenden una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones selectivas de otro AAV). El molde de AAVr y las secuencias de replicación y de la cápsida de AAV se proporcionan en condiciones tales que las partículas virales recombinantes quiméricas que comprenden el molde de AAVr empaquetado dentro de la cápsida quimérica se producen en la célula. El método puede comprender además la etapa de recogida de las partículas virales de la célula. Las partículas de virus se pueden recoger del medio y/o lisando las células.

La célula es típicamente una célula que es permisiva para la replicación viral de AAV. Se puede emplear cualquier célula adecuada conocida en la técnica. Las células de mamíferos son las preferidas. También se prefieren las líneas celulares de empaquetamiento que complementan en trans que proporcionan las funciones suprimidas de un virus coadyuvante de replicación defectuosa, por ejemplo, las células 293 u otras células que complementan en trans E1a.

Las secuencias de replicación y de la cápsida de AAV pueden ser proporcionadas mediante cualquier método conocido en la técnica. Los protocolos actuales expresan típicamente los genes rep/cap de AAV en un único plásmido. No se necesita proporcionar las secuencias de replicación y de empaquetamiento de AAV juntas, aunque puede ser conveniente hacerlo. Las secuencias rep y/o cap de AAV pueden ser proporcionadas por cualquier vector viral o no viral. Por ejemplo, las secuencias rep/cap pueden ser proporcionadas por un vector de adenovirus o herpesvirus híbrido (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un vector de adenovirus sometido a deleción). Se pueden emplear también vectores de EBV para expresar los genes cap y rep de AAV. Una ventaja de este método es que los vectores de EBV son episómicos, todavía mantendrán un alto número de copias a lo largo de sucesivas divisiones celulares (es decir, están integrados de forma estable en la célula como elementos extra-cromosómicos, designados como un "episoma nuclear basado en EBV" véase Margolski, (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **158**:67).

Como alternativa adicional, las secuencias rep/cap pueden ser portadas de manera estable (episómicas o integradas) dentro de una célula.

Típicamente, y preferiblemente, las secuencias rep/cap de AAV no estarán flanqueadas por las secuencias de empaquetamiento de AAV (por ejemplo, ITR de AAV), para evitar el rescate y/o el empaquetamiento de estas secuencias.

El molde de AAVr se puede proporcionar a la célula utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el molde de AAVr puede ser suministrado por un vector no viral (por ejemplo, plásmido) o viral. En realizaciones concretas, el molde de AAVr es suministrado por un vector de herpesvirus o adenovirus (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un adenovirus sometido a deleción). Como otro ejemplo, Palombo y col., (1998) *J. Virology* **72**:5025, describen un vector de baculovirus que lleva un gen informador flanqueado por las ITR

de AAV. Los vectores de EBV se pueden emplear también para liberar el molde de AAVr, como se ha descrito anteriormente con respecto a los genes rep/cap.

En otra realización representativa, el molde de AAVr es proporcionado por un virus AAVr replicante. En otras realizaciones adicionales, un provirus de AAV está integrado de forma estable en el cromosoma de la célula.

5 Para obtener los títulos máximos de virus, se proporcionan generalmente a la célula las funciones de los virus coadyuvantes (por ejemplo, adenovirus o herpesvirus) esenciales para una infección por AAV productiva. Las secuencias de los virus coadyuvantes necesarias para la replicación de AAV son conocidas en la técnica. Típicamente, estas secuencias son proporcionadas por un vector de adenovirus o herpesvirus coadyuvante. Alternativamente, las secuencias de adenovirus o herpesvirus pueden ser proporcionadas por otro vector no viral o viral, por ejemplo, como un miniplásmido de adenovirus no infeccioso que porta todos los genes auxiliares necesarios para la producción eficiente de AAV como describen Ferrari et al., (1997) en *Nature Med.* 3:1295, y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.040.183 y 6.093.570.

15 Además, las funciones del virus coadyuvante pueden ser proporcionadas por una célula de empaquetamiento con los genes coadyuvantes integrados en el cromosoma o mantenidos como un elemento extracromosómico estable. Se prefiere que estas secuencias de virus coadyuvantes no estén empaquetadas en viriones de AAV, por ejemplo, no estén flanqueadas por ITR de AAV.

20 Los expertos en la técnica apreciarán que puede ser ventajoso proporcionar las secuencias de replicación y de la cápsida de AAV y las secuencias del virus coadyuvante (por ejemplo, secuencias de adenovirus) en un solo constructo coadyuvante. Este constructo coadyuvante puede ser un constructo no viral o viral, pero es preferiblemente un adenovirus híbrido o un herpesvirus híbrido que comprende los genes rep/cap de AAV.

En una realización preferida concreta, las secuencias rep/cap de AAV y las secuencias coadyuvantes de adenovirus son suministradas por un solo vector coadyuvante de adenovirus. Este vector contiene además el molde de AAVr. Las secuencias rep/cap de AAV y/o el molde de AAVr pueden ser insertados en una región suprimida (por ejemplo, las regiones E1a o E3) del adenovirus.

25 En una realización adicional, las secuencias rep/cap de AAV y las secuencias coadyuvantes de adenovirus son suministradas por un solo vector coadyuvante de adenovirus. El molde de AAVr se proporciona como un molde de plásmido.

30 En otra realización ilustrativa, las secuencias rep/cap de AAV y las secuencias coadyuvantes de adenovirus son proporcionadas por un solo vector coadyuvante de adenovirus, y el molde de AAVr está integrado en la célula como un provirus. Alternativamente, el molde de AAVr es proporcionado por un vector de EBV que se mantiene dentro de la célula como un elemento extracromosómico (por ejemplo, como un episoma nuclear basado en EBV).

35 En una realización ejemplar adicional, las secuencias rep/cap de AAV y las secuencias coadyuvantes de adenovirus son proporcionadas por un solo adenovirus coadyuvante. El molde de AAVr se proporciona como un vector viral de replicación separada. Por ejemplo, el molde de AAVr puede ser proporcionado por una partícula de AAVr o una segunda partícula de adenovirus recombinante.

40 De acuerdo con los métodos anteriores, el vector de adenovirus híbrido comprende típicamente secuencias del adenovirus *cis* 5' y 3' suficientes para la replicación y el empaquetamiento del adenovirus (es decir, las repeticiones terminales de adenovirus y la secuencia PAC). Las secuencias rep/cap de AAV y, si está presente, el molde de AAVr están incrustados en el esqueleto del adenovirus y están flanqueados por las secuencias *cis* 5' y 3', de modo que estas secuencias pueden ser empaquetadas en cápsidas de adenovirus. Como se describió anteriormente, se prefiere que las secuencias coadyuvantes de adenovirus y las secuencias rep/cap de AAV no estén flanqueadas por las secuencias de empaquetamiento de AAV (por ejemplo, las ITR de AAV), de modo que estas secuencias no se empaqueten en los viriones de AAV.

45 Los herpesvirus también se pueden utilizar como un virus coadyuvante en los métodos de empaquetamiento de AAV. Los herpesvirus híbridos que codifican la proteína o proteínas Rep de AAV pueden facilitar ventajosamente esquemas para la producción de vectores de AAV más modulables. Se ha descrito un vector de virus herpes simplex de tipo I (HSV-1) híbrido que expresa los genes rep y cap de AAV-2 (Conway et al., (1999) *Gene Therapy* 6:986 y documento WO 00/17377, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria en su totalidad).

50 Como alternativa adicional, los vectores de virus de la invención pueden ser producidos en células de insecto utilizando vectores de baculovirus para liberar los genes *rep/cap* y el molde de AAVr como describen por Urabe et al., (2002) en *Human Gene Therapy* 13:1935-43.

Otros métodos de producción de AAV utilizan células de empaquetamiento transformadas establemente (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos Núm. 5.658.785).

Se pueden obtener provisiones de partida de vectores de AAV sin virus coadyuvantes contaminantes por medio de cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los virus AAV y coadyuvante se pueden diferenciar fácilmente en función del tamaño. El AAV también se puede separar del virus coadyuvante basado en la afinidad por un sustrato de heparina (Zolotukhin et al. (1999) *Gene Therapy* 6:973). Preferiblemente, se utilizan los virus coadyuvantes de replicación defectuosa sometidos a delección de modo que cualquier virus coadyuvante contaminante no sea de replicación competente. Como una alternativa adicional, se puede emplear un adenovirus coadyuvante que carezca de expresión génica tardía, puesto que sólo se requiere la expresión génica temprana del adenovirus para mediar en el empaquetamiento del virus AAV. Se conocen en la técnica mutantes de adenovirus con expresión génica tardía defectuosa (por ejemplo, los mutantes de adenovirus ts100K y ts149).

Los métodos de empaquetamiento de la invención se pueden emplear para producir provisiones de partida con títulos altos de partículas virales químéricas. Preferiblemente, la provisión de partida de virus tiene un título de al menos aproximadamente 10^5 unidades de transducción (UT)/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 10^6 UT/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 10^7 UT/ml, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 10^8 UT/ml, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 10^9 UT/ml, siendo aún más preferible al menos aproximadamente 10^{10} UT/ml.

Vectores de Parvovirus Recombinantes.

Los vectores de parvovirus de la presente invención son útiles para la liberación de ácidos nucleicos a las células *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*. En particular, los vectores de parvovirus se puede emplear ventajosamente para liberar o transferir ácidos nucleicos a animales, más preferiblemente a células de mamífero.

Se pueden liberar una o varias secuencias de nucleótidos heterólogas cualesquiera (como se ha definido anteriormente) en los vectores virales quiméricos de la presente invención. Los ácidos nucleicos de interés incluyen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos, preferiblemente polipéptidos terapéuticos (por ejemplo, para usos médicos o veterinarios) o inmunogénicos (por ejemplo, para vacunas).

Los polipéptidos terapéuticos incluyen, pero no están limitados a, la proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), la distrofina (incluyendo el producto proteico de los mini-genes de distrofina, véanse, por ejemplo, Vincent et al. (1993). *Nature Genetics* 5:130; Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2003017131, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria en su totalidad como referencia), la utrofina (Tinsley et al., (1996) *Nature* 384:349), los factores de coagulación (por ejemplo, el Factor VIII, el Factor IX, el Factor X, etc), la eritropoyetina, la angiostatina, la endostatina, la catalasa, la tirosina hidroxilasa, la superóxido dismutasa, la leptina, el receptor de LDL, la neprilisina, la lipoproteína lipasa, la ornitina transcarbamilasa, la β -globina, la α -globina, la espectrina, la antitripsina α_1 , la adenosina desaminasa, la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, la β -glucocerebrosidasa, la esfingomielinasa, la hexosaminidasa A lisosómica, la cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, la proteína RP65, citoquinas (por ejemplo, interferón α , interferón β , interferón γ , interleuquinas 1 a 14, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, linfotoxina, y similares), los factores de crecimiento peptídicos, los factores neurotróficos y las hormonas (por ejemplo, somatotropina, insulina, factores de crecimiento de tipo insulínico, incluyendo IGF-1 e IGF-2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico 3 y 4, factor neurotrófico derivado de cerebro, factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento transformante α y β , y similares), las proteínas morfogénicas del hueso (incluyendo RANKL y VEGF), las proteínas lisosómicas, los productos génicos anti-apoptóticos, los receptores de glutamato, las linfoquinas, el CD4 soluble, los receptores de Fc, los receptores de células T, la ApoE, la ApoC, el inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (I-1), el fosfolambano, la serca2a, la α -glucosidasa ácida lisosómica, la α -galactosidasa A, la barkct, el receptor adrenérgico β_2 , la quinasa del receptor adrenérgico β_2 (BARK), la fosfoinositido-3-quinasa (quinasa PI3), la calscarina, un sarcoglicano (por ejemplo, α , β , γ), los receptores (por ejemplo, el receptor soluble del factor de crecimiento de necrosis tumoral α), factores anti-inflamatorios, tales como IRAP, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de cadena sencilla, un Mab ilustrativo es el Mab herceptina). Otras secuencias de nucleótidos heterólogas ilustrativas codifican productos de genes suicidas (por ejemplo, timidina quinasa, citosina desaminasa, toxina de la difteria, y factores de necrosis tumoral tales como TNF- α), proteínas que confieren resistencia a un fármaco utilizado en la terapia del cáncer, productos génicos supresores de tumores (por ejemplo, p53, Rb, WT-1), TRAIL, ligando FAS, y cualquier otro polipéptido que tenga un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesite.

Las secuencias de nucleótidos heterólogas que codifican polipéptidos incluyen aquellos que codifican polipéptidos informadores (por ejemplo, una enzima). Los polipéptidos informadores son conocidos en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, la proteína fluorescente verde, la β -galactosidasa, la fosfatasa alcalina, la luciferasa, y el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa.

Alternativamente, el ácido nucleico heterólogo puede codificar un ácido nucleico antisentido, una ribozima (por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.877.022), los ARN que efectúan el empalme en trans mediado por el espliceosoma (véase, Puttaraju et al., (1999) *Nature Biotech.* 17:246; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.013.487; la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.083.702), el ARN de interferencia (ARNi), incluidos los ARN de interferencia cortos (ARNic) que median en el silenciamiento de genes (véase, Sharp et

al, (2000). *Science* **287**: 2431) u otros ARN no traducidos, tales como los ARN "guía" (Gorman et al, (1998). *Proc Nat Acad Sci USA* **95**:4929; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.869.248 de Yuan y col.), y similares. Los ejemplos de los ARN no traducidos incluyen ARNi contra el producto del gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR), (por ejemplo, para el tratamiento de tumores y/o para la administración al corazón para prevenir los daños causados por la quimioterapia), el ARNi contra la miostatina (distrofia muscular de Duchenne), para tratar o ARNi contra VEGF (por ejemplo, para el tratamiento de tumores).

El vector de parvovirus puede comprender también una secuencia de nucleótidos heteróloga que comparte homología y se recombina con un locus en el cromosoma del anfitrión. Este enfoque puede ser utilizado para corregir un defecto genético en la célula anfitriona.

La presente invención también proporciona vectores de parvovirus que expresan un polipéptido inmunogénico, p. ej., para la vacunación. El ácido nucleico puede codificar cualquier inmunógeno de interés conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, inmunógenos del virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la influenza, proteínas gag, antígenos tumorales, antígenos cancerosos, antígenos bacterianos, antígenos virales, y similares.

El uso de parvovirus como vacunas es conocido en la técnica (véase, p. ej., Miyamura et al., (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 91:8507; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.916.563 de Young et al., 5.905.040 de Mazzara et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 5.882.652, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.863.541 de Samulski et al.; cuyas descripciones se incorporan a la presente en su totalidad como referencia). El antígeno se puede presentar en la cápsida de parvovirus. Alternativamente, el antígeno puede ser expresado en forma de un ácido nucleico heterólogo introducido en un genoma del vector recombinante.

