

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 064**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2004 E 04755800 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 1633772**

54 Título: **Viriones de AAV con inmunorreactividad reducida y usos de los mismos**

30 Prioridad:

19.06.2003 US 480395 P

30.04.2004 US 567310 P

03.06.2004 US 576501 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2016

73 Titular/es:

**AVIGEN, INC. (100.0%)
1301 Harbor Bay Parkway
Alameda, CA 94502, US**

72 Inventor/es:

**ARBETMAN, ALEJANDRA ELENA;
COLOSI, PETER;
LOCHRIE, MICHAEL A. y
SUROSKY, RICHARD T.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 563 064 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

Viriones de AAV con inmunorreactividad reducida y usos de los mismos

CAMPO TÉCNICO

5 La presente descripción se refiere, en general, a composiciones y métodos para suministrar viriones de virus adeno-asociado recombinantes (rAAV) a las células. En particular, la presente invención pertenece a viriones de rAAV con inmunorreactividad reducida (viriones de rAAV mutantes) y a métodos de fabricar y utilizar los mismos.

ANTECEDENTES

10 Los científicos están descubriendo continuamente genes que están asociados con enfermedades humanas tales como diabetes, hemofilia y el cáncer. Los esfuerzos de investigación también han descubierto genes tales como eritropoyetina (que aumenta la producción de glóbulos rojos), que no están asociados con trastornos genéticos, pero que, en su lugar, codifican las proteínas que se pueden utilizar para tratar numerosas enfermedades. A pesar del progreso significativo en el esfuerzo por identificar y aislar genes, sin embargo, un obstáculo importante frente a la industria biofarmacéutica es cómo suministrar de forma segura y persistente cantidades terapéuticamente eficaces de los productos de genes a los pacientes.

15 Generalmente, los productos proteicos de estos genes se sintetizan en células cultivadas de bacterias, levaduras, insectos, mamíferos, u otras células y se suministran a los pacientes mediante inyección directa. La inyección de proteínas recombinantes ha tenido éxito, pero adolece de varios inconvenientes. Por ejemplo, los pacientes requieren a menudo semanalmente, y a veces a diario, inyecciones con el fin de mantener los niveles necesarios de la proteína en el torrente sanguíneo. Incluso entonces, la concentración de proteína no se mantiene a niveles fisiológicos - el nivel de la proteína es por lo general anormalmente alto inmediatamente después de la inyección, y está muy por debajo de los niveles óptimos antes de la inyección. Adicionalmente, el suministro inyectado de proteína recombinante no puede suministrar a menudo la proteína a las células, tejidos u órganos dianas en el cuerpo. Y, si la proteína alcanza su objetivo con éxito, se puede diluir hasta un nivel no terapéutico. Además, el método es inapropiado y, a menudo, limita el estilo de vida del paciente.

25 Estas deficiencias han alimentado el deseo de desarrollar métodos de terapia génica para suministrar niveles sostenidos de proteínas específicas a los pacientes. Estos métodos están diseñados para permitir a los médicos introducir ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un ácido nucleico, tal como un gen terapéutico, directamente en un paciente (en la terapia génica *in vivo*) o en células aisladas de un paciente o de un donante (terapia génica *ex vivo*). El ácido nucleico introducido dirige entonces las células propias del paciente o las células injertadas para producir el producto proteico deseado. El suministro de genes, por lo tanto, evita la necesidad de inyecciones frecuentes. La terapia génica también puede permitir a los médicos seleccionar órganos específicos o dianas celulares (p. ej., los músculos, células de la sangre, células del cerebro, etc.) para la terapia.

35 ADN se puede introducir en células de un paciente de varias maneras. Existen métodos de transfección, incluyendo métodos químicos tales como precipitación con fosfato cálcico y transfección mediada por liposomas, y métodos físicos tales como la electroporación. En general, los métodos de transfección no son adecuados para el suministro de genes *in vivo*. También existen métodos que utilizan virus recombinantes. Vectores actuales de suministro de genes mediado por virus incluyen los basados en retrovirus, adenovirus, virus herpes, virus de la viruela y virus adeno-asociados (AAV). Al igual que los retrovirus, y a diferencia de los adenovirus, el AAV tiene la capacidad de integrar su genoma en un cromosoma de la célula huésped.

40 Terapia Génica Mediada por Virus Adeno-Asociado

El AAV es un parvovirus que pertenece al género Dependovirus, y tiene varias características atractivas que no se encuentran en otros virus. Por ejemplo, el AAV puede infectar una amplia gama de células huésped, incluyendo células que no se dividen. El AAV también puede infectar células de diferentes especies. Es importante destacar que el AAV no ha sido asociado con ninguna enfermedad humana o animal, y no parece alterar las propiedades fisiológicas de la célula huésped tras la integración. Además, el AAV es estable en una amplia gama de condiciones físicas y químicas, lo cual se presta por sí mismo a los requisitos de producción, almacenamiento y transporte.

El genoma de AAV, una molécula de ADN de cadena sencilla, lineal, que contiene aproximadamente 4700 nucleótidos (el genoma de AAV-2 consiste en 4681 nucleótidos), generalmente comprende un segmento interno no repetido, flanqueado en cada uno de los extremos por repeticiones terminales invertidas (ITRs). Las ITRs son de

aproximadamente 145 nucleótidos de longitud (AAV-1 tiene ITRs de 143 nucleótidos) y tienen múltiples funciones, incluyendo el servir como orígenes de replicación, y como señales de envasado para el genoma viral.

5 La parte interna no repetida del genoma incluye dos grandes marcos de lectura abiertos (ORFs), conocidos como las regiones de replicación (*rep*) y cápside (*cap*) de AAV. Estos ORFs codifican productos génicos de replicación y de la cápside, respectivamente: los productos génicos de replicación y de la cápside (es decir, proteínas) permiten la replicación, el ensamblaje y el empaquetado de un virión de AAV completo. Más específicamente, una familia de al menos cuatro proteínas virales se expresa de la región *rep* de AAV: Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40, todas las cuales se nombran por sus pesos moleculares aparentes. La región *cap* de AAV codifica al menos tres proteínas: VP1, VP2 y VP3.