Un polipéptido inmunogénico, o inmunógeno, puede ser cualquier polipéptido adecuado para proteger al sujeto de una enfermedad, incluyendo pero no limitada a enfermedades microbianas, bacterianas, protozoicas, parasíticas, fúngicas y virales. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un inmunógeno de ortomixovirus (p. ej., un inmunógeno del virus de la influenza, tal como la proteína de superficie hemaglutinina (HA) de virus de la influenza o el gen de la nucleoproteína del virus de la influenza, o un inmunógeno del virus de la influenza equina), o un inmunógeno de lentivirus (p. ej., un inmunógeno del virus de la anemia infecciosa equina, un inmunógeno del Virus de la Inmunodeficiencia de Simios (SIV), o un inmunógeno del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), tal como la proteína GP160 de la envoltura de HIV o SIV, las proteínas de la matriz/cápsida de HIV o SIV, y los productos de los genes gag, pol y env de HIV o SIV). El inmunógeno también puede ser un inmunógeno de arnavirus (p. ej., inmunógeno del virus de la fiebre de Lassa, tal como el gen de la proteína de la nucleocápsida del virus de la fiebre de Lassa y el gen de la glicoproteína de la envoltura de la fiebre de Lassa), un inmunógeno de poxvirus (p. ej., vaccinia, tal como los genes L1 o L8 de vaccinia), un inmunógeno de flavivirus (p. ej., un inmunógeno del virus de la fiebre amarilla o un inmunógeno del virus de la encefalitis Japonesa), un inmunógeno de filovirus (p. ej., un inmunógeno del virus Ebola, o un inmunógeno del virus Marburg, tal como los genes NP y GP), un inmunógeno de bunyavirus (p. ej., los virus RVFV, CCHF, y SFS), o un inmunógeno de coronavirus (p. ej., un inmunógeno de coronavirus humano infeccioso, tal como el gen de la glicoproteína de la envoltura de coronavirus humano, o un inmunógeno del virus de la gastroenteritis transmisible porcina, o un inmunógeno del virus de la bronquitis aviar infecciosa). El inmunógeno puede ser adicionalmente un inmunógeno de la polio, un inmunógeno del herpes (p. ej., inmunógenos de CMV, EBV, HSV), inmunógeno de las paperas, inmunógeno del sarampión, inmunógeno de la rubéola, toxina de la difteria u otro inmunógeno de la difteria, antígeno de pertussis, inmunógeno de la hepatitis (p. ej., hepatitis A, hepatitis B o hepatitis C), o cualquier otro inmunógeno para vacunas conocido en la técnica.

Alternativamente, el inmunógeno puede ser cualquier antígeno de célula tumoral o cancerosa. Preferiblemente, el antígeno tumoral o canceroso se expresa sobre la superficie de la célula cancerosa. Los antígenos de las células cancerosas y tumorales ilustrativos son descritos por S.A. Rosenberg, (1999) *Immunity* 10:281). Otros antígenos cancerosos y tumorales ilustrativos incluyen, pero no están limitados a: producto del gen BRCA1, producto del gen BRCA2, gp100, tirosinasa, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β -catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE, SART-1, PRAME, p15, antígenos tumorales de melanoma (Kawakami et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3515; Kawakami et al., (1994) *J. Exp. Med.*, 180:347; Kawakami et al., (1994) *Cancer Res.* 54:3124) incluyendo MART-1 (Coulie et al., (1991) *J. Exp. Med.* 180:35), gp100 (Wick et al., (1988) *J. Cutan. Pathol.* 4:201) y antígeno MAGE, MAGE-1, MAGE-2 y MAGE-3 (Van der Bruggen et al., (1991) *Science*, 254:1643); CEA, TRP-1, TRP-2, P-15 y tirosinasa (Brichard et al., (1993) *J. Exp. Med.* 178:489); producto del gen HER-2/neu (Patente de los Estados Unidos Núm. 4,968,603), CA 125, LK26, FB5 (endosialina), TAG 72, AFP, CA19-9, NSE, DU-PAN-2, CA50, SPan-1, CA72-4, HCG, STN (antígeno sialil Tn), proteínas c-erbB-2, PSA, L-CanAg, receptor de estrógeno, globulina de grasa de leche, proteína supresora de tumores p53 (Levine, (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:623); antígenos de mucina (Publicación de patente internacional WO 90/05142); telomerasas; proteínas de la matriz nuclear; fosfatasa ácida prostática; antígenos del virus del papiloma; y antígenos asociados con los siguientes cánceres: melanomas, adenocarcinoma, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, linfoma no Hodgkin, linfoma Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer pancreático y otros (véase, p. ej., Rosenberg, (1996) *Ann. Rev. Med.* 47:481-91).

Alternativamente, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar cualquier polipéptido que sea producido deseablemente en una célula *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. Por ejemplo, los vectores de parvovirus pueden ser introducidos en células cultivadas y el producto génico expresado puede ser aislado de allí.

5 Los expertos en la técnica comprenderán que las secuencias de nucleótidos heterólogas de interés pueden asociarse operablemente con secuencias de control apropiadas. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo puede asociarse operablemente con elementos de control de la expresión, tales como señales de control de la transcripción/traducción, orígenes de replicación, señales de poliadenilación, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), promotores, intensificadores, y similares.

10 Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden utilizar una variedad de elementos promotores/intensificadores dependiendo del nivel y de la expresión específica del tejido deseado. El promotor/intensificador puede ser constitutivo o inducible, dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor/intensificador puede ser nativo o foráneo y puede ser una secuencia natural o sintética. Por foráneo, se quiere significar que la región de inicio de la transcripción no se encuentra en el anfitrión de tipo salvaje en el cual se introduce la región de inicio de la transcripción.

15 Los elementos promotores/intensificadores que son nativos para la célula diana o el sujeto que se van a tratar son los más preferidos. Asimismo se prefieren los elementos promotores/intensificadores que son nativos para la secuencia de ácido nucleico heteróloga. El elemento promotor/intensificador se selecciona de manera que funcione en las células diana de interés. También se prefieren los elementos promotores/intensificadores de mamífero. El elemento promotor/intensificador puede ser constitutivo o inducible.

20 Se prefieren los elementos de control de la expresión inducibles en aquellas aplicaciones en las que es deseable proporcionar la regulación de la expresión de las secuencias de ácido nucleico heterólogas. Los elementos promotores/intensificadores inducibles para la liberación de genes son preferiblemente elementos promotores/intensificadores específicos de los tejidos, e incluyen elementos promotores/intensificadores específicos de músculo (incluyendo músculo cardíaco, esquelético y/o liso), específicos de tejido neural (incluyendo específico de cerebro), ojo (incluyendo específico de retina y específico de córnea), específicos de hígado, específicos de médula ósea, específicos de páncreas, específicos de bazo, y específicos de pulmón. Otros elementos promotores/intensificadores inducibles incluyen elementos inducibles por hormonas e inducibles por metales. Los elementos promotores/intensificadores inducibles ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, un elemento Tet de unión/desunión ("on/off"), un promotor inducible RU486, un promotor inducible por ecdisona, un promotor inducible por rapamicina, y un promotor de metalotioneína.

30 En las realizaciones en las que las secuencias de ácido nucleico heterólogas serán transcritas y después traducidas en las células diana, generalmente se requieren señales de inicio específicas para la traducción eficaz de las secuencias codificantes de proteínas insertadas. Estas secuencias de control de la traducción exógenas, que pueden incluir el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes, pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.

Tecnología de Transferencia de Genes.

40 Los vectores de parvovirus de acuerdo con la presente invención también proporcionan un método para liberar secuencias de nucleótidos heterólogas en una amplia gama de células, incluyendo células en división y células que no se están dividiendo. Los vectores de parvovirus se pueden emplear para liberar una secuencia de nucleótidos de interés en una célula *in vitro*, p. ej., para producir un polipéptido *in vitro* o para la terapia génica *ex vivo*. Los vectores son adicionalmente útiles en un método de liberación de una secuencia de nucleótidos en un sujeto que lo necesita, p. ej., para expresar un polipéptido inmunogénico o terapéutico. De esta manera, el polipéptido puede ser producido *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede necesitar el polipéptido debido a que el sujeto tiene una carencia del polipéptido, o debido a que la producción del polipéptido en el sujeto puede conferir cierto efecto terapéutico como método de tratamiento o de otro modo, y como se explica adicionalmente más abajo.

45 En general, los vectores de parvovirus de la presente invención se pueden emplear para liberar cualquier ácido nucleico foráneo con un efecto biológico para tratar o aliviar los síntomas asociados con cualquier trastorno relacionado con la expresión génica. Alternativamente, se puede utilizar la invención para tratar cualquier dolencia para la cual resulte beneficioso liberar un polipéptido terapéutico. Las dolencias ilustrativas incluyen, pero no están limitadas a: fibrosis quística (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística) y otras enfermedades del pulmón, hemofilia A (Factor VIII), hemofilia B (Factor IX), talasemia (β -globina), anemia (eritropoyetina) y otros trastornos de la sangre, enfermedad de Alzheimer (GDF; nepriliasina), esclerosis múltiple (interferón β), enfermedad de Parkinson (factor neurotrófico derivado de líneas de células gliales [GDNF]), enfermedad de Huntington (ARNi para eliminar repeticiones), esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia (galanina, factores neurotróficos), y otros trastornos neurológicos, cáncer (endostatina, angiostatina, TRAIL, ligando FAS, citoquinas incluyendo interferones; ARNi incluyendo ARNi contra VEGF o el producto génico de resistencia a múltiples fármacos), diabetes melitus (insulina), distrofias musculares incluyendo Duchenne (distrofina, mini-distrofina, factor de crecimiento I de tipo insulínico, un sarcoglicano [p. ej., α , β , γ], ARNi contra miostatina) y enfermedad de Becker, de Gaucher

(glucocerebrosidasa), enfermedad de Hurler (α -L-iduronidasa), carencia de adenosina desaminasa (adenosina desaminasa), enfermedades de almacenamiento de glicógeno (p. ej., enfermedad de Fabry [α -galactosidasa] y enfermedad de Pompe [α -glucosidasa ácida lisosómica]) y otros defectos metabólicos, enfisema congénito (α -antitripsina), Síndrome de Lesch-Nyhan (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa), enfermedad de Niemann-Pick (esfingomielinasa), enfermedad de Tays Sachs (hexosaminidasa A lisosómica), Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce (deshidrogenasa cetoácida de cadena ramificada), enfermedades degenerativas de la retina (y otras enfermedades del ojo y la retina; p. ej., PDGF para la degeneración macular), enfermedades de órganos sólidos tales como cerebro (incluyendo enfermedad de Parkinson [GDNF], astrocitomas [endostatina, angiostatina y/o ARNi contra VEGF], glioblastomas [endostatina, angiostatina y/o ARNi contra VEGF]), hígado, riñón, corazón incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad de arterias periféricas (PAD) (p. ej., liberando inhibidor 1 de proteína fosfatasa 1 (-1), fosfolambano, serca2a, proteínas en dedo de cinc que regulan el gen de fosfolambano, Barkct, receptor β 2 adrenérgico, quinasa de receptor adrenérgico β 2 (BARK), fosfoinosítido-3 quinasa (PI3 quinasa), cal sarcina, etc.), artritis (factores de crecimiento de tipo insulínico), trastornos de las articulaciones (factores de crecimiento de tipo insulínico), hiperplasia de la íntima (p. ej., mediante liberación de enos, inos), mejora de la supervivencia de los trasplantes de corazón (superóxido dismutasa), SIDA (CD4 soluble), atrofia muscular (factor de crecimiento de tipo insulínico 1), insuficiencia renal (eritropoyetina), anemia (eritropoyetina), artritis (factores anti-inflamatorios tales como IRAP y receptor soluble de TNF α), hepatitis (interferón α), carencia de receptores de LDL (receptor de LDL), hiperamonemia (ornitina transcarbamilasa), enfermedad de Krabbe (galactocerebrosidasa), enfermedad de Batten, ataxias cerebrosplinales incluyendo SCA1, SCA2 y SCA3, fenilcetonuria (fenilalanina hidroxilasa), enfermedades autoinmunitarias, y similares. La invención se puede utilizar adicionalmente después del trasplante de órganos para incrementar el éxito del trasplante y/o para reducir los efectos secundarios negativos del trasplante de órganos o terapias coadyuvantes (p. ej., administrando agentes inmunosupresores o ácidos nucleicos inhibidores para bloquear la producción de citoquinas). Como otro ejemplo, se pueden administrar proteínas morfogenéticas de hueso (incluyendo RANKL y/o VEGF) con un aloinjerto óseo, por ejemplo, después de una fractura o de la eliminación quirúrgica en un paciente con cáncer.

Alternativamente, se puede administrar un vector de transferencia génica que codifique cualquier otro polipéptido terapéutico.

En realizaciones concretas, se utiliza un vector derivado de AAV2 y/o AAV3b que comprende las mutaciones 263 y/o 265 de acuerdo con la presente invención para liberar un ácido nucleico de interés como se describe en la presente memoria en un tumor o músculo esquelético, músculo cardíaco, astrocitos y/o células gliales, por ejemplo, para tratar un trastorno asociado con cualquiera de estas células o tejidos tales como la enfermedad de Parkinson, astrocitomas, glioblastomas, distrofia muscular, enfermedades cardíacas (incluyendo PAD e insuficiencia cardíaca congestiva), y similares.

La transferencia génica tiene un uso potencial sustancial en la comprensión y la provisión de una terapia para las dolencias. Existen numerosas enfermedades heredadas en las que los genes defectuosos son conocidos y han sido clonados. En general, las dolencias anteriores se clasifican en dos clases: estados de carencia, normalmente de enzimas, que son generalmente heredados de un modo recesivo, y estados de desequilibrio, que pueden implicar proteínas reguladoras o estructurales, y que son típicamente heredados de una manera dominante. Para las dolencias por carencia, se podría utilizar la transferencia génica para llevar un gen normal a los tejidos afectados para la terapia por sustitución, así como para crear modelos animales para la enfermedad utilizando mutaciones antisentido. Para las dolencias por desequilibrio, se podría utilizar la transferencia génica para crear una dolencia en un sistema modelo, que se podría utilizar después en tentativas para contrarrestar la dolencia. De este modo los vectores de parvovirus producidos de acuerdo con los métodos de la presente invención permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. Según se utiliza en la presente memoria, una dolencia se trata remediando parcialmente o totalmente la carencia o el desequilibrio que ocasiona la enfermedad o la hace más grave. También es posible el uso de la recombinación específica del sitio de las secuencias nucleicas para ocasionar mutaciones o para corregir defectos.

Los vectores de parvovirus de acuerdo con la presente invención también se pueden emplear para proporcionar un ácido nucleico antisentido o ARNi a una célula *in vitro* o *in vivo*. La expresión del ácido nucleico antisentido o ARNi en la célula diana disminuye la expresión de una proteína concreta por la célula. Por consiguiente, los ácidos nucleicos antisentido o ARNi se pueden administrar para disminuir la expresión de una proteína concreta en un sujeto que lo necesite. Los ácidos nucleicos antisentido o ARNi también se pueden administrar a las células *in vitro* para regular la fisiología celular, p. ej., para optimizar sistemas de cultivo celulares o tisulares.

Adicionalmente, los vectores de parvovirus de acuerdo con la presente invención encuentran adicionalmente uso en métodos de diagnóstico y escrutinio, por medio de los cuales un gen de interés es expresado transitoriamente o establemente en un sistema de cultivo celular, o alternativamente, un modelo animal transgénico. La invención también se puede poner en práctica para liberar un ácido nucleico con el fin de producir proteínas, p. ej., para fines de laboratorio, industriales o comerciales.