10 En la naturaleza, AAV es un virus dependiente de virus helper o auxiliar, es decir, requiere la co-infección con un virus helper (p. ej., adenovirus, virus herpes o virus vacuna) con el fin de formar viriones AAV funcionalmente completos. En ausencia de co-infección con un virus helper, AAV establece un estado latente en el que el genoma viral se inserta en un cromosoma de la célula huésped o existe en una forma episomal, pero no se producen viriones infecciosos. La infección subsiguiente por un virus helper "rescata" el genoma integrado, permitiendo que se replique y empaquete en cápsides virales, reconstituyendo de este modo el virión infeccioso. Mientras que AAV puede infectar células de diferentes especies, el virus helper debe ser de la misma especie que la célula huésped. Así, por ejemplo, AAV humano se replicará en células caninas que han sido co-infectadas con un adenovirus canino.

20 Para construir AAV recombinante infeccioso (rAAV) que contiene un ácido nucleico, una línea de células huéspedes adecuada se transfecta con un vector de AAV que contiene un ácido nucleico. Funciones helper de AAV y funciones accesorias se expresan entonces en la célula huésped. Una vez que estos factores se reúnen, el HNA se replica y se empaqueta como si fuera un genoma de AAV de tipo salvaje (*wt*), formando un virión recombinante. Cuando las células de un paciente se infectan con el rAAV resultante, el HNA penetra y se expresa en las células del paciente. Debido a que las células del paciente carecen de los genes *rep* y *cap*, así como los genes funcionales accesorios de adenovirus, los rAAV son defectuosos en la replicación; es decir, que no pueden replicarse más y empaquetar sus genomas. De manera similar, sin una fuente de genes *rep* y *cap*, wtAAV no se puede formar en las células del paciente.

30 Existen varios serotipos de AAV que infectan a los seres humanos, así como a otros primates y mamíferos. Se han identificado ocho serotipos principales, AAV-1 a AAV-8, incluyendo dos serotipos aislados recientemente de monos rhesus. Gao et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 11854-11859. De esos serotipos, AAV-2 es el mejor caracterizado, habiendo sido utilizado para suministrar con éxito transgenes a varias líneas celulares, tipos de tejidos y órganos en una diversidad de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los diversos serotipos de AAV se pueden distinguir unos de otros utilizando anticuerpos monoclonales o mediante el empleo de análisis de la secuencia de nucleótidos; p. ej., AAV-1, AAV-2, AAV-3 y AAV-6 son un 82% idénticos al nivel de nucleótidos, mientras que AAV-4 es un 75 a 78% idéntico a los otros serotipos (Russell et al. (1998) *J. Virol.* 72: 309-319). Se observa una significativa variación de la secuencia de nucleótidos para las regiones del genoma de AAV que codifican proteínas de la cápside. Estas regiones variables pueden ser responsables de las diferencias en la reactividad serológica a las proteínas de la cápside de los diversos serotipos de AAV.

40 Después de un tratamiento inicial con un serotipo de AAV dado, se hacen a menudo anticuerpos neutralizantes anti-cápside de AAV que impiden tratamientos subsiguientes por el mismo serotipo. Por ejemplo, Moskalenko et al. *J. Virol.* (2000) 74: 1761-1766 demostraron que ratones con anticuerpos anti AAV-2 pre-existentes, cuando se administra Factor IX en un virión de AAV-2 recombinante, fracasaron en expresar el transgén Factor IX, sugiriendo que los anticuerpos anti-AAV-2 anticuerpos bloqueaban la transducción del virión rAAV-2. Halbert et al. *J. Virol.* (1998) 72: 9795-9805 informó sobre resultados similares. Otros han demostrado una readministración con éxito de viriones de rAAV-2 en animales de experimentación, pero sólo después de que se logra la supresión inmune (véase, p. ej., Halbert et al., *supra*).

50 Por lo tanto, el uso de rAAV para la terapia génica humana es potencialmente problemático, ya que los anticuerpos anti-AAV predominan en poblaciones humanas. La infección de los seres humanos por una diversidad de serotipos de AAV se produce en la infancia, y posiblemente incluso en el útero. De hecho, un estudio estimó que al menos el 80% de la población general ha sido infectada con AAV-2 (Berns y Linden (1995) *Bioessays* 17: 237-245). Anticuerpos anti-AAV-2 neutralizantes se han encontrado en al menos el 20-40% de los seres humanos. Los estudios de los autores de la invención han demostrado que, de un grupo de 50 hemofílicos, aproximadamente el 40% tenían capacidad de neutralización de AAV-2 superior a 1×10^{13} partículas virales/ml, o aproximadamente 6×10^{16} partículas virales/volumen total de sangre. Además, la mayoría del grupo con altos títulos anti-AAV-2 también tenía títulos significativos contra otros serotipos de AAV tales como AAV-1, AAV-3, AAV-4, AAV-5 y AAV-6. Por lo tanto, la identificación de mutantes de AAV con inmunorreactividad reducida, tales como mutantes que no son neutralizados

por anticuerpos anti-AAV pre-existentes, sería un avance significativo en la técnica. Mutantes de AAV de este tipo se describen en esta memoria.

Wu et al. (2000) J. Virology, Vol. 74, N° 18, 8635-8647 establece que los autores han construido 93 mutantes en 59 posiciones diferentes en el gen de la cápside de AAV mediante mutagénesis dirigida al sitio, con el fin de obtener un mapa genético completo del gen AAV.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente descripción se basa en el descubrimiento de nuevas secuencias de AAV tales como secuencias de AAV mutadas, que proporcionan viriones de AAV recombinantes con una inmunorreactividad reducida en comparación con el serotipo nativo correspondiente, pero que conservan la capacidad de transducir eficazmente células y tejidos. Los viriones de rAAV con inmunorreactividad reducida son especialmente útiles para suministrar moléculas heterólogas de ácidos nucleicos (HNAs) a sujetos que han estado expuestos previamente a AAV, ya sea por infección natural o debido a la terapia génica anterior o tratamientos de inmunización de ácido nucleico y, por lo tanto, desarrollaron anticuerpos anti-AAV. Los viriones de rAAV descritos en esta memoria son, por lo tanto, útiles para tratar o prevenir una amplia diversidad de trastornos, como se describe más adelante, en sujetos vertebrados que han sido expuestos previamente a cualquiera de los diversos serotipos de AAV. De acuerdo con la presente descripción, a continuación, se proporcionan los métodos y vectores de AAV para uso en los mismos para el suministro eficiente de HNAs a las células o el tejido de un sujeto vertebrado tal como un mamífero, utilizando viriones de AAV recombinantes.

En determinadas realizaciones preferidas, la presente descripción proporciona el uso de viriones de AAV que contienen proteínas de la cápside alteradas para suministrar un HNA que codifica ARN antisentido, ribozimas, o uno o más genes que expresan proteínas, en donde la expresión de dicho ARN antisentido, ribozimas, o uno o más genes proporciona un efecto biológico en un sujeto mamífero. En una realización, los viriones de rAAV que contienen un HNA se inyectan directamente en un músculo (p. ej., cardíaco, liso y/o esquelético). En otra realización, los viriones de rAAV que contienen un HNA se administran en la vasculatura a través de inyección en venas, arterias u otros conductos vasculares, o mediante el uso de técnicas tales como la perfusión de extremidad aislada.

En ejemplos adicionales, los viriones contienen un gen que codifica una proteína de coagulación de la sangre que, cuando se expresa en una concentración suficiente, prevé un efecto terapéutico tal como una eficiencia de la coagulación de la sangre mejorada de un mamífero que padece un trastorno de la coagulación de la sangre. El trastorno de la coagulación de la sangre puede ser cualquier trastorno que afecta negativamente a la capacidad del organismo para coagular la sangre. Preferiblemente, el trastorno de coagulación de la sangre es la hemofilia. En un caso, entonces el gen que codifica una proteína de la coagulación de la sangre es un gen del Factor VIII tal como el gen del Factor VIII humano o una derivación del mismo. En otro caso, el gen que codifica una proteína de la coagulación de la sangre es un gen del Factor IX tal como el gen del Factor IX humano (hF IX).

Por consiguiente, en un caso, la presente descripción está dirigida a una proteína de la cápside de AAV mutado que, cuando está presente en un virión de AAV, imparte una inmunorreactividad reducida al virión en comparación con el correspondiente virión de tipo salvaje. La mutación puede comprender al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos en la proteína nativa tal como una sustitución en la región de pico o meseta de la superficie del virión de AAV.

En determinados casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución de uno o más de los aminoácidos que se producen en una posición correspondiente a una posición de la cápside VP2 de AAV-2 seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 126, 127, 128, 130, 132, 134, 247, 248, 315, 334, 354, 357, 360, 361, 365, 372, 375, 377, 390, 393, 394, 395, 396, 407, 411, 413, 418, 437, 449, 450, 568, 569 y 571. En casos adicionales, el aminoácido que se produce de forma natural en una o más de estas posiciones está sustituido con una alanina. En casos adicionales, la proteína comprende, además, una sustitución de histidina para el aminoácido que se produce en la posición correspondiente al aminoácido encontrado en la posición 360 de VP2 de AAV-2 y/o una sustitución de lisina por el aminoácido que aparece en la posición correspondiente al aminoácido que se encuentra en la posición 571 de VP2 de AAV-2.

En casos adicionales, la descripción está dirigida a un polinucleótido que codifica cualquiera de las proteínas mutadas arriba descritas.

En casos adicionales, la descripción está dirigida a un virión de AAV recombinante que comprende cualquiera de las proteínas mutadas arriba descritas. El virión de AAV recombinante puede comprender una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un ARN antisentido o una ribozima, o una molécula de ácido nucleico heterólogo

que codifica una proteína terapéutica unida operativamente a elementos de control capaces de dirigir la transcripción y la traducción *in vivo* de dicha proteína.

Aún en casos adicionales, la descripción está dirigida a un método para suministrar un virión de AAV recombinante a una célula o tejido de un sujeto vertebrado. El método comprende:

- 5 (a) proporcionar un virión de AAV recombinante como arriba;
 (b) suministrar el virión de AAV recombinante a la célula o tejido, con lo que la proteína se expresa a un nivel que proporciona un efecto terapéutico.

En determinados casos, la célula o tejido es una célula o tejido muscular. La célula o tejido muscular se pueden derivar a partir de músculo esquelético.

- 10 En casos adicionales, el virión de AAV recombinante se suministra a la célula o tejido *in vivo*.

En determinados casos, el virión de AAV recombinante se suministra mediante inyección intramuscular, o en el torrente sanguíneo, tal como por vía intravenosa o intra-arterial. En realizaciones adicionales, el virión de AAV recombinante es suministrado al hígado o al cerebro.

En casos adicionales, el virión de AAV recombinante se suministra a dicha célula o tejido *in vitro*.

- 15 En aún casos adicionales, la descripción está dirigida a un método de suministrar un virión de AAV recombinante a una célula o tejido de un sujeto vertebrado. El método comprende:

- (a) proporcionar un virión de AAV recombinante, en donde el virión de AAV comprende
 (i) una proteína de la cápside de virus adeno-asociado (AAV) de mamíferos, no primates que, cuando está presente en un virión de AAV, imparte una inmunorreactividad reducida al virión en comparación con la inmunorreactividad de AAV-2 de primates; y
 (ii) una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína terapéutica unida operativamente a elementos de control capaces de dirigir la transcripción y la traducción *in vivo* de la proteína;
 (b) suministrar el virión de AAV recombinante a la célula o el tejido, con lo que la proteína se expresa a un nivel que proporciona un efecto terapéutico.
- 20
25

En determinados casos, la célula o tejido es una célula o tejido muscular tal como una célula o tejido muscular que se deriva de músculo esquelético.

- 30 El virión de AAV recombinante se suministra a dicha célula o tejido *in vivo* o *in vitro* y puede ser suministrado al sujeto mediante inyección intramuscular, o en el torrente sanguíneo, tal como por vía intravenosa o intra-arterial. En realizaciones adicionales, el virión de AAV recombinante se suministra al hígado o al cerebro.