Liberación de Polipéptidos Inmunogénicos

- 5 Como un aspecto adicional, los vectores de parvovirus de la presente invención se pueden utilizar para producir una respuesta inmunitaria en un sujeto. De acuerdo con esta realización, se puede administrar a un sujeto un vector de parvovirus que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un inmunógeno, y el sujeto organiza una respuesta inmunitaria activa contra el inmunógeno. Los inmunógenos son los descritos más arriba. Preferiblemente, se logra una respuesta inmunitaria protectora.
- 10 Alternativamente, se puede administrar el vector de parvovirus a una célula *ex vivo* y la célula alterada se administra al sujeto. La secuencia de nucleótidos heteróloga se introduce en la célula, y se administra la célula al sujeto, donde la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica el inmunógeno es expresada preferiblemente e induce una respuesta inmunitaria en el sujeto contra el inmunógeno. En realizaciones concretas, la célula es una célula presentadora de antígenos (p. ej., una célula dendrítica).
- 15 Una "respuesta inmunitaria activa" o "inmunidad activa" se caracterizan por la "participación de tejidos y células del anfitrión después de un encuentro con el inmunógeno. Esto implica la diferenciación y proliferación de células inmunocompetentes en los tejidos linforreticulares, que conducen a la síntesis de anticuerpos o al desarrollo de reactividad mediada por células, o ambas". Herbert B. Herscovitz, *Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation*, en IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). Expresado alternativamente, el anfitrión organiza una respuesta inmunitaria después de la exposición a inmunógenos por infección o por vacunación. La inmunidad activa se puede comparar con la inmunidad pasiva, que es adquirida por medio de la "transferencia de sustancias preformadas (anticuerpos, factores de transferencia, injerto tímico, interleuquina-2) desde un anfitrión inmunizado selectivamente a un anfitrión no inmune". *Ídem*.
- 20 Una respuesta inmunitaria "protectora" o inmunidad "protectora" según se utiliza en la presente memoria indica que la respuesta inmunitaria confiere cierto beneficio al sujeto ya que previene o reduce la incidencia de la enfermedad. Alternativamente, una respuesta inmunitaria protectora o inmunidad protectora puede ser útil en el tratamiento de enfermedades, en particular del cáncer o de tumores (p. ej., ocasionando la regresión de un cáncer o tumor y/o evitando la metástasis y/o evitando el crecimiento de nódulos metastásicos). Los efectos protectores pueden ser completos o parciales, siempre que los beneficios del tratamiento superen cualquier desventaja del mismo.
- 25 De acuerdo con los métodos anteriores de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, se prefiere que el vector de parvovirus que porta la secuencia de nucleótidos heteróloga sea administrado en una cantidad inmunogénicamente eficaz, como se describe en la presente memoria.
- 30 Los vectores de parvovirus de la presente invención también se pueden administrar para la inmunoterapia del cáncer mediante la administración de un vector de parvovirus que exprese antígenos de células cancerosas (o una molécula inmunológicamente similar) o cualquier otro inmunógeno que produzca una respuesta inmunitaria contra una célula cancerosa. Como ilustración, se puede producir una respuesta inmunitaria contra un antígeno de una célula cancerosa en un sujeto administrando un vector de parvovirus que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica el antígeno de la célula cancerosa, por ejemplo para tratar a un paciente con cáncer. El vector de parvovirus se puede administrar a un sujeto *in vivo* o utilizando métodos *ex vivo*, como se describe en la presente memoria.
- 35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "cáncer" abarca los cánceres que forman tumores. Del mismo modo, el término "tejido canceroso" abarca los tumores. Un "antígeno de célula cancerosa" incluye antígenos tumorales.
- 40 El término "cáncer" tiene el significado de la técnica, por ejemplo, un crecimiento incontrolado de tejido que tiene el potencial de propagarse a sitios distantes del organismo (esto es, producir metástasis). Los cánceres ilustrativos incluyen, pero no están limitados a, leucemias, linfomas, cáncer de colon, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, melanoma, y similares. Son preferidos los métodos de tratamiento y prevención de los cánceres formadores de tumores.
- 45 El término "tumor" también es conocido en la técnica, por ejemplo, como una masa anómala de células indiferenciadas dentro de un organismo multicelular. Los tumores pueden ser malignos o benignos. Preferiblemente, los métodos descritos en la presente memoria se utilizan para evitar y tratar tumores malignos.
- 50 Los antígenos de células cancerosas de acuerdo con la presente invención han sido descritos más arriba. Por los términos "tratar un cáncer" o "tratamiento del cáncer", se quiere significar que la gravedad del cáncer sea reducida o el cáncer sea evitado o al menos parcialmente eliminado. Preferiblemente, estos términos indican que se evita o se reduce la metástasis del cáncer o al menos se elimina parcialmente. Adicionalmente se prefiere que estos términos indiquen que el crecimiento de los nódulos metastásicos (p. ej., después de la eliminación quirúrgica de un tumor primario) sea evitado o reducido o al menos parcialmente eliminado. Por los términos "prevención del cáncer" o "prevenir el cáncer" se quiere significar que los métodos eliminan o reducen al menos parcialmente la incidencia o el comienzo del cáncer. Expresado de manera alternativa, se puede ralentizar, controlar, disminuir o retrasar el riesgo
- 55 o la probabilidad del comienzo de un cáncer en el sujeto.

En realizaciones concretas, las células pueden ser retiradas del sujeto con cáncer y se pueden poner en contacto con partículas de parvovirus de acuerdo con la presente invención. La célula modificada es administrada después al sujeto, por medio de lo cual se logra una respuesta inmunitaria contra el antígeno de la célula cancerosa. Este método es empleado de manera particularmente ventajosa con sujetos inmunocomprometidos que no pueden armar una respuesta inmunitaria suficiente *in vivo* (esto es, no pueden producir anticuerpos intensificadores en suficiente cantidad).

Se sabe en la técnica que las respuestas inmunitarias pueden ser intensificadas por citoquinas inmunomoduladoras (p. ej., interferón α , interferón β , interferón γ , interferón ω , interferón τ , interleuquina-1 α , interleuquina-1 β , interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-4, interleuquina 5, interleuquina-6, interleuquina-7, interleuquina-8, interleuquina-9, interleuquina-10, interleuquina-11, interleuquina 12, interleuquina-13, interleuquina-14, interleuquina-18, Factor de Crecimiento de Células B, Ligando CD40, factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , proteína quimioatrayente de monocitos 1, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, y linfoquina). Por consiguiente, se pueden administrar citoquinas inmunomoduladoras (preferiblemente, citoquinas inductoras de CTL) a un sujeto junto con los vectores de parvovirus.

Las citoquinas se pueden administrar mediante cualquier método conocido en la técnica. Se pueden administrar citoquinas exógenas al sujeto, o alternativamente, se puede liberar en un sujeto una secuencia de nucleótidos que codifica una citoquina utilizando un vector adecuado, y producir la citoquina *in vivo*.

Sujetos, Formulaciones Farmacéuticas, y Modos de Administración.

Los vectores de parvovirus de acuerdo con la presente invención encuentran uso en aplicaciones tanto veterinarias como médicas. Los sujetos adecuados incluyen tanto aves como mamíferos. El término "ave" según se utiliza en la presente memoria incluye, pero no está limitado a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos, faisanes, loros, periquitos. El término "mamífero" según se utiliza en la presente memoria incluye, pero no está limitado a, seres humanos, primates no humanos, bóvidos, óvidos, cápridos, équidos, félidos, cánidos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos incluyen recién nacidos, lactantes, jóvenes y adultos. En realizaciones concretas, el sujeto tiene anticuerpos contra uno o más AAV (p. ej., serotipos de AAV tales como AAV1 y/o AAV2). En otras realizaciones, al sujeto se le ha administrado previamente un vector de AAV diferente (p. ej., un AAV inmunológicamente distinto). Opcionalmente, el sujeto "necesita" los métodos de la presente invención, p. ej., porque el sujeto tiene o se cree que está en riesgo de un trastorno incluyendo los descritos en la presente memoria o que se beneficiaría de la liberación de un ácido nucleico incluyendo los descritos en la presente memoria.

En realizaciones concretas, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de virus o una cápsida de virus de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, agentes estabilizantes, tampones, coadyuvantes, diluyentes, etc. Para los inyectables, el portador será típicamente un líquido. Para otros métodos de administración, el portador puede ser sólido o líquido. Para la administración por inhalación, el portador será respirable, y estará preferiblemente en forma particulada sólida o líquida.

Por "farmacéuticamente aceptable" se quiere significar un material que no es tóxico o no deseable de otro modo, esto es, el material se puede administrar a un sujeto sin ocasionar ningún efecto biológico no deseable.

Un aspecto de la presente invención es un método de transferencia de una secuencia de nucleótidos a una célula *in vitro*. Las partículas de virus se pueden introducir en las células a una multiplicidad de infección apropiada de acuerdo con los métodos de transducción convencionales apropiados para las células diana concretas. Los títulos de virus que se van a administrar pueden variar, dependiendo del tipo y el número de células diana, y del vector de virus concreto, y pueden ser determinados por los expertos en la técnica sin experimentación indebida. Preferiblemente, se introducen en la célula al menos alrededor de 10^3 unidades infecciosas, más preferiblemente al menos alrededor de 10^5 unidades infecciosas.

Las células que van a introducir el vector de parvovirus pueden ser de cualquier tipo, incluyendo, pero no limitadas a células neurales (incluyendo células de los sistemas nerviosos periférico y central, en particular, células de cerebro tales como neuronas, oligodendrocitos, células gliales, astrocitos), células de pulmón, células del ojo (incluyendo células de la retina, epitelio pigmentario retiniano, y células de la córnea), células epiteliales (p. ej., células epiteliales del intestino y respiratorias), células musculares, células dendríticas, células pancreáticas (incluyendo células de los islotes), células hepáticas, células del miocardio, células óseas (p. ej., células pluripotenciales de médula ósea), células pluripotenciales hematopoyéticas, células de bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de próstata, células germinales, y similares. Alternativamente, la célula puede ser cualquier célula progenitora. Como una alternativa adicional, la célula puede ser una célula pluripotencial (p. ej., célula pluripotencial neural, célula pluripotencial del hígado). Como otra alternativa adicional más, la célula puede ser una célula cancerosa o tumoral. Por otra parte, las células pueden tener su origen en cualquier especie, como se ha indicado más arriba.

Los vectores de parvovirus pueden ser introducidos en las células *in vitro* con el fin de administrar la célula modificada a un sujeto. En realizaciones concretas, las células han sido retiradas de un sujeto, el vector de

- parvovirus es introducido en ellas, y después las células se vuelven a reponer en el sujeto. Los métodos para retirar las células de un sujeto para el tratamiento *ex vivo*, seguido de la introducción de nuevo en el sujeto son conocidos en la técnica (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.399.346; cuya descripción se incorpora en la presente memoria en su totalidad). Alternativamente, el vector de parvovirus recombinante se introduce en las células de otro sujeto, en células cultivadas, o en células de cualquier otra fuente adecuada, y las células se administran a un sujeto que lo necesite.
- Las células adecuadas para la terapia génica *ex vivo* se han descrito más arriba. Las dosificaciones de las células que se van a administrar a un sujeto variarán con la edad, el estado y la especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico que esté siendo expresado por la célula, el modo de administración, y similares. Típicamente, se administrarán de al menos alrededor de 10^2 a alrededor de 10^8 o de alrededor de 10^3 a alrededor de 10^6 células por dosis en un portador farmacéuticamente aceptable. En realizaciones concretas, las células transducidas con el vector de parvovirus se administran al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz combinadas con un portador farmacéutico.
- Una cantidad "terapéuticamente eficaz" según se utiliza en la presente memoria es una cantidad que es suficiente para proporcionar cierta mejora o beneficio al sujeto. Expresado alternativamente, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporcionará cierto alivio, mitigación, o disminución en al menos uno de los síntomas clínicos en el sujeto. Los expertos en la técnica apreciarán que no es necesario que los efectos terapéuticos sean completos o curativos, siempre que se proporcione cierto beneficio al sujeto.
- En algunas realizaciones, las células que han sido transducidas con un vector de parvovirus pueden ser administradas para lograr una respuesta inmunogénica contra el polipéptido liberado (p. ej., expresado como un transgén o en la cápsida). Típicamente, se administra una cantidad de células que expresan una cantidad inmunogénicamente eficaz del polipéptido combinado con un portador farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénicamente eficaz" es una cantidad que es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria activa en el sujeto al cual se administra la formulación farmacéutica. Preferiblemente, la dosificación es suficiente para producir una respuesta inmunitaria protectora (como se define más arriba). No es necesario que el grado de protección conferido sea completo o permanente, siempre que los beneficios de la administración del polipéptido inmunogénico superen cualquiera de las desventajas del mismo.
- Un aspecto adicional de la invención es un método de administración de partículas de parvovirus o cápsidas de la invención a un sujeto. La administración de las partículas de parvovirus o cápsidas de la presente invención a un sujeto humano o un animal que lo necesite puede ser mediante cualquier método conocido en la técnica para administrar vectores de virus. Preferiblemente, el vector de parvovirus se libera en una dosis terapéuticamente eficaz en un portador farmacéuticamente aceptable.
- Los vectores de parvovirus de la invención se pueden administrar adicionalmente para lograr una respuesta inmunogénica (p. ej., como vacuna). Típicamente, las vacunas de la presente invención comprenden una cantidad inmunogénicamente eficaz de virus combinado con un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la dosificación es suficiente para producir una respuesta inmunitaria protectora (como se ha definido más arriba). No es necesario que el grado de protección conferida sea completo o permanente, siempre que los beneficios de la administración del polipéptido inmunogénico superen cualquier desventaja de la misma. Los sujetos y los inmunógenos se han descrito más arriba.
- Las dosificaciones de las partículas de parvovirus que se van a administrar a un sujeto dependerán del modo de administración, la enfermedad o afección que se vaya a tratar, del estado del sujeto individual, del vector de virus concreto, y del ácido nucleico que se vaya a liberar, y se pueden determinar de una manera rutinaria. Los ejemplos de las dosis para lograr efectos terapéuticos son títulos de virus de al menos alrededor de 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} unidades de transducción o más, preferiblemente alrededor de 10^8 - 10^{13} unidades de transducción, aún más preferiblemente 10^{12} unidades de transducción.
- En realizaciones concretas, se puede emplear más de una administración (p. ej., dos, tres, cuatro o más administraciones) para lograr el nivel deseado de expresión génica a lo largo de un período de diferentes intervalos, p. ej., diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente, etc.
- Los modos ilustrativos de administración incluyen la administración oral, rectal, transmucosal, tópica, intranasal, por inhalación (p. ej., por medio de aerosol), bucal (p. ej., sublingual), vaginal, intratecal, intraocular, transdérmica, en el útero (o in ovo), parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular [incluyendo la administración en el músculo esquelético, diafragma y/o cardíaco], intradérmica, intrapleural, intracerebral, e intraarticular), tópica (p. ej., en las superficies tanto de la piel como de la mucosa, incluyendo las superficies de las vías respiratorias, y la administración transdérmica, y similares, así como la inyección directa en tejidos u órganos (p. ej., en el hígado, el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el músculo diafragma o el cerebro). La administración también puede ser en un tumor (p. ej., en o cerca de un tumor o un ganglio linfático). La ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección que esté siendo tratada y de la naturaleza del vector concreto que esté siendo utilizado.

5 En realizaciones concretas, se administra un vector quimérico de acuerdo con la presente invención que comprende una mutación 263 y/o 265 como se describe en la presente memoria en un esqueleto de AAV2 o AAV3b al músculo esquelético, al músculo cardíaco y/o al cerebro (p. ej., para tratar una distrofia muscular, una enfermedad cardíaca (p. ej., PAD o insuficiencia cardíaca congestiva), enfermedad de Parkinson, astrocitomas, glioblastomas) o en un tumor.

10 Se pueden preparar inyectables de las maneras convencionales, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o en forma de emulsiones. Alternativamente, se puede administrar el virus de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación sostenida. Adicionalmente, la partícula de virus puede ser liberada seca en una matriz implantable quirúrgicamente tal como un sustituto de injerto óseo, una sutura, un separador intraluminal, y similares (p. ej., como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. US-2004-0013645-A1).

15 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral se pueden presentar en unidades discretas, tales como cápsulas, sellos, grageas, o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad pre-determinada de la composición de esta invención; en forma de polvos o gránulos; en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de una emulsión de aceite en agua o agua en aceite. La liberación oral se puede realizar formando un complejo de una composición de la presente invención con un portador capaz de soportar la degradación por las enzimas digestivas en el intestino de un animal. Los ejemplos de tales portadores incluyen cápsulas de plástico o comprimidos, como es bien sabido en la técnica. Tales formulaciones se preparan mediante cualquier método adecuado en farmacia, que incluye la etapa de asociar la composición y un portador farmacéuticamente adecuado (que puede contener uno o más ingredientes accesorios como se ha indicado más arriba). En general, la composición farmacéutica de acuerdo con las realizaciones de la presente invención se prepara mezclando uniformemente e íntimamente la composición con un portador líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y después, si fuera necesario, configurando la mezcla resultante. Por ejemplo, se puede preparar un comprimido comprimiendo o moldeando el polvo o los gránulos que contienen la composición, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos comprimidos se preparan comprimiendo, en una máquina adecuada, la composición en una forma que fluye libremente, tal como polvo o gránulos opcionalmente mezclados con un aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte, y/o uno o varios agentes tensioactivos/dispersantes. Los comprimidos moldeados se elaboran moldeando, en una máquina adecuada, el compuesto en polvo humedecido con un aglutinante líquido inerte.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración bucal (sub-lingual) incluyen grageas que comprenden la composición de esta invención en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; y pastillas que comprenden la composición en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

35 Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para la administración parenteral pueden comprender soluciones inyectables acuosas y no acuosas estériles de la composición de esta invención, cuyas preparaciones son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor deseado. Estas preparaciones pueden contener anti-oxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos, que hacen la composición isotónica con la sangre del receptor deseado. Las suspensiones, soluciones y emulsiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Los ejemplos de los disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada, 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, agentes antimicrobianos, anti-oxidantes, quelantes, y gases inertes y similares.

50 Las composiciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitarias o de múltiples dosis, por ejemplo, en ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado deshidratado mediante congelación (liofilizado) que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, solución salina o agua para inyectables inmediatamente antes de su uso.

55 Las soluciones y suspensiones de inyecciones extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles, de la clase descrita previamente. Por ejemplo, se puede proporcionar una composición inyectable, estable, estéril de esta invención en una forma de dosificación unitaria en un recipiente sellado. La composición se puede proporcionar en forma de un producto liofilizado, que puede ser reconstituido con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para formar una composición líquida adecuada para su inyección en un sujeto. La forma de dosificación unitaria puede ser de alrededor de 1 µg a alrededor de 10 gramos de la composición de esta invención. Cuando la composición es sustancialmente insoluble en agua, se puede incluir una cantidad suficiente de agente emulsionante, que sea fisiológicamente aceptable, para emulsionar la composición en un portador acuoso. Uno de tales agentes emulsionantes útiles es la fosfatidilcolina.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal se presentan preferiblemente en forma de supositorios de dosis unitarias. Estos se pueden preparar mezclando la composición con uno o más portadores sólidos convencionales, tales como por ejemplo, manteca de cacao y configurando después la mezcla resultante.

5 Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para la administración tópica a la piel tienen preferiblemente la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol, o aceite. Los portadores que se pueden utilizar incluyen, pero no están limitados a, vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, intensificadores transdérmicos, y combinaciones de dos o más de los mismos. En algunas realizaciones, por ejemplo, la liberación tópica se puede realizar mezclando una composición farmacéutica de la presente invención con un reactivo lipófilo (p. ej., DMSO) que sea capaz de penetrar la piel.

10 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración transdérmica pueden estar en forma de parches discretos adaptados para permanecer en íntimo contacto con la epidermis del sujeto durante un período de tiempo prolongado. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica también pueden ser liberadas por medio de iontoforesis (véase, por ejemplo, *Pharmaceutical Research* 3:318 (1986)) y típicamente adoptan la forma de una solución acuosa opcionalmente tamponada de la composición de esta invención. Las formulaciones adecuadas pueden comprender tampón citrato o bis/tris (pH 6) o etanol/agua y pueden contener ingrediente activo de 0,1 a 0,2 M.

20 Los vectores de parvovirus descritos en la presente memoria se pueden administrar a los pulmones de un sujeto mediante cualquier método adecuado, pero preferiblemente se administran mediante la administración de una suspensión en aerosol de partículas respirables constituidas por los vectores de parvovirus, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores de parvovirus pueden ser producidos mediante cualquier método adecuado, por ejemplo con un nebulizador de aerosol a presión o un nebulizador ultrasónico, como es sabido por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.501.729. Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden los vectores de parvovirus pueden ser producidos del mismo modo con cualquier generador de aerosol de medicamento
25 particulado sólido, por medio de mecanismos conocidos en la técnica farmacéutica.

Habiendo descrito la presente invención, la misma se explicará con mayor detalle en los siguientes ejemplos, que se incluyen en la presente memoria con fines meramente ilustrativos, y que no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1

Enfoque de Clasificación

30 Materiales y Métodos

Plásmido y Mutagénesis de ADN

Los plásmidos de partida para estos experimentos fueron pxr1, pxr2, pxr3 (Rabinowitz et al, (2001) *J. Virology* 76:781-801). Todas las mutagénesis de los plásmidos se realizaron utilizando los kits Quik Change Multi Site Mutagenesis o Quik Change Site Directed Mutagenesis (ambos de Stratagene). La exactitud de los cambios de
35 nucleótidos se verificó mediante análisis de secuencia de ADN seguido de subclonación de ADN para eliminar cualquier artefacto no deseado generado por el enfoque de mutagénesis. En ciertos casos, la subclonación se realizó utilizando el mutante recién generado para generar otro mutante.

Producción de Virus Recombinante

40 Todos los virus AAV recombinantes (AAVr) fueron generados utilizando el método de triple transfección convencional (Haberman et al. 1999. Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use in in vitro and in vivo administration, págs. 4.17.1-4.17.25. En J. Crawley, et al. (eds.), Current protocols in neuroscience, vol. 1. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N.Y.). El AAVr se purificó en este estudio utilizando gradientes convencionales de cloruro de cesio o utilizando la cromatografía en columna con heparina (*ídem.*). El método
45 utilizado para la purificación del virus se indica en la correspondiente figura. El título físico de las diferentes preparaciones virales se evaluó utilizando la hibridación mediante transferencia puntual. Las preparaciones que se estaban comparando en un experimento se evaluaron en las mismas transferencias puntuales para controlar la variación entre las diferentes transferencias puntuales.

Creación de Imágenes de Animales

50 Se inyectaron 1×10^{10} partículas que contenían genoma viral (gv) en el gastrocnemio de ratones macho BALB/c de 6 semanas de edad. Cada tipo de virus fue inyectado en un total de 6 miembros utilizando 25 μ l de virus. Se crearon imágenes de los animales en diferentes días después de la inyección utilizando Roper Scientific Imaging (Princeton Instruments). Brevemente, los animales se anestesiaron y se les inyectó IP sustrato de luciferina. Diez minutos después de la inyección los animales se colocaron en la cámara y se determinó la emisión de luz. El número medio

de píxeles totales por región de interés se determinó utilizando el soporte lógico CMIR_Image (Center for Molecular Imaging Research, Mass. General) y se trazó a lo largo del tiempo.

Experimentos de Unión a Heparina

5 La unión por lotes de AAVr a heparina-agarosa se realizó como se ha descrito previamente (Rabinowitz, (2004) *J. Virology* 78:4421-4432). Brevemente, se aplicaron partículas equivalentes de viriones de AAVr a heparina-agarosa de tipo 1 (H-6508, Sigma, St. Louis, Mo.) en 1 × PBS, se dejó que se unieran durante una hora a la temperatura ambiente, se centrifugaron a baja velocidad durante 2 minutos, y se eliminó el sobrenadante (descarte). Se realizaron seis lavados de cinco volúmenes del lecho de PBS con MgCl₂ 1 mM, seguido de una elución de tres etapas de cinco volúmenes del lecho de PBS con MgCl₂ 1 mM que contenía NaCl 0,5 M (etapa 1), NaCl 1,0 M (etapa 2), o NaCl 1,5 M (etapa 3). El número de partículas de AAVr presentes en los lavados y en la etapa 3 de elución se determinó mediante hibridación por transferencia puntual.

Resultados

Fundamento del Enfoque de Clasificación

15 En las publicaciones resulta evidente que los diferentes serotipos de AAV muestran habilidades diferentes para transducir diferentes tejidos. Un ejemplo bien documentado es la capacidad de AAV1 para transducir preferentemente músculo esquelético. Las secuencias de aminoácidos de AAV1 y AAV2 son idénticas en un 83%. En un estudio previo se intercambiaron grandes regiones de la cápsida de AAV2 por los correspondientes aminoácidos de AAV1 y se examinó la capacidad de los vectores resultantes para transducir músculo esquelético (Hauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774). Identificaron 2 aminoácidos que parecían conferir una transducción intensificada de músculo esquelético por AAV2, si bien no tan buena como AAV1. Los presentes estudios examinaron el fenómeno de una manera más detallada. Empleando el análisis bio-informático y de estructura-función, se identificaron los residuos de aminoácidos claves en las proteínas de la cápsida de AAV que justifican una transducción intensificada de AAV1 para someterlos a ensayo en el contexto de la mayoría de las cápsidas de AAV2. Este enfoque evita la necesidad de realizar todos los cambios diferentes de aminoácidos entre los 2 serotipos y todas las permutaciones diferentes. Adicionalmente, este enfoque se aprovechó de la estructura cristalina de AAV2, de los alineamientos de las secuencias de aminoácidos, y de las propiedades conocidas de los diferentes serotipos de AAV. Se generaron alineamientos de estas proteínas de la cápsida muy similares de diferentes serotipos. Se identificaron los aminoácidos en común entre las proteínas de la cápsida de AAV1 y AAV7 y distintas de las proteínas de la cápsida de AAV2 y AAV8. Se identificaron treinta y seis aminoácidos candidato por medio de este enfoque de clasificación (FIG. 1A). Basándose en el modelado de la estructura cristalina, se seleccionaron los 12 mejores candidatos para someterlos a ensayo para la transducción intensificada en el músculo (FIG. 1B).

Algunas Variantes de AAV No Mostraron Diferencia con AAV2 Mientras Otras son Mucho Mejores que AAV2.

35 Se evaluó la capacidad de diferentes variantes de AAV para transducir músculo esquelético después de la inyección de 1×10^{10} partículas virales que contenían genoma en el músculo gastrocnemio de ratones BALB/c. Algunas variantes de virus no mostraron ninguna diferencia en la capacidad para transducir músculo esquelético (FIGS. 2a y b). Aunque las posiciones 324, 328 están localizadas en bucles que se pronostica que se encuentran sobre la superficie de la cápsida, el cambio de estos aminoácidos por los correspondientes aminoácidos de AAV1 no hizo nada para mejorar la capacidad de este virus para transducir músculo esquelético (FIGS. 2A y 2B).

40 Una variante (2.5) mostró una transducción de músculo mucho mayor que AAV2 (FIG. 3A). Esta variante tenía 5 cambios de aminoácidos que estaban localizados en el eje de simetría bidimensional (FIG. 3B). Aunque parece que los grupos de estos 5 aminoácidos se encuentran en diferentes partes de la misma subunidad (2 en un lado y 3 en otro), están muy próximos cuando 2 de las subunidades se aproximan (FIG. 3C).

45 Para investigar si los 5 aminoácidos eran necesarios para este tropismo intensificado hacia el músculo se elaboraron las variantes 263, 265 así como las variantes 709, 712, 720. Estas variantes fueron sometidas a ensayo en experimentos de formación de imágenes similares (FIG. 4). La variante 709, 712, 720 mostró una transducción de músculo similar a la de AAV2, mientras la variante 263, 265 mostró una transducción intensificada de músculo similar a la observada con la variante 2.5 que contenía los 5 cambios de aminoácidos. Se construyeron una variante 263 y una 265 separada y se sometieron a ensayo en experimentos similares (FIG. 5). Estos experimentos revelaron que el aminoácido mayoritariamente responsable de la transducción intensificada de AAV1 está localizado en la posición 265. Ésta es esencialmente una inserción de una treonina en la secuencia de la cápsida de AAV2.

50 Se ha realizado la misma inserción en las posiciones 263 y 265 en el esqueleto de AAV3b (FIG. 10).

Curiosamente, la región 263, 265 es divergente entre los serotipos (región recuadrada FIG. 7). Existen inserciones de aminoácidos adicionales en esta área en comparación con AAV2.

Otra variante que muestra una transducción en músculo más alta que AAV2 es la variante 454, 461 (FIG. 6). Se evaluaron diferentes combinaciones de 265 con los cambios 454, 461 para determinar si se puede observar una intensificación adicional combinando estas variantes.

5 Finalmente, los autores de la presente invención examinaron la capacidad de las diferentes variantes para ser purificadas por medio de heparina (FIG. 8). Todas las variantes sometidas a ensayo mostraron perfiles de unión a heparina similares a AAV2.

Ejemplo 2

Perfil Inmunológico

10 De una manera similar a otros virus sin envoltura, las dosis elevadas de AAV generan anticuerpos neutralizadores que evitan la repetición de la dosis. Con la aparición de nuevos serotipos, es posible la administración repetida. Para explorar la capacidad de evitar una respuesta inmunitaria pre-existente a AAV2, se sometió a ensayo el vector 2.5 quimérico para determinar la expresión en transgén in vitro después de la exposición a suero de animales expuestos previamente a diferentes serotipos de AAV (1, 2, y 2.5 respectivamente).