- Basado en la presente descripción, la presente invención proporciona una proteína de la cápside de virus adeno-asociado (AAV) mutado que, cuando está presente en un virión de AAV imparte una inmunorreactividad reducida al virión en comparación con el correspondiente virión de tipo salvaje, en donde la mutación comprende al menos una sustitución de aminoácido, y en donde la sustitución de aminoácido comprende una sustitución del aminoácido que se produce en la posición correspondiente a la posición 130 de la cápside VP2 de AAV. Aspectos y realizaciones adicionales de la invención se recogen en las reivindicaciones adjuntas.
- 35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- La Figura 1 ilustra la ubicación de una unidad estructural asimétrica (triángulo en blanco) de AAV-2 en la superficie del virus completo (tomado de la Fig. 3a de Xie et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99: 10405-10410). Existen 60 unidades estructurales asimétricas idénticas por virión de AAV. Están expuestos, en diversos grados, en la superficie al menos 145 aminoácidos de un total de 735 en cada uno de los capsómeros de AAV-2.
- 40

- La Figura 2 ilustra la ubicación de algunos de los aminoácidos que fueron mutados tal como se describe en los ejemplos dentro de una unidad asimétrica (triángulo negro) de la estructura de AAV-2. Los aminoácidos que fueron mutados se muestran como modelos que llenan el espacio en negro, mientras que los que no fueron mutados se muestran como modelos de bastón blanco. Está indicada la ubicación de las características de la superficie principal (pico, cilindro, meseta, cañón) y los límites aproximados de estas características se muestran por líneas negras circulares finas. Las regiones de "cañón", que se prevé que sean relativamente inaccesibles para la unión del anticuerpo, están situadas en las áreas entre el pico, el cilindro y la meseta. Los números 2, 3 y 5 representan la posición de los ejes de simetría de 2, 3 y 5 pliegues, respectivamente.
- 45

La Figura 3 indica la ubicación de las mutaciones que tienen un efecto < 10 veces sobre la transducción *in vitro*. Las mutaciones localizadas en los aminoácidos que rellenan el espacio en negro, < 10% de la transducción de tipo salvaje. Los números 2, 3 y 5 representan los ejes de simetría de 2, 3 y 5 pliegues, respectivamente.

5 La Figura 4 indica la ubicación de las mutaciones que tienen un efecto > 10 veces sobre la transducción *in vitro*. Las mutaciones localizadas en los aminoácidos que rellenan el espacio en negro, < 10% de la transducción de tipo salvaje. Los números 2, 3 y 5 representan los ejes de simetría de 2, 3 y 5 pliegues, respectivamente. Se indican los límites aproximados de dos zonas muertas que abarcan el eje de simetría de 2 pliegues.

10 La Figura 5 ilustra la ubicación de algunos de los mutantes de la cápside de AAV-2 defectuosos en la unión a heparina. Los aminoácidos negros designan mutantes defectuosos en heparina identificados en esta memoria. Los aminoácidos negros ilustrados como modelos que rellenan el espacio (347, 350, 356, 375, 395, 448, 451) están en la superficie. Los aminoácidos grises ilustrados como modelos que rellenan el espacio (495, 592) están justo debajo de la superficie. Los números 2, 3 y 5 representan los ejes de simetría de 2, 3 y 5 pliegues, respectivamente. Los mutantes que tienen más de un efecto de 100 veces sobre la unión a heparina están encerrados en círculos.

15 La Figura 6 ilustra la ubicación de algunos de los aminoácidos (modelo de relleno en negro) en la superficie de la cápside de AAV-2 que confieren resistencia a la neutralización por un anticuerpo monoclonal de ratón cuando están mutados individualmente. La caja rectangular representa el tamaño aproximado de un sitio de unión de anticuerpos (25 Å x 35 Å). Los números 2, 3 y 5 representan los ejes de simetría de 2, 3 y 5 pliegues, respectivamente.

20 La Figura 7 ilustra la ubicación de algunos de los aminoácidos (modelo de relleno en negro) en la superficie de la cápside de AAV-2 que confieren resistencia a la neutralización por múltiples antisueros humanos. La caja rectangular representa el tamaño aproximado de un sitio de unión de anticuerpos (25 Å x 35 Å). Los números 2, 3 y 5 representan los ejes de simetría de 2, 3 y 5 pliegues, respectivamente.

La Figura 8 muestra propiedades de titulación de anticuerpos monoclonales de ratón de cuatro mutantes de la cápside de AAV-2 en comparación con AAV-2 con una cápside de tipo salvaje.

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una VP2 de AAV-2 (SEQ ID NO: 12).

25 La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una VP1 de AAV-2 (SEQ ID NO: 13).

La Figura 11 muestra las posiciones relativas de las proteínas VP1, VP2 y VP3 de la cápside de AAV-2. Tal como se muestra en la figura, VP1, VP2 y VP3 comparten los mismos 533 aminoácidos C-terminales que componen VP3. Tal como se muestra en la figura, todos los mutantes de la cápside descritos en esta memoria caen dentro del área compartida.

30 Las Figuras 12A-12B muestran una comparación de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VP1 de AAV de un AAV-5 de primate (SEQ ID NO: 14) y un AAV caprino (SEQ ID NO: 15). La numeración es con relación a la secuencia de longitud completa de AAV-5.

35 La Figura 13 muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos de VP1 de un AAV-5 de primate (SEQ ID NO: 16) y un AAV caprino (SEQ ID NO: 17). Las diferencias de aminoácidos están sombreadas. Cambios conservadores se muestran en color gris claro; los cambios no conservadores se muestran en gris oscuro.

40 Las Figuras 14A-14H muestran una comparación de la secuencia de aminoácidos de VP1s de AAVs que son sensibles o resistentes a la neutralización de anticuerpos de la siguiente manera: AAV-2 de primate (SEQ ID NO: 13), AAV-3B de primate (SEQ ID NO: 18), AAV-6 de primate (SEQ ID NO: 19), AAV-1 de primate (SEQ ID NO: 20), AAV-8 de primate (SEQ ID NO: 21), AAV-4 de primate (SEQ ID NO: 22), AAV-5 de primate (SEQ ID NO: 16) y AAV caprina (cabra) (SEQ ID NO: 17). Línea de parvovirus: *, conservada en casi todos los parvovirus. Línea de neutralización: #, localización de mutaciones individuales en la cápside de AAV-2 identificadas como resistentes a la neutralización por sueros humanos. Línea de Accesibilidad: B, el aminoácido está enterrado entre la superficie interior y exterior; I, el aminoácido se encuentra en la superficie interior; O, el aminoácido se encuentra en la superficie exterior. Línea característica de la superficie: C, cilindro; P, meseta; S, pico; Y, cañón. Línea de ADN: B, posible contacto de base; D, probablemente requerida para la unión de ADN, pero no podrá contactar directamente con el ADN; P, posible contacto de fosfato; R, posible contacto de ribosa. Otros línea: A, ubicación de las mutaciones sencillas que disminuyen la unión y neutralización por anticuerpos monoclonales de ratón A20; H, contacto de heparina en AAV-2; M, posible contacto de Mg²⁺; P, dominio A2 de fosfolipasa.