15 Para generar animales con una respuesta inmunitaria robusta a la cubierta del virión de AAV, se inyectaron de manera independiente intramuscularmente 4×10^{10} partículas de vector de AAV de serotipo 1, 2, y 2.5 en ratones C57blk6. Cuatro semanas después de la inyección, se aisló la sangre y se recogió el suero. El suero de estos animales se utilizó después en un análisis de anticuerpos neutralizadores utilizando células 293 y vectores de serotipo específico de AAV que expresan GFP como gen informador. En este análisis, el suero se diluye secuencialmente y después se mezcla con una cantidad conocida de vector específico del serotipo (1×10^8 partículas) a 4°C durante 2 horas. Esta mezcla de suero y vector se añade después a las células 293 en placas de 24 pocillos en presencia de virus coadyuvante de adenovirus a una multiplicidad de infección de 5. En estas condiciones, la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) es una medida de la capacidad del vector específico del serotipo para infectar las células en presencia de anticuerpos neutralizadores. El título de anticuerpo neutralizador se calcula después como la dilución más alta en la que la expresión de GFP es 50% o menos que la del vector de control (sin pre-mezcla con suero específico del serotipo).

25 Como se observa en la Tabla 3, los animales previamente expuestos a AAV1 pudieron neutralizar la transducción de GFP en AAV1 con diluciones tan elevadas como 1:1000. Sin embargo, este anticuerpo neutralizador específico del serotipo 1 requería más suero de ratón para neutralizar el 2.5 quimérico de AAV (dilución 1:100). Más importante, esta observación se verificó para sueros de ratón obtenidos de animales previamente expuestos a cubiertas de viriones de serotipo 2 de AAV. En este análisis, solamente después de que los sueros se hubieran diluido 1:10.000 se observó una transducción de 50% de GFP observada cuando se comparó con el control de AAV2. Sin embargo, para 2.5 quimérico, la transducción de 50% de GFP se observó con una dilución de solamente 1:100 de este suero de ratón. Puesto que solamente 0,6% de los cambios de aminoácidos difieren de AAV2 en este vector quimérico, estas alteraciones tuvieron profundos efectos sobre la capacidad del anticuerpo neutralizador de AAV2 pre-existente para reconocer la cubierta de la cápsida de 2.5 de AAV. Los animales expuestos previamente a 2.5 y analizados después para determinar la actividad neutralizadora contra AAV 1, 2, y 2.5 produjeron los resultados esperados (véase la Tabla 3) requiriéndose la mayor dilución para el vector 2.5 (1:8000) seguido por 1:1000 para AAV 2 y 1:100 para el serotipo 1 de AAV, respectivamente. La conclusión de estos estudios es que la alteración de 5 aminoácidos en 2.5 quimérico, aunque pequeña en número (0,6% del total de aminoácidos) era suficiente para afectar significativamente al perfil inmunitario para este virión cuando se sensibilizaba con anticuerpos neutralizadores específicos para AAV2.

35 Basándose en estos estudios, el vector 2.5 sería adecuado para transducir individuos previamente expuestos a AAV1, AAV2 o ambos, proporcionando de ese modo una mayor versatilidad en los vectores disponibles. Por ejemplo, este vector quimérico permitiría la re-administración en animales y pacientes previamente expuestos a AAV2. Además, este vector quimérico demuestra que se pueden cambiar aminoácidos seleccionados en la secuencia de aminoácidos de la cápsida de AAV2 que alteran significativamente la respuesta inmunitaria. Basándose en estos resultados, alteraciones similares en regiones codificantes de la cápsida similares para otros serotipos de AAV también darían como resultado perfiles inmunitarios únicos permitiendo generar fácilmente un gran número de variantes de AAV alternativas para la administración repetida sin tener que cambiar una nueva cápsida para el serotipo cada vez.

Tabla 3

Análisis de Anticuerpos Neutralizadores para virus AAV2.5

Sueros	Virus Diana	Título NA
AAV1	AAV1	1:1000
	AAV2.5	1:100
AAV2	AAV2	1:10000
	AAV2.5	1:100
AAV2.5	AAV1	1:100
	AAV2	1:1000
	AAV2.5	1:8000

Ejemplo 3

5 Mutaciones 263, 265 en un AAV3b

El Esqueleto (SASTG) Confiere una Transducción Intensificada de Músculo Esquelético

Estos aminoácidos (263, 265) de AAV1 también fueron manipulados en las correspondientes posiciones de la cápsida de AAV3b, un serotipo íntimamente relacionado con AAV2 y que no transduce bien en músculo esquelético, para generar un vector denominado SASTG. Se inyectaron a los ratones partículas que contenían genoma equivalente (1×10^{10}) de AAV1, AAV2, AAV3b, o SASTG y se evaluó la actividad luciferasa a lo largo del tiempo (días 3, 7, 14, y 21) utilizando la formación de imágenes de animales *in vivo* (FIG. 12).

Como se esperaba, tanto AAV2 como AAV3 no transducen en músculo esquelético tan eficazmente como AAV1. La expresión a partir de ratones a los que se habían inyectado AAV2 y AAV3b no se pudo detectar el día 3; mientras la expresión a partir de AAV1 y, más importante, a partir de SASTG pudo ser detectada el día 3. El patrón de expresión de SASTG era análogo al de AAV1 en todos los puntos temporales después de la inyección en vez de su parental AAV3b.

Ejemplo 4

Transducción de Cerebro e Hígado

Se utilizaron ratones macho C57bl/6 de seis a ocho semanas de edad para determinar la eficacia de transducción de AAV2 y del vector 2.5 en hígado. Los ratones se anestesiaron utilizando 300 μ L de Avertina al 2,5%, y se disolvieron 1×10^{11} partículas de AAV2 y vector 2.5 que portaban el virus con el transgén del Factor IX humano (hFIX) en 250 μ L de PBS y se inyectaron lentamente a través de la vena porta. Los vectores eran partículas de virus que formaban dúplex como se describe en la Publicación de patente internacional WO 01/92551. Después de 1 y 6 semanas, se recogieron 100 μ L de sangre de cada ratón de la vena de la cola utilizando tubos de vidrio capilares recubiertos con heparina. Se recogió el suero mediante centrifugación de la muestra de sangre a 4°C, 8000 rpm durante 20 min. Los sueros se almacenaron a -80°C hasta que se sometieron a ensayo. La expresión de hFIX en el suero se sometió a ensayo mediante métodos ELISA convencionales. Se utilizaron diluciones seriadas de suero humano normal con niveles de hFIX de 5 μ g/mL como patrón. Utilizando este análisis, se encontró que el vector 2.5 tiene una capacidad reducida para transducir en hígado en comparación con el virus AAV2 parental (FIG. 13). Este experimento demuestra que además de ganar tropismo hacia el músculo, el vector 2.5 ha perdido tropismo específico hacia el hígado característico de AAV2.

En otro experimento, se inyectó el vector 2.5 que formaba dúplex en la región del córtex del cerebro de ratón (FIG. 14) utilizando una casete con el transgén informador de la proteína fluorescente verde (GFP) y las condiciones establecidas previamente para AAV2 y se analizó para determinar la transducción específica de las neuronas. Queda demostrado que AAV1 y AAV2 son específicos para la transducción neuronal. Como se muestra en la FIG. 14, el vector 2.5 transduce neuronas (flecha de la izquierda) así como células no neuronales (flecha de la derecha). Basándose en la morfología, estas células parecen ser astrocitos.

La suma de estos experimentos cuando se somete a ensayo el vector 2.5 para determinar la transducción específica de un tejido *in vivo* demuestra que además de ganar tropismo específico hacia un tejido (p. ej., músculo, esquelético o cardíaco derivado del serotipo 1 de AAV parental), y de perder transducción específica de un tipo celular (p. ej.,

transducción específica de hepatocitos del hígado del AAV2 receptor), estos vectores han ganado un nuevo tropismo (no neuronal/astrocitos) que no está presente en la cápsida del parental donador (AAV1) o del parental receptor (AAV2) y es completamente único para el vector 2.5 quimérico.

5 Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no se debe considerar limitante de la misma. La invención se define por medio de las siguientes reivindicaciones, incluyendo en la misma los equivalentes de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un vector viral quimérico que comprende:
 - 5 (a) una cápsida de virus adenoasociado (AAV) quimérica que comprende una inserción de aminoácido inmediatamente después de la posición del aminoácido 264 en una subunidad de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en otra subunidad de la cápsida de otro AAV; y
 - (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia repetida terminal de AAV y una secuencia de ácido nucleico heterólogo; donde el ácido nucleico está empaquetado dentro de la cápsida de AAV quimérica.
2. Un vector viral quimérico que comprende:
 - 10 (a) una cápsida quimérica de un virus adenoasociado (AAV) que comprende una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 450 y/o una sustitución de aminoácido en la posición del aminoácido 457 en una subunidad de la cápsida de AAV2 o un cambio correspondiente en una subunidad de la cápsida de otro AAV; y
 - (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia repetida terminal de AAV y una secuencia de ácido nucleico heterólogo; donde el ácido nucleico está empaquetado dentro de la cápsida de AAV quimérica.
- 15 3. El vector viral quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, donde la subunidad de la cápsida comprende adicionalmente al menos una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de los aminoácidos 263, 450 y 457 en una subunidad de la cápsida de AAV2, o un cambio correspondiente en una subunidad de la cápsida de otro AAV.
- 20 4. El vector viral quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, donde la subunidad de la cápsida comprende adicionalmente al menos una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de los aminoácidos 263, 705, 708 y 716 en una subunidad de la cápsida de AAV2, o un cambio correspondiente en una subunidad de la cápsida de otro AAV.
5. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el vector viral quimérico comprende una cápsida de AAV2 quimérica.
- 25 6. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el vector viral quimérico comprende una cápsida de AAV3 quimérica, opcionalmente una cápsida de AAV3b.
7. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y, en la medida que dependa de éstas, las reivindicaciones 5-6, donde el aminoácido insertado inmediatamente después de la posición del aminoácido 264 es arginina, serina, tirosina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, prolina, treonina, lisina, ácido aspártico o ácido glutámico.
- 30 8. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-4 y, en la medida que dependa de éstas, las reivindicaciones 5-6, donde la sustitución en la posición del aminoácido 263 es una sustitución de alanina por glutamina.
9. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3 y, en la medida que dependa de éstas, las reivindicaciones 5-6, donde la sustitución en la posición del aminoácido 450 es una sustitución de asparragina por treonina.
- 35 10. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3 y, en la medida que dependa de éstas, las reivindicaciones 5-6, donde la sustitución en la posición del aminoácido 457 es una sustitución de asparragina por glutamina.
- 40 11. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 4 y, en la medida que dependa de éstas, las reivindicaciones 5-6, donde la sustitución en la posición del aminoácido 705 es una sustitución de alanina por asparragina.
12. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 4 y, en la medida que dependa de éstas, las reivindicaciones 5-6, donde la sustitución en la posición del aminoácido 708 es una sustitución de alanina por valina.
- 45 13. El vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 4 y, en la medida que dependa de éstas, las reivindicaciones 5-6, donde la sustitución en la posición del aminoácido 716 es una sustitución de asparragina por treonina.
- 50 14. El vector viral quimérico de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, donde se inserta una arginina, serina, tirosina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, prolina, treonina, lisina, un ácido aspártico o un ácido

glutámico inmediatamente después de la posición del aminoácido 264 en una subunidad de la cápsida de AAV2 y se sustituye una alanina por glutamina en la posición del aminoácido 263 en la subunidad de la cápsida de AAV2.

5 15. El vector viral quimérico de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, donde se inserta una arginina, serina, tirosina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, prolina, treonina, lisina, un ácido aspártico o un ácido glutámico inmediatamente después de la posición del aminoácido 264 en una subunidad de la cápsida de AAV3, opcionalmente en una subunidad de la cápsida de AAV3b, y se sustituye una alanina por glutamina en la posición del aminoácido 263 en la subunidad de la cápsida de AAV3, opcionalmente en la subunidad de la cápsida de AAV3b.

10 16. El vector viral quimérico de acuerdo con la reivindicación 4, donde se inserta una arginina, serina, tirosina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, prolina, treonina, lisina, un ácido aspártico o un ácido glutámico inmediatamente después de la posición del aminoácido 264 en una subunidad de la cápsida de AAV2; donde se sustituye alanina por glutamina en la posición del aminoácido 263 en la subunidad de la cápsida de AAV2; se sustituye una alanina por asparragina en la posición del aminoácido 705 en la subunidad de la cápsida de AAV2; se sustituye una alanina por valina en la posición del aminoácido 708 en la subunidad de la cápsida de AAV2; y se sustituye una asparragina por treonina en la posición del aminoácido 716 en la subunidad de la cápsida de AAV2.

15 17. El vector viral quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un polipéptido, opcionalmente un polipéptido terapéutico.

20 18. El vector viral quimérico de la reivindicación 17, donde el polipéptido terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: distrofina, mini-distrofina, utrofina, un factor de coagulación incluyendo el Factor VIII o el Factor IX, un factor de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento de tipo insulínico I, el factor de crecimiento de tipo insulínico II, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de fibroblastos, el factor de crecimiento derivado del nervio, el factor de crecimiento derivado de la glía, el factor de crecimiento transformante α o el factor de crecimiento transformante β , un factor neurotrófico, un factor antiinflamatorio incluyendo el receptor soluble del factor de crecimiento transformante α o IRAP, antitripsina $\alpha 1$, α -glucosidasa ácida lisosómica, β -glucocerebrosidasa, α -galactosidasa A, una citoquina, un interferón incluyendo interferón β , TRAIL, ligando FAS, endostatina, angiostatina, proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística, eritropoyetina, receptor de LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una proteína morfogénica de hueso incluyendo VEGF y RANKL, inhibidor I de proteína fosfatasa, fosfolambano, serca2a, catalasa, tirosina hidroxilasa, superóxido dismutasa, leptina, proteína RP65, galanina, α -L-iduronidasa, una hormona incluyendo insulina o somatotropina, galactocerebrosidasa, fenilalanina hidroxilasa, receptor de LDL, CD4 soluble, productos génicos anti-apoptóticos, receptor de glutamato, una linfoquina, barkct, receptor adrenérgico $\beta 2$, cal sarcina, enos, inos, un sarcoglicano, receptor de Fc, receptor de células T, ApoE, ApoC, un producto de genes suicidas, un producto de genes supresores de tumores, y cualquier combinación de los mismos.

35 19. El vector viral quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un ARN no traducido, opcionalmente un ARN antisentido o un ARN de interferencia (ARNi).

40 20. El vector viral quimérico de la reivindicación 19, donde el ARN no traducido está dirigido a VEGF, el producto génico de resistencia a múltiples fármacos, miostatina, o repeticiones en el producto génico de la Enfermedad de Huntington.

21. Una composición farmacéutica que comprende el vector viral quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 en un portador farmacéuticamente aceptable.

45 22. Un método de administración *in vitro* de un ácido nucleico a una célula, que comprende poner en contacto la célula con el vector viral quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 21.