45

La Figura 15 (SEQ ID NOS: 16 y 17) muestra las posiciones de las diferencias de aminoácidos entre AAV-5 y AAV caprina, respecto a la superficie de la cápside de AAV.

5 La Figura 16 muestra la ubicación predicha de los aminoácidos de superficie que difieren entre AAV-5 y AAV caprina, en base a la estructura de la superficie de la cápside de AAV-2. Los 3 triángulos rellenos representan inserciones en AAV caprina con relación a AAV-2, que es probable que estén ubicadas en la superficie.

La Figura 17 muestra la transducción de músculo en ratones SCID tratados con IVIG después de la administración intramuscular de diversos viriones hFIX de AAVr.

La Figura 18 muestra la transducción de hígado en ratones SCID tratados con IVIG después de la administración en la vena caudal de diversos viriones hFIX de rAAV.

10 La Figura 19 muestra la biodistribución de factor humano IX (hFIX) tras la administración intravenosa de un vector de AAV caprina recombinante que codifica el mismo.

Las Figuras 20A (SEQ ID NO: 25) y 20B (SEQ ID NO: 26) muestran la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos, respectivamente, de un VP1 de AAV bovino, de AAV-C1.

15 Las Figuras 21A-21H muestran una comparación de la secuencia de aminoácidos de VP1s de AAVs que son sensibles o resistentes a la neutralización de anticuerpos de la siguiente manera: AAV-2 de primate (SEQ ID NO: 13), AAV-3B de primate (SEQ ID NO: 18), AAV-6 de primate (SEQ ID NO: 19), AAV-1 de primate (SEQ ID NO: 20), AAV-8 de primate (SEQ ID NO: 21), AAV-4 de primate (SEQ ID NO: 22), AAV bovino (vaca) ("AAV-C1" (SEQ ID NO: 26), AAV-5 de primate (SEQ ID NO: 16) y AAV caprino (cabra) ("AAV-C1" SEQ ID NO: 17). Línea de parvovirus: *, conservada en casi todos los parvovirus. Línea de neutralización: #, localización de mutaciones individuales en la cápside de AAV-2 identificadas como resistentes a la neutralización por sueros humanos. Línea de Accesibilidad: B, el aminoácido está enterrado entre la superficie interior y exterior; I, el aminoácido se encuentra en la superficie interior; O, el aminoácido se encuentra en la superficie exterior. Línea característica de la superficie: C, cilindro; P, meseta; S, pico; Y, cañón. Línea de ADN: B, posible contacto de base; D, probablemente requerida para la unión de ADN, pero no podrá contactar directamente con el ADN; P, posible contacto de fosfato; R, posible contacto de ribosa. Otros línea: A, ubicación de las mutaciones sencillas que disminuyen la unión y neutralización por anticuerpos monoclonales de ratón A20; H, contacto de heparina en AAV-2; M, posible contacto de Mg2+; P, dominio A2 de fosfolipasa.

20

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p. ej., *Fundamental Virology*, 2ª edición, vol. I y II (B. N. Fields y D. M. Knipe, comps.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell comps., Blackwell Scientific Publications.); T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., adición actual); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); *Methods in Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan comps., Academic Press, Inc.).

35

1. DEFINICIONES

Al describir la presente descripción, se emplearán los siguientes términos y expresiones, y se pretende que sean definidos como se indica más adelante.

40 Debe señalarse que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un polipéptido" incluye una mezcla de dos o más polipéptidos, y similares.

Las siguientes abreviaturas de aminoácidos se utilizan a lo largo del texto:

45

Alanina: Ala (A)	Arginina: Arg (R)
Asparagina: Asn (N)	Ácido aspártico: Asp (D)
Cisteína: Cys (C)	Glutamina: Gln (Q)
Ácido glutámico: Glu (E)	Glicina: Gly (G)
Histidina: His (H)	Isoleucina: Ile (I)

Leucina: Leu (L)	Lisina: Lys (K)
Metionina: Met (M)	Fenilalanina: Phe (F)
Prolina: Pro (P)	Serina: Ser (S)
Treonina: Thr (T)	Triptófano: Trp (W)
Tirosina: Tyr (Y)	Valina: Val (V)

5 Por "vector" se quiere dar a entender cualquier elemento genético tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que sea capaz de replicación cuando se asocia con los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias de genes entre células. Por lo tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales.

10 Por un "vector AAV" se quiere dar a entender un vector derivado de cualquier serotipo de virus adeno-asociado aislado a partir de cualquier especie animal, incluyendo, sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-G1 y AAV-C1.

15 Vectores de AAV pueden tener uno o más de los genes AAV de tipo salvaje eliminadas en su totalidad o en parte, de preferencia los genes *rep* y/o *cap*, pero conservan secuencias ITR flanqueantes funcionales. Secuencias ITR funcionales son necesarias para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de AAV. Por lo tanto, un vector de AAV se define en esta memoria para que incluya al menos las secuencias requeridas en *cis* para la replicación y el empaquetamiento (p. ej., ITRs funcionales) del virus. Las ITRs no tienen por qué ser las secuencias de nucleótidos de tipo salvaje, y puede estar alteradas, p. ej., mediante inserción, delección o sustitución de nucleótidos, siempre y cuando las secuencias proporcionen el rescate, la replicación y el empaquetamiento

20 funcionales.

"Funciones helper de AAV" se refieren a secuencias codificadoras derivadas de AAV que se pueden expresar para proporcionar productos génicos de AAV que, a su vez, funcionan en *trans* para la replicación de AAV productiva. Por lo tanto, las funciones helper de AAV incluyen los dos marcos de lectura abiertos (ORFs) de AAV principales, *rep* y *cap*. Los productos de expresión Rep han demostrado poseer muchas funciones, incluyendo, entre otras:

25 reconocimiento, unión y mellado del origen AAV de la replicación de ADN; actividad helicasa de ADN; y modulación de la transcripción de promotores de AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión Cap suministran funciones de empaquetamiento necesarias. Funciones helper de AAV se utilizan en esta memoria para complementar funciones de AAV en *trans* que faltan en los vectores de AAV.

30 La expresión "construcción helper de AAV" se refiere, en general, a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones de AAV eliminadas de un vector de AAV que se ha de utilizar para producir un vector de transducción para el suministro de una secuencia de nucleótidos de interés. Construcciones helper de AAV se utilizan comúnmente para proporcionar la expresión transitoria de genes *rep* y/o *cap* de AAV para complementar funciones de AAV que faltan y que son necesarias para la replicación lítica de AAV; sin embargo, construcciones helper carecen de ITRs de AAV y no pueden replicarse ni empaquetarse por sí mismas. Construcciones helper de AAV pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se ha descrito un cierto número de construcciones y vectores helper de AAV que codifican productos de expresión Rep y/o Cap. Véase, p. ej., las patentes de EE.UU. N°s 6.001.650, 5.139.941 y 6.376.237; Samulski et al. (1989) *J. Virol.* 63: 3822-3828; y McCarty et al. (1991) *J. Virol.* 65: 2936-2945.

35

40 La expresión "funciones accesorias" se refiere a funciones virales y/o celulares no derivadas de AAV de las que el AAV depende para su replicación. Así, la expresión captura proteínas y ARNs que se requieren en la replicación de AAV, incluyendo los restos implicados en la activación de la transcripción génica de AAV, etapa específica para el corte y empalme de ARNm de AAV, replicación del ADN de AAV, síntesis de productos de expresión Cap y ensamblaje de la cápside de AAV. Funciones accesorias de base viral se pueden derivar de cualquiera de los virus helper conocidos tales como adenovirus, virus herpes (distintos de los virus herpes simplex tipo-1) y virus vacuna.

45 La expresión "vector de función accesorio" se refiere generalmente a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones accesorias. Una función vectorial accesorio puede transfectarse en una célula huésped adecuada, en donde el vector es entonces capaz de soportar la producción de viriones de AAV en la célula huésped. Expresamente excluidas de la expresión se encuentran partículas virales infecciosas tal como existen en la naturaleza, tales como partículas de adenovirus, virus herpes o virus vacuna. Por lo tanto, los vectores de función accesorio pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón o cósmido.

50

Se ha demostrado que el complemento completo de genes de adenovirus no es necesario para las funciones helper accesorias. En particular, mutantes de adenovirus incapaces de replicación del ADN y la síntesis de genes tardía han demostrado ser permisivos para la replicación de AAV. Ito et al., (1970) *J. Gen. Virol.* 9:243; Ishibashi et al, (1971) *Virology* 45: 317. De manera similar, los mutantes dentro de las regiones E2B y E3 han demostrado soportar

la replicación de AAV, indicando que las regiones E2B y E3 no están probablemente implicadas en proporcionar funciones accesorias. Carter et al. , (1983) *Virology* 126: 505. Sin embargo, no es probable que los adenovirus defectuosos en la región E1, o que tienen una región E4 eliminada, sean capaces de soportar la replicación de AAV. Por lo tanto, es probable que las regiones E1A y E4 se requieran para la replicación de AAV, ya sea directa o indirectamente. Laughlin et al., (1982) *J. Virol.* 41:868; Janik et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1925; Carter et al., (1983) *Virology* 126: 505. Otros mutantes Ad caracterizados incluyen: E1B (Laughlin et al. (1982), *supra*; Janik et al. (1981), *supra*; Ostrove et al., (1980) *Virology* 104: 502); E2A (Handa et al., (1975) *J. Gen. Virol.* 29:239; Strauss et al., (1976) *J. Virol.* 17:140; Myers et al., (1980) *J. Virol.* 35:665; Jay et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2927; Myers et al., (1981) *J. Biol. Chem.* 256:567); E2B (Carter, *Adeno-Associated Virus Helper Functions* en I *CRC Handbook of Parvovirus* (P. Tijssen comp., 1990)); E3 (Carter et al (1983), *supra*); y E4 (Carter et al. (1983), *supra* ; Carter (1995)). Aunque los estudios de las funciones accesorias proporcionadas por adenovirus que tienen mutaciones en la región codificadora de E1B han producido resultados conflictivos, Samulski et al., (1988) *J. Virol.* 62:206-210, informaron recientemente que se requiere E1B55k para la producción de viriones de AAV, mientras que no se requiere E1B19k. Además, la Publicación Internacional WO 97/17458 y Matshushita et al., (1998) *Gene Therapy* 5:938-945, describen vectores de funciones accesorias que codifican diversos genes Ad. Vectores de funciones accesorias particularmente preferidos comprenden una región codificadora de ARN de adenovirus VA, una región codificadora de adenovirus E4 ORF6, una región codificadora de E2A de 72 kD, una región codificadora de adenovirus E1A y una región E1B de adenovirus que carece de una región codificadora E1B55k intacta. Vectores de este tipo se describen en la Publicación Internacional N° WO 01/83797.

Por "virus recombinante" se quiere dar a entender un virus que ha sido alterado genéticamente, p. ej., mediante la adición o inserción de una construcción de ácido nucleico heterólogo en la partícula.

Por "virión de AAV" se quiere dar a entender una partícula de virus completa tal como una partícula de virus AAV de tipo salvaje (wt) (que comprende un genoma de ácido nucleico de AAV lineal, de cadena sencilla, asociado con una capa de proteína de la cápside de AAV). A este respecto, moléculas de ácido nucleico de AAV de cadena sencilla de sentido complementario, p. ej., hebras "sentido" o "antisentido", se puede empaquetar en cualquier virión de AAV y ambas cadenas son igualmente infecciosas.

Un "virión de AAV recombinante" o "virión de rAAV" se define en esta memoria como un virus infeccioso, defectuoso en la replicación, que incluye una envuelta de proteína de AAV, que encapsida una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés que está flanqueada en ambos lados por ITRs de AAV. Un virión de rAAV se produce en una célula huésped adecuada que ha tenido un vector de AAV, funciones helper de AAV y funciones accesorias introducidas en la misma. De esta manera, la célula huésped se vuelve capaz de codificar polipéptidos de AAV que se requieren para empaquetar el vector de AAV (que contiene una secuencia de nucleótidos recombinantes de interés) en partículas de virión recombinante infeccioso para el subsiguiente suministro de genes.

Un "virión de AAV recombinante caprino" o "virión de rAAV caprino" es un virión de rAAV tal como se describe arriba que ha sido producido utilizando funciones helper de AAV que incluyen un gen que codifica una proteína de la cápside caprina tal como VP1 caprina.