23. El vector viral quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-20 para su uso como medicamento.

	1	10	20	30	40	50	60	70
AAV1	(1)	MAADG	YLPD	WLED	NLSE	GIRE	WDLK	P
AAV7	(1)	MAADG	YLPD	WLED	NLSE	GIRE	WDLK	P
AAV2	(1)	MAADG	YLPD	WLED	NLSE	GIRE	WDLK	P
AAV8	(1)	MAADG	YLPD	WLED	NLSE	GIRE	WDLK	P
AAV1	(71)	AALEH	KAYD	QQLK	AGDN	PYL	R	Y
AAV7	(71)	AALEH	KAYD	QQLK	AGDN	PYL	R	Y
AAV2	(71)	AALEH	KAYD	QQLK	AGDN	PYL	R	Y
AAV8	(71)	AALEH	KAYD	QQLK	AGDN	PYL	R	Y
AAV1	(141)	GKKRP	VEQ	SPQE	-PD	SSG	I	G
AAV7	(141)	GKKRP	VEQ	SPQS	PD	SSG	I	G
AAV2	(141)	GKKRP	VEH	SPVE	-PD	SSG	I	G
AAV8	(141)	GKKRP	VEP	SPQS	PD	SSG	I	G
AAV1	(210)	PMADN	NEG	ADG	VGN	ASG	N	W
AAV7	(211)	PMADN	NEG	ADG	VGN	ASG	N	W
AAV2	(210)	PMADN	NEG	ADG	VGN	ASG	N	W
AAV8	(211)	PMADN	NEG	ADG	VGN	ASG	N	W
AAV1	(279)	PWGYF	DFN	RFH	CHF	SPR	D	W
AAV7	(280)	PWGYF	DFN	RFH	CHF	SPR	D	W
AAV2	(278)	PWGYF	DFN	RFH	CHF	SPR	D	W
AAV8	(281)	PWGYF	DFN	RFH	CHF	SPR	D	W
AAV1	(349)	YQLP	YV	L	G	S	A	H
AAV7	(350)	YQLP	YV	L	G	S	A	H
AAV2	(348)	YQLP	YV	L	G	S	A	H
AAV8	(351)	YQLP	YV	L	G	S	A	H

FIG. 1A

AAV1	(419)	421	430	440	450	460	470	480	490																																																									
AAV7	(420)	VPFHSSY	AHSOSL	DRLMNP	LIDQYL	YINR	TONQ	SGS	QNK	LLF	SRG	SP	AG	MS	V	Q	PK	NW	L	PG	PC	YR	Q																																											
AAV2	(418)	VPFHSSY	AHSOSL	DRLMNP	LIDQYL	YIA	RTOS	PG	T	AG	N	RE	L	Q	F	Y	O	G	P	S	T	M	A	E	Q	A	K	N	W	L	P	G	P	C	F	R	Q																													
AAV8	(421)	VPFHSSY	AHSOSL	DRLMNP	LIDQYL	YLS	R	T	N	P	L	S	G	T	O	S	R	L	O	F	S	O	A	G	A	S	D	I	R	D	O	S	R	N	W	L	P	G	P	C	Y	R	Q																							
		VPFHSSY	AHSOSL	DRLMNP	LIDQYL	YLS	A	T	O	T	I	G	T	A	N	T	O	L	G	F	S	O	G	G	P	N	T	M	A	N	Q	A	K	N	W	L	P	G	P	C	Y	R	Q																							
AAV1	(488)	491	500	510	520	530	540	550	560																																																									
AAV7	(490)	RVSK	KT	Q	NN	N	S	N	F	T	W	G	A	S	K	N	L	N	G	R	E	S	I	I	N	P	G	T	A	M	A	S	H	K	D	E	D	E	K	F	F	P	M	S	G	V	M	I	F	G	K	E	S	A	G	A	S	N	T	A	L	D				
AAV2	(487)	RVSK	L	D	Q	NN	N	S	N	F	A	W	T	G	A	T	K	Y	H	L	N	G	R	N	S	L	V	N	P	Q	V	A	M	A	T	H	K	D	E	D	E	R	F	F	P	S	S	G	V	L	I	F	G	-	K	T	C	A	T	N	K	T	L	E		
AAV8	(490)	RVSK	T	S	A	NN	N	S	E	Y	S	W	T	G	A	T	K	Y	H	L	N	G	R	D	S	L	V	N	P	Q	P	A	M	A	S	H	K	D	E	E	K	F	F	P	O	S	G	V	L	I	F	G	K	O	S	E	K	I	N	V	D	I	E			
		RVST	T	N	G	Q	NN	N	S	N	F	A	W	T	A	G	T	K	Y	H	L	N	G	R	N	S	L	A	N	P	Q	V	A	M	A	T	H	K	D	E	E	R	F	F	P	S	N	G	L	I	F	G	K	O	N	A	A	R	D	A	D	Y	S			
AAV1	(558)	561	570	580	590	600	610	620	630																																																									
AAV7	(559)	VMT	D	E	E	E	I	A	T	N	P	V	A	T	E	R	F	G	T	V	A	V	N	F	O	S	S	T	D	P	A	T	G	D	V	H	A	M	G	A	L	P	G	M	V	Q	D	R	D	V	Y	L	O	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D		
AAV2	(557)	VMT	N	E	E	E	I	R	P	T	N	P	V	A	T	E	E	G	I	V	S	S	N	L	O	A	A	N	T	A	Q	T	O	V	N	N	O	G	A	L	P	G	M	W	Q	N	R	D	V	Y	L	O	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D			
AAV8	(560)	VMT	D	E	E	E	I	R	T	N	P	V	A	T	E	O	Y	G	S	V	S	I	N	L	O	R	G	N	R	O	A	A	T	A	D	V	N	T	O	G	V	L	P	G	M	W	Q	D	R	D	V	Y	L	O	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	
		VML	T	S	E	E	E	I	R	T	N	P	V	A	T	E	E	G	I	V	A	D	N	L	O	O	N	T	A	P	Q	I	G	I	V	N	S	O	G	A	L	P	G	M	W	Q	N	R	D	V	Y	L	O	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D		
AAV1	(628)	631	640	650	660	670	680	690	700																																																									
AAV7	(629)	HFH	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	N	P	P	P	O	I	L	I	K	N	T	P	V	P	A	N	P	A	E	F	S	A	T	K	F	A	S	F	I	T	O	Y	S	T	G	O	V	S	E	I	E	W	E	L	O	K	E	N	S	K	R	W	N
AAV2	(627)	HFH	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P	O	I	L	I	K	N	T	P	V	P	A	N	P	E	V	H	T	P	A	K	F	A	S	F	I	T	O	Y	S	T	G	O	V	S	E	I	E	W	E	L	O	K	E	N	S	K	R	W	
AAV8	(630)	HFH	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P	O	I	L	I	K	N	T	P	V	P	A	N	P	S	T	H	S	A	A	K	F	A	S	F	I	T	O	Y	S	T	G	O	V	S	E	I	E	W	E	L	O	K	E	N	S	K	R	W	
		NFH	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P	O	I	L	I	K	N	T	P	V	P	A	D	P	A	T	T	N	O	S	K	L	N	S	F	I	T	O	Y	S	T	G	O	V	S	E	I	E	W	E	L	O	K	E	N	S	K	R	W	
AAV1	(698)	701	710	720	730	740																																																												
AAV7	(699)	E	V	Q	T	S	N	Y	A	K	S	A	N	V	D	F	T	V	A	N	G	L	Y	T	E	P	R	P	I	G	T	R	Y	L	T	R	N	L	-																											
AAV2	(697)	E	I	Q	T	S	N	Y	E	K	O	T	G	V	D	F	A	V	D	S	O	G	V	Y	S	E	P	R	P	I	G	T	R	Y	L	T	R	N	L	-																										
AAV8	(700)	E	I	Q	T	S	N	Y	N	K	S	V	N	V	D	F	T	V	A	N	G	V	Y	S	E	P	R	P	I	G	T	R	Y	L	T	R	N	L																												
		E	I	Q	T	S	N	Y	V	K	S	T	S	V	D	F	A	V	N	T	E	G	V	Y	S	E	P	R	P	I	G	T	R	Y	L	T	R	N	L																											

FIG. 1B

AAV1	1	.10	.20	.30	.40	.50	.60	.70
AAV2		MAADG	YLPD	WLED	NLSE	GIRE	WMDL	KPGAP
		MAADG	YLPD	WLED	NLSE	GIRE	WMDL	KPGAP
AAV1	71	.80	.90	1.00	1.10	1.20	1.30	1.40
AAV2		AALEH	KAYD	QDLK	AGDN	PYLRY	NHADA	EAFQ
		AALEH	KAYD	QDLK	AGDN	PYLRY	NHADA	EAFQ
AAV1	141	.150	.160	.170	.180	.190	.200	.210
AAV2		GKKRP	VEOS	POEP	DSSG	IGK	TGOO	PAK
		GKKRP	VEOS	POEP	DSSG	IGK	TGOO	PAK
AAV1	211	.220	.230	.240	.250	.260	.270	.280
AAV2		MADN	EGAD	CVGN	ASGN	WHCD	STWL	GDRV
		MADN	EGAD	CVGN	ASGN	WHCD	STWL	GDRV
AAV1	281	.290	.300	.310	.320	.330	.340	.350
AAV2		GYFD	FNRF	CHFS	PRDW	ORLI	NNNW	GFPR
		GYFD	FNRF	CHFS	PRDW	ORLI	NNNW	GFPR
AAV1	351	.360	.370	.380	.390	.400	.410	.420
AAV2		LPYV	LGS	AHQ	GCLP	PPF	ADV	FMT
		LPYV	LGS	AHQ	GCLP	PPF	ADV	FMT
AAV1	421	.430	.440	.450	.460	.470	.480	.490
AAV2		FHSS	YHS	OSL	DR	LM	NPL	ID
		FHSS	YHS	OSL	DR	LM	NPL	ID
AAV1	491	.500	.510	.520	.530	.540	.550	.560
AAV2		SKTK	DNN	SN	FT	W	G	SKY
		SKTK	DNN	SN	FT	W	G	SKY
AAV1	561	.570	.580	.590	.600	.610	.620	.630
AAV2		ITD	EE	E	I	K	A	T
		ITD	EE	E	I	K	A	T
AAV1	631	.640	.650	.660	.670	.680	.690	.700
AAV2		HP	S	P	L	M	G	G
		HP	S	P	L	M	G	G
AAV1	701	.710	.720	.730	.740	.750	.760	.770
AAV2		VO	Z	T	S	N	Y	A
		VO	Z	T	S	N	Y	A