Un "virión de AAV recombinante bovino" o "virión de rAAV bovino" es un virión de rAAV tal como se describe arriba que ha sido producido utilizando funciones helper de AAV que incluyen un gen que codifica una proteína de la cápside bovina tal como VP1 bovina.

El término "transfección" se utiliza para referirse a la captación de ADN extraño por parte de una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando ADN exógeno ha sido introducido dentro de la membrana celular. Un cierto número de técnicas de transfección son generalmente conocidas en la técnica. Véase, p. ej., Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu et al. (1981) *Gene* 13:197. Técnicas de este tipo pueden utilizarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno, tales como un vector de integración de nucleótidos y otras moléculas de ácido nucleico, en células huésped adecuadas.

La expresión "célula huésped" designa, por ejemplo, microorganismos, células de levadura, células de insectos y células de mamíferos que pueden ser, o han sido, utilizadas como receptores de una construcción helper de AAV, un plásmido de vector de AAV, un vector de función accesoria u otro ADN de transferencia. La expresión incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Por lo tanto, una "célula huésped", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere generalmente a una célula que ha sido transfectada con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en el complemento de ADN genómico o total como el parental original, debido a la mutación natural, accidental o deliberada.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "línea celular" se refiere a una población de células capaces de un crecimiento y división continuos o prolongados *in vitro*. A menudo, las líneas celulares son poblaciones clonales derivadas de una única célula progenitora. Se conoce, además, en la técnica que pueden producirse cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de dichas poblaciones clonales. Por lo tanto, las células derivadas de la línea celular a la que se alude pueden no ser precisamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular a la que se alude incluye tales variantes.

"Homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos restos de polipéptidos. Dos ADN, o dos secuencias de polipéptidos son "sustancialmente homólogos" entre sí cuando las secuencias exhiben al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%-85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95%-98% de identidad de secuencia a lo largo de una longitud definida de las moléculas. Tal como se utiliza en esta memoria, sustancialmente homólogo también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de ADN o polipéptido especificada.

En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente. El porcentaje de identidad se puede determinar mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100. Se pueden utilizar programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff comp., 5 Supl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que se adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Advances in Appl. Math.* 2:482-489, 1981, para el análisis de péptidos. Los programas para la determinación de la identidad de la secuencia de nucleótidos están disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI), por ejemplo los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package al que se alude anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular a una secuencia de referencia se puede determinar utilizando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro método para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es utilizar el paquete de programas MPSRCH registrado por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). De este conjunto de paquetes se puede emplear el algoritmo de Smith-Waterman en los casos en los que se utilicen los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización de 12 de hueco abierto, penalización de uno de extensión de hueco, y un hueco de seis). A partir de los datos generados el valor "Coincidencia" refleja la "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, utilizado con parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden utilizarse BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambos; corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + AP + traducciones GenBank CDS + proteína suiza + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas son bien conocidos en la técnica.

Alternativamente, la homología puede determinarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa o nucleasas específicas de cadena sencilla, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación Southern bajo, por ejemplo, condiciones rigurosas, tal como se definen para ese sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia de la técnica. Véase, p. ej., Sambrook et al., *supra*; *DNA Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

Por la expresión "variante degenerada" se entiende un polinucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácido nucleico del mismo, que codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por el polinucleótido del que se deriva la variante degenerada.

Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxi).

Una secuencia de terminación de la transcripción puede estar localizada en posición 3' con respecto a la secuencia codificante.

El término "heterólogo", que se refiere a secuencias de ácido nucleico tales como secuencias codificantes y secuencias de control, designa secuencias que normalmente no están unidas entre sí, y/o normalmente no están asociadas con una célula particular. Por lo tanto, una región "heteróloga" de una construcción de ácido nucleico o un vector es un segmento de ácido nucleico dentro de o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una construcción de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias que no se encuentran en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es una construcción en donde la secuencia codificante en sí no se encuentra en la naturaleza (p. ej., secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con una construcción que normalmente no está presente en la célula se consideraría heteróloga para los propósitos de esta invención. La variación alélica o eventos mutacionales que se producen de forma natural no dan lugar a ADN heterólogo, tal como se utiliza en esta memoria.

Una secuencia de "ácido nucleico" se refiere a una secuencia de ADN o ARN. La expresión captura secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN tales como, pero no limitados a 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxil-metil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudo-uracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metil-citosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

La expresión "secuencias de control" de ADN se refiere colectivamente a secuencias de promotor, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores aguas arriba, orígenes de replicación, sitios de entrada al ribosoma interno ("IRES"), potenciadores, y similares, que proporcionan colectivamente la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No todas estas secuencias de control necesitan estar siempre presentes, siempre que la secuencia codificante seleccionada sea capaz de ser replicada, transcrita y traducida en una célula huésped apropiada.

El término "promotor" se utiliza en esta memoria en su sentido ordinario para aludir a una región del nucleótido que comprende una secuencia reguladora de ADN, en el que la secuencia reguladora se deriva de un gen que es capaz de unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). Promotores de la transcripción pueden incluir "promotores inducibles" (en donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), "promotores represibles" (en donde la expresión de una secuencia de polinucleótido unida operativamente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y "promotores constitutivos".

"Unido operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de modo que realizan su función habitual. Por lo tanto, las secuencias de control unidas operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de control no necesitan estar contiguas a la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de la misma. Así, por ejemplo, secuencias intermedias no traducidas pero transcritas pueden estar presentes entre una secuencia de promotor, y la secuencia codificante y la secuencia promotora todavía pueden considerarse "unidas operativamente" a la secuencia codificante.

Por "aislada", cuando se refiere a una secuencia de nucleótidos, se quiere dar a entender que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Por lo tanto, una "molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido particular" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido sujeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan perjudicialmente a las características básicas de la composición.

Con el propósito de describir la posición relativa de secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular a lo largo de la presente solicitud, tal como cuando una secuencia de nucleótidos particular se describe como situada "aguas arriba", "aguas abajo", "3 prima (3')" o "5 prima (5')" en relación con otra secuencia, ha de

entenderse que es la posición de las secuencias en la hebra "sentido" o "codificante" de una molécula de ADN a la que se está refiriendo como es convencional en la técnica.