FIG. 1C

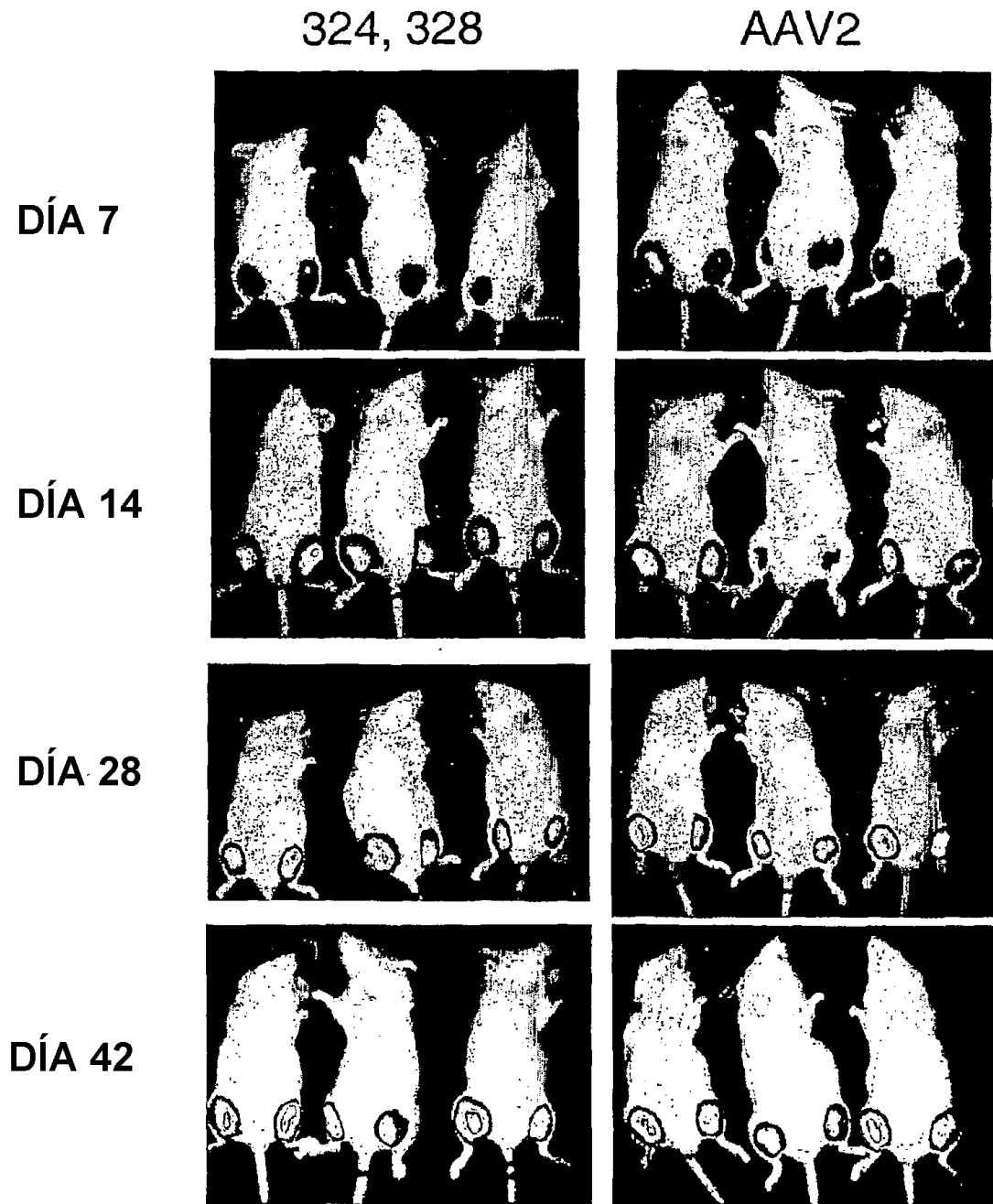


FIG. 2A

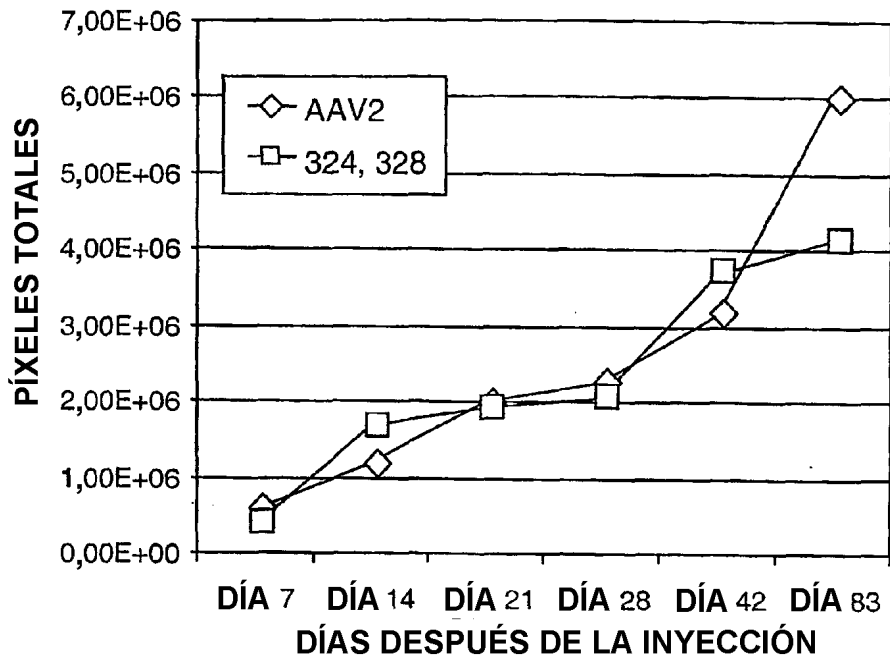


FIG. 2B

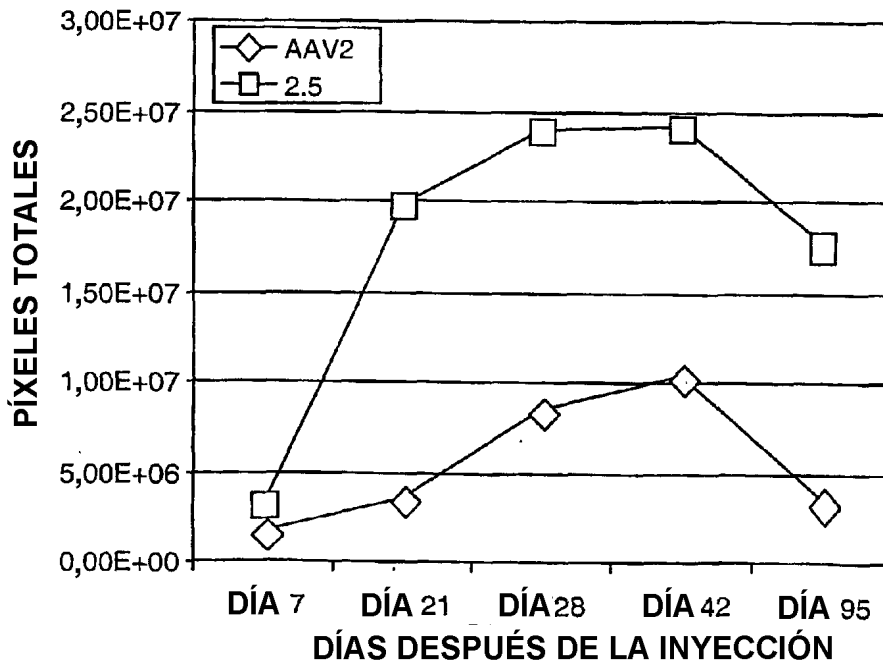


FIG. 3A

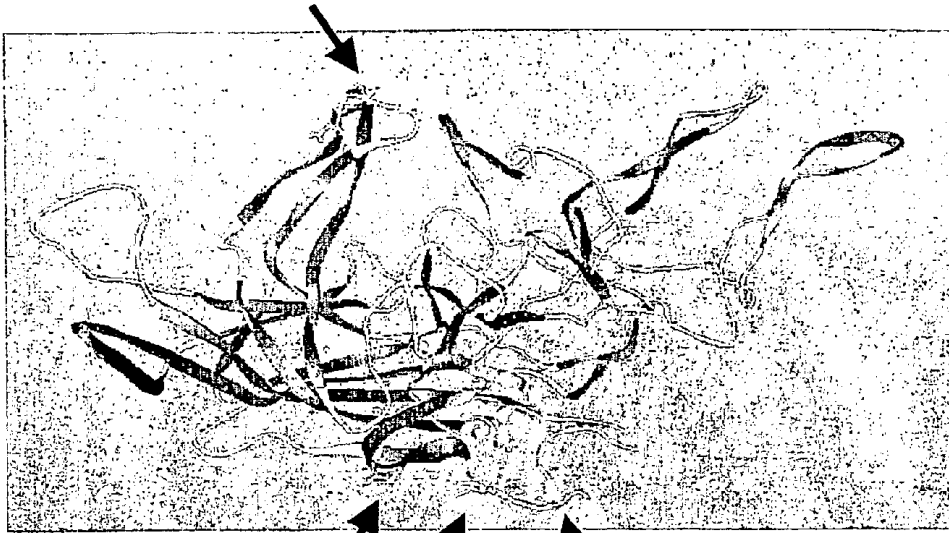


FIG. 3B

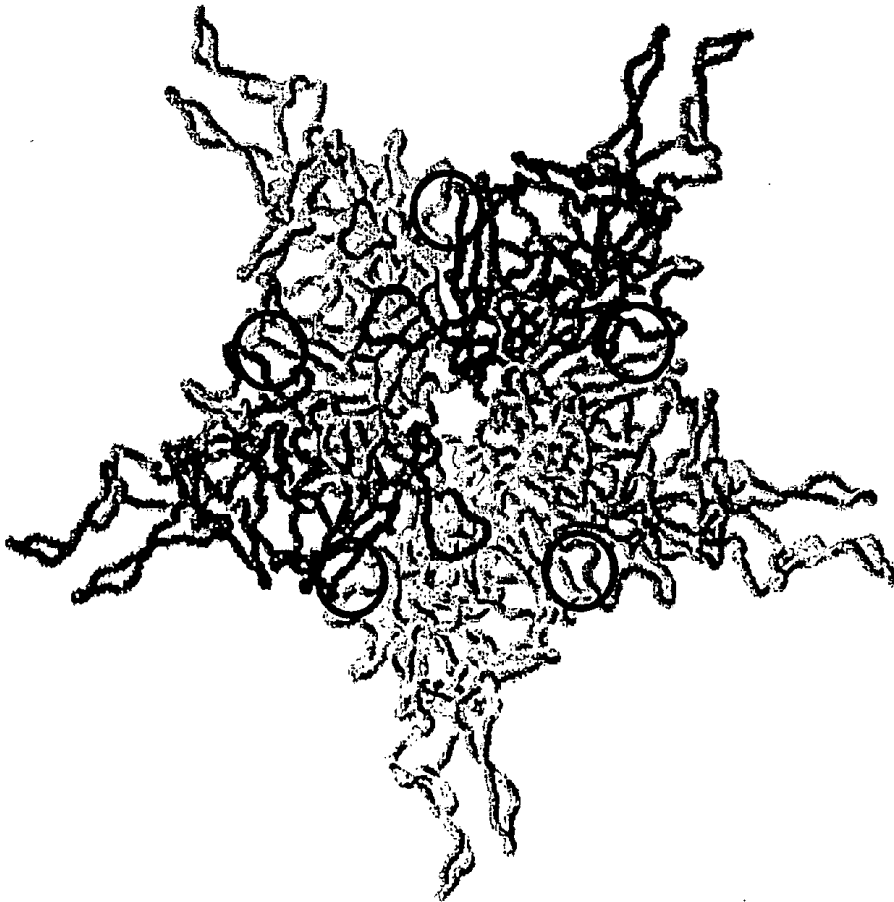
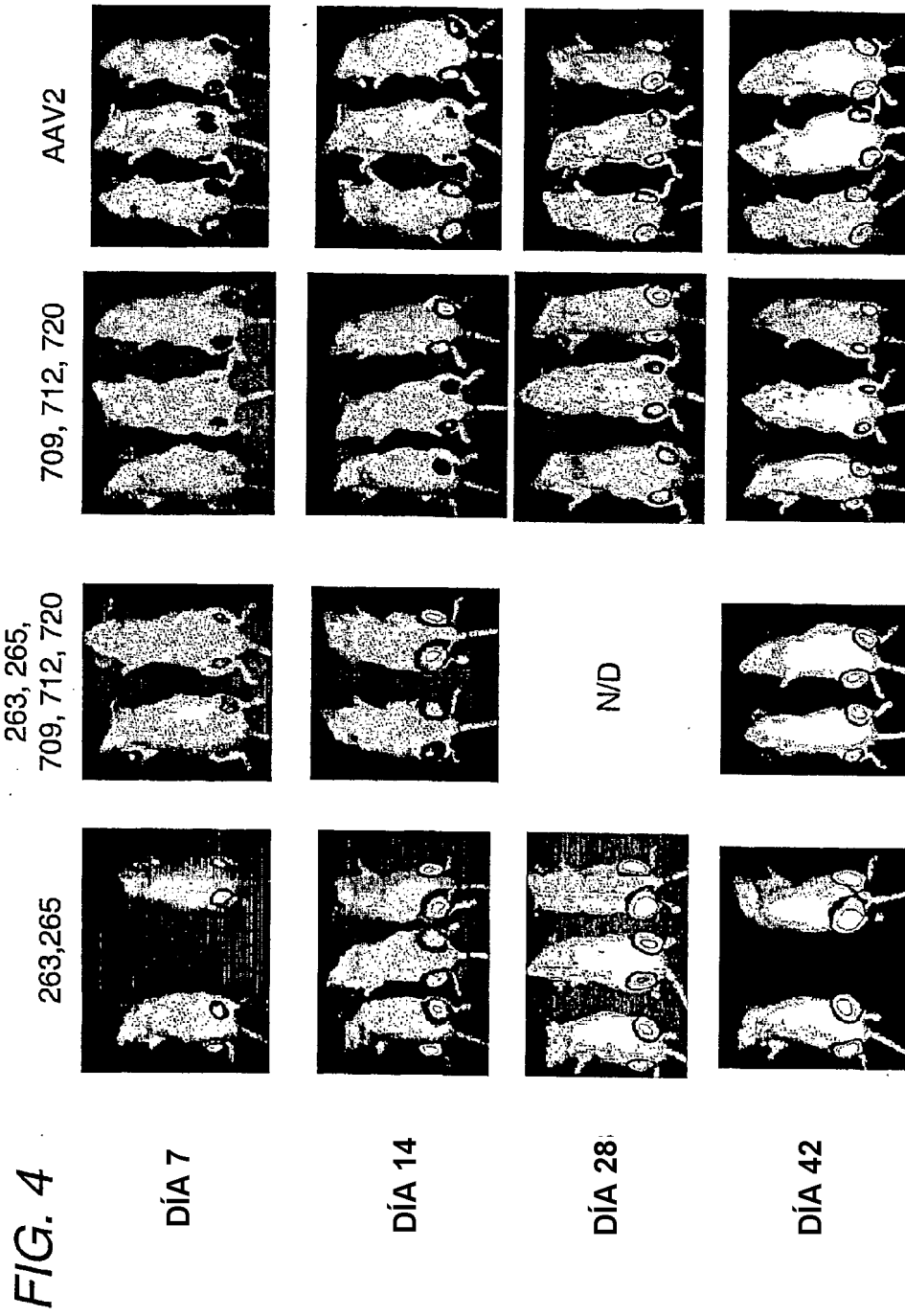


FIG. 3C



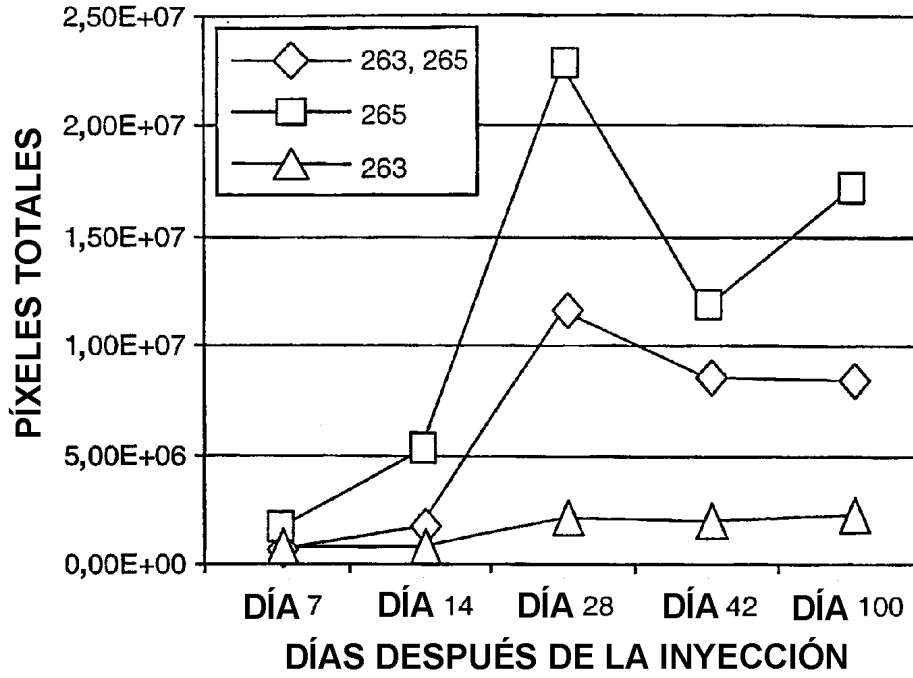


FIG. 5

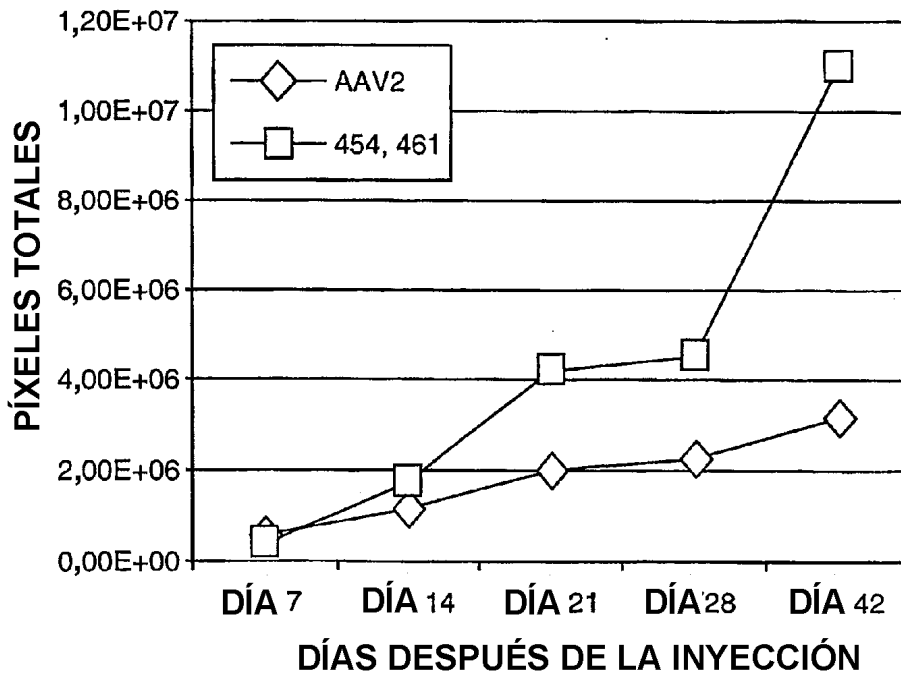


FIG. 6

(220) 220 GADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSAS - TGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF 290
 AAV1 CAP (217) GADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSAS - TGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF
 AAV2 CAP (217) GADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSQS - -GASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF 280
 AAV3A CAP (217) GADGVGNSSGNWHCDSQWLGLDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSQS - -GASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF
 AAV3B CAP (217) GADGVGNSSGNWHCDSQWLGLDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSQS - -GASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF
 AAV4 CAP (211) GADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWLPTVNNHLYKRLGSEL - - - - -QSNVYNGFSTPWGYDFNRF
 AAV5 CAP (207) GADGVGNASGDWHCDSTWMDRVTTKSTRTWLPTVNNHLYKQISSQS - -GASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF
 AAV6 CAP (217) GADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSAS - TGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF
 AAV7 CAP (218) GADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSAS - TGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF
 AAV8 CAP (218) GADGVGSSGNWHCDSTWLGDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSNGTSSGA - - - - -GASNDNHYFGYSTPWGYDFNRF
 AAV9 CAP (217) GADGVGSSGNWHCDSQWLGLDRVITTSRTWALPTVNNHLYKQISSNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFNRF

FIG. 7

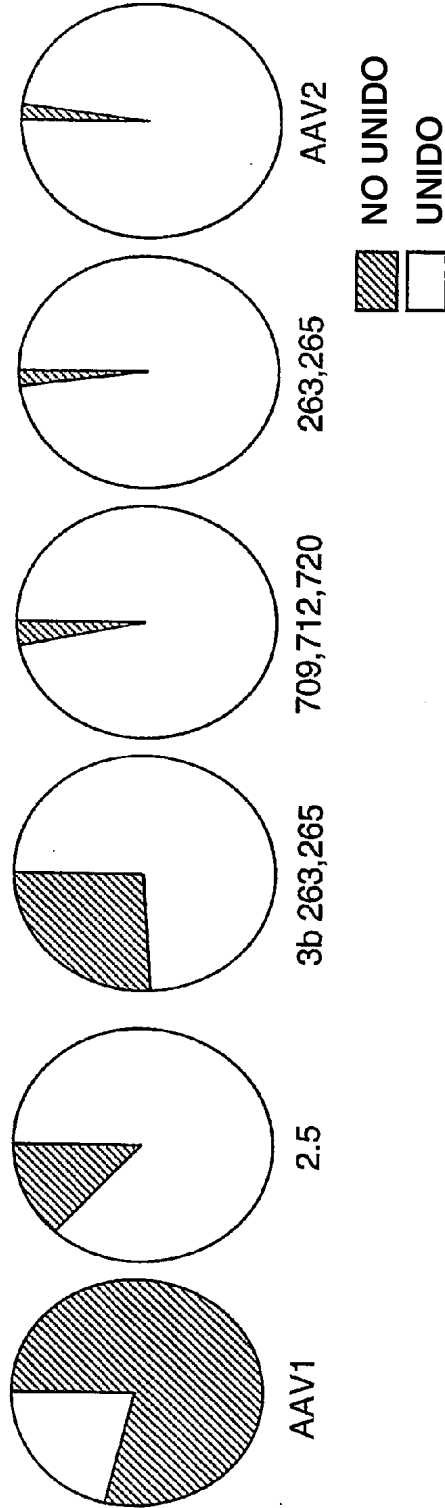


FIG. 8

	1	50
263, 265	(1) MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGY	
AAV2CAP	(1) MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGY	
	51	100
263, 265	(51) KYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF	
AAV2CAP	(51) KYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF	
	101	150
263, 265	(101) QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSP	
AAV2CAP	(101) QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSP	
	151	200
263, 265	(151) VEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGT	
AAV2CAP	(151) VEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGT	
	201	250
263, 265	(201) NTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALP	
AAV2CAP	(201) NTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALP	
	251 * *	300
263, 265	(251) TYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRL	
AAV2CAP	(251) TYNNHLYKQISSQS-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRL	
	301	350
263, 265	(301) INNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ	
AAV2CAP	(300) INNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ	
	351	400
263, 265	(351) LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP	
AAV2CAP	(350) LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP	
	401	450
263, 265	(401) SQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN	
AAV2CAP	(400) SQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTN	
	451	500
263, 265	(451) TPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSE	
AAV2CAP	(450) TPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSE	
	501	550
263, 265	(501) YSWGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEK	
AAV2CAP	(500) YSWGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEK	
	551	600
263, 265	(551) TNVDIEKVMITDEEEIIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQG	
AAV2CAP	(550) TNVDIEKVMITDEEEIIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQG	
	601	650
263, 265	(601) VLPGMVWQDRDVYLQGPWAKI PHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIK	
AAV2CAP	(600) VLPGMVWQDRDVYLQGPWAKI PHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIK	
	651	700
263, 265	(651) NTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ	
AAV2CAP	(650) NTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ	
	701	736
263, 265	(701) YTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL	
AAV2CAP	(700) YTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL	

FIG. 9

ES 2 385 837 T3

	1		50
AAV3bCAP	(1)	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPPQKANQQHQDNRRGLVLPGY	
263, 265	(1)	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPPQKANQQHQDNRRGLVLPGY	
	51		100
AAV3bCAP	(51)	KYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF	
263, 265	(51)	KYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF	
	101		150
AAV3bCAP	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSP	
263, 265	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVDQSP	
	151		200
AAV3bCAP	(151)	QEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPAPAPTSLGS	
263, 265	(151)	QEPDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPAPAPTSLGS	
	201		250
AAV3bCAP	(201)	NTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTTSTRTWALP	
263, 265	(201)	NTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTTSTRTWALP	
	251	* *	300
AAV3bCAP	(251)	TYNNHLYKQISSQS-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRL	
263, 265	(251)	TYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRL	
	301		350
AAV3bCAP	(300)	INNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQ	
263, 265	(301)	INNNWGFPRPKLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQ	
	351		400
AAV3bCAP	(350)	LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP	
263, 265	(351)	LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP	
	401		450
AAV3bCAP	(400)	SQMLRTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTO	
263, 265	(401)	SQMLRTGNNFQFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTO	
	451		500
AAV3bCAP	(450)	GTTSGTTNQSRLLF SQAGPQSM SLQARNWLPGPCYRQORLSKTANDNNNS	
263, 265	(451)	GTTSGTTNQSRLLF SQAGPQSM SLQARNWLPGPCYRQORLSKTANDNNNS	
	501		550
AAV3bCAP	(500)	NFPWTAASKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPMHGNI LFGKEGTT	
263, 265	(501)	NFPWTAASKYHLNGRDSL VNP GPAMASHKDDEEKFFPMHGNI LFGKEGTT	
	551		600
AAV3bCAP	(550)	ASNAELDNVMITDEEEIRT TNPVATEQYGT VANNLQSSNTAPTTRTVNDQ	
263, 265	(551)	ASNAELDNVMITDEEEIRT TNPVATEQYGT VANNLQSSNTAPTTRTVNDQ	
	601		650
AAV3bCAP	(600)	GALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHP SPLMGGFGLKHPPPQIMI	
263, 265	(601)	GALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHP SPLMGGFGLKHPPPQIMI	
	651		700
AAV3bCAP	(650)	KNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEI	
263, 265	(651)	KNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEI	
	701		737
AAV3bCAP	(700)	QYTSNYNKS VNVDFTVD TNGVYSEPRPIGTRYLTRNL	
263, 265	(701)	QYTSNYNKS VNVDFTVD TNGVYSEPRPIGTRYLTRNL	

FIG. 10

	1		50
2.5CAP	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLPKGP PPPKPAERHKDDSRGLVLPGY	
AAV2CAP	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLPKGP PPPKPAERHKDDSRGLVLPGY	
	51		100
2.5CAP	(51)	KYLGPFNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF	
AAV2CAP	(51)	KYLGPFNGLDKGEVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF	
	101		150
2.5CAP	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSP	
AAV2CAP	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSP	
	151		200
2.5CAP	(151)	VEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGT	
AAV2CAP	(151)	VEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGT	
	201		250
2.5CAP	(201)	NTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALP	
AAV2CAP	(201)	NTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTTSTRTWALP	
	251	* *	300
2.5CAP	(251)	TYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRL	
AAV2CAP	(251)	TYNNHLYKQISSQS-GASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRL	
	301		350
2.5CAP	(301)	INNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ	
AAV2CAP	(300)	INNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQ	
	351		400
2.5CAP	(351)	LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP	
AAV2CAP	(350)	LPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPOYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP	
	401		450
2.5CAP	(401)	SQMLRTGNNTFSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTN	
AAV2CAP	(400)	SQMLRTGNNTFSYTFEDVFPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTN	
	451		500
2.5CAP	(451)	TPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSE	
AAV2CAP	(450)	TPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSE	
	501		550
2.5CAP	(501)	YSWTGATKYHLNCRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEK	
AAV2CAP	(500)	YSWTGATKYHLNCRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEK	
	551		600
2.5CAP	(551)	TNVDIEKVMITDEEEIIRTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQG	
AAV2CAP	(550)	TNVDIEKVMITDEEEIIRTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQG	
	601		650
2.5CAP	(601)	VLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK	
AAV2CAP	(600)	VLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK	
	651		700
2.5CAP	(651)	NTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ	
AAV2CAP	(650)	NTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQ	
	701	* * *	736
2.5CAP	(701)	YTSNYAKSANVDFTVDNMGVYSEPRPIGTRYLTRNL	
AAV2CAP	(700)	YTSNYNKS VNVDFTVDNMGVYSEPRPIGTRYLTRNL	

FIG. 11

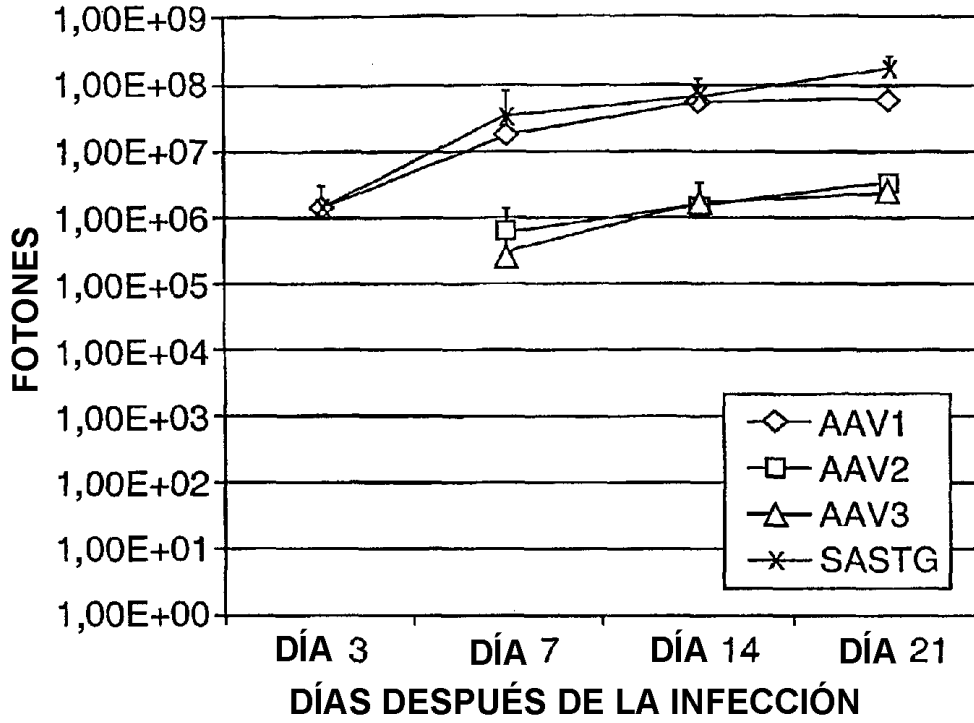


FIG. 12

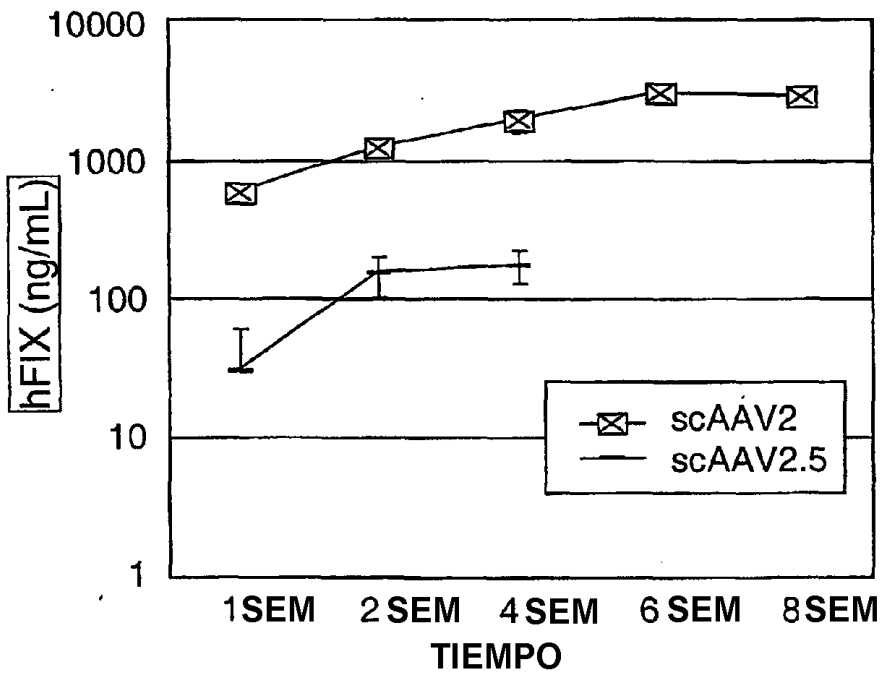


FIG. 13

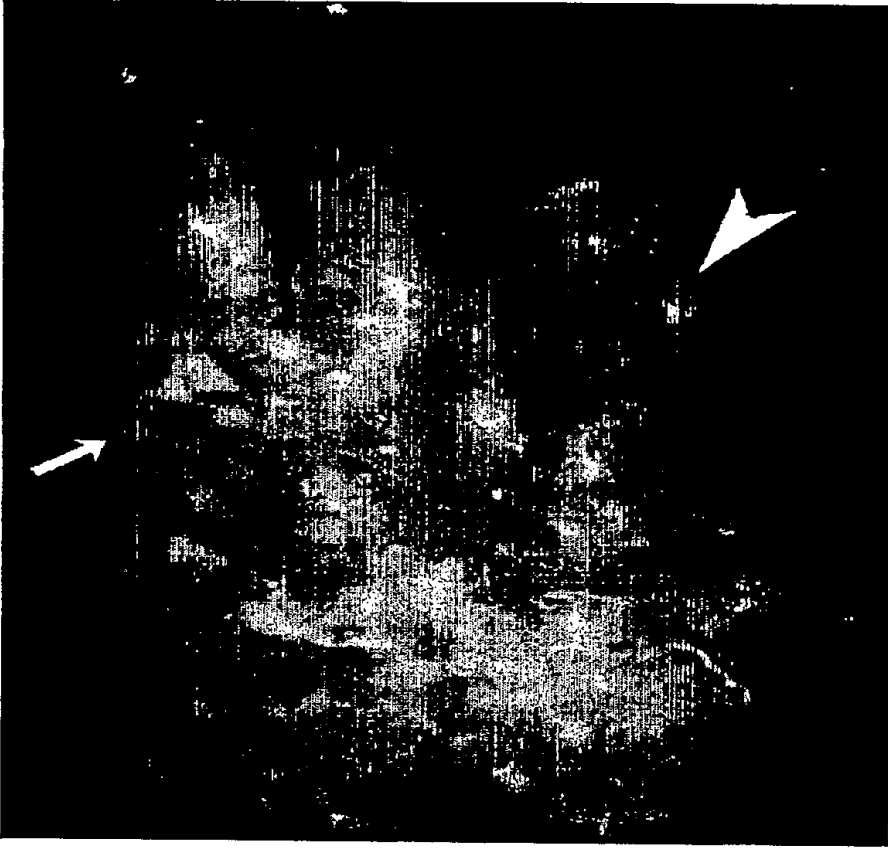


FIG. 14