A "homólogo funcional" o un "equivalente funcional" de un polipéptido de AAV dado incluye moléculas derivadas de la secuencia polipeptídica nativa, así como polipéptidos producidos de forma recombinante o sintetizados químicamente que funcionan de una manera similar a la molécula de AAV de referencia para lograr un resultado deseado. Por lo tanto, un homólogo funcional de AAV Rep68 o Rep78 abarca derivados y análogos de esos polipéptidos - incluyendo cualesquiera adiciones, sustituciones y/o deleciones simples o múltiples de aminoácidos que se producen internamente o en los extremo amino o carboxi de los mismos-siempre y cuando se conserve la actividad de integración.

Por "capaces de una transducción eficiente " se quiere dar a entender que las construcciones mutadas de la invención proporcionan vectores o viriones de rAAV que conservan la capacidad de transfectar células *in vitro* y/o *in vivo* a un nivel que está dentro de 1-10% de la eficacia de transfección obtenida utilizando la correspondiente secuencia de tipo salvaje. Preferiblemente, el mutante conserva la capacidad de transfectar células o tejidos a un nivel que está dentro de 10-100% de la secuencia de tipo salvaje correspondiente. La secuencia mutada puede incluso proporcionar una construcción con una capacidad mejorada de transfectar células y tejidos. La eficiencia de la transducción se determina fácilmente utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo el ensayo de la transducción *in vitro* descrito en los Ejemplos.

Por "inmunorreactividad reducida" se quiere dar a entender que la construcción de AAV mutado reacciona con anticuerpos anti-AAV en un nivel reducido en comparación con la correspondiente construcción de AAV de tipo salvaje. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria, incluye anticuerpos obtenidos de preparaciones tanto policlonales como monoclonales, así como, lo siguiente: moléculas de anticuerpos híbridas (quiméricas) (véase, por ejemplo, Winter et al. (1991) *Nature* 349: 293-299; y Patente de EE.UU. N° 4.816.567); Fragmentos F(ab')₂ y F(ab); moléculas Fv (heterodímeros no covalentes, véase, por ejemplo, Inbar et al. (1972) *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2659-2662; y Ehrlich et al. (1980) *Biochem* 19:4091-4096); moléculas Fv de cadena sencilla (sFv) (véase, por ejemplo, Huston et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-5883); construcciones de fragmentos de anticuerpos dimericas y triméricas; minicuerpos (véase, p. ej., Pack et al. (1992) *Biochem* 31:1579-1584; Cumber et al. (1992) *J Immunology* 149B:120-126); moléculas de anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534-1536; y Publicación de Patente del Reino Unido N° GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994); y cualesquiera fragmentos funcionales obtenidos a partir de moléculas de este tipo, en donde esos fragmentos conservan propiedades de unión inmunológicas de la molécula de anticuerpo parental.

Las construcciones mutadas de la presente descripción pueden tener una inmunorreactividad reducida tal como se determina utilizando ensayos *in vitro* y/o *in vivo* utilizando cualquiera de los tipos anteriores de anticuerpos que han sido generados contra la correspondiente construcción de AAV de tipo salvaje. Preferiblemente, la construcción de AAV mutada reaccionará con anticuerpos de este tipo a un nivel al menos 1,5 veces más bajo que la correspondiente construcción de tipo salvaje, preferiblemente a un nivel al menos 2 veces menor tal como al menos 5-10 veces menor, incluso a un nivel al menos 50-100 veces o al menos 1000 veces menor que la correspondiente construcción de tipo salvaje.

Preferiblemente, la construcción de AAV mutada reacciona a un nivel reducido con anticuerpos neutralizantes anti-AAV. Por ejemplo, las construcciones mutadas serán preferiblemente al menos 1,5 veces más resistentes a la neutralización que las correspondientes de tipo salvaje, preferiblemente al menos 2 veces más resistentes a la neutralización, incluso más preferiblemente al menos 5-10 veces o más, tal como al menos 50-100 veces o más resistentes a la neutralización que la de tipo salvaje correspondiente, según se determina utilizando ensayos convencionales, tales como los ensayos de neutralización *in vitro* descritos en esta memoria.

Los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se utilizan indistintamente en esta memoria y se refieren a un vertebrado, preferiblemente un mamífero. Mamíferos incluyen, pero no se limitan a murinos, roedores, simios, seres humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas.

Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición o agente, según se proporcionan en esta memoria, se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente de la composición o agente para proporcionar la respuesta deseada. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se trata, y la macromolécula particular de interés, modo de administración, y similares. Una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto normal en la técnica utilizando una experimentación rutinaria.

"Tratar" o "tratamiento" de una enfermedad incluye: (1) prevenir la enfermedad, es decir, provocar que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un sujeto que pueda estar expuesto o predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no experimente o muestre síntomas de la enfermedad, (2) inhibir la enfermedad, es decir, detener el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos, o (3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos.

2. MODOS DE LLEVAR A CABO LA DESCRIPCIÓN

Antes de describir la presente descripción en detalle, debe entenderse que esta descripción no se limita a formulaciones o parámetros del proceso particulares ya que las mismas pueden, por supuesto, variar. Ha de entenderse también que la terminología utilizada en esta memoria es con el propósito de describir realizaciones particulares de la descripción solamente, y no se pretende que sean limitativos.

Aunque en la práctica de la presente descripción se puede utilizar un cierto número de métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, los materiales y métodos preferidos se describen en esta memoria.

Fundamental de la presente descripción es el descubrimiento de nuevas secuencias de AAV mutantes, útiles en la producción de viriones de rAAV que exhiben inmunorreactividad reducida en comparación con los correspondientes viriones de tipo salvaje. Además de ello, los mutantes conservan preferiblemente otras propiedades de la de tipo salvaje correspondiente tales como el empaquetamiento de ADN, la unión al receptor, la purificación cromatográfica y la capacidad de transducir células *in vitro* e *in vivo*. Preferiblemente, tales propiedades se encuentran dentro de al menos 1-10% de los valores medidos para el correspondiente AAV de tipo salvaje. Más preferiblemente tales propiedades están dentro de 10-100% de los valores medidos para el correspondiente AAV de tipo salvaje. Lo más preferiblemente, tales propiedades están al menos 100% o más de los valores medidos para el correspondiente AAV de tipo salvaje. Así, por ejemplo, si la mutación es en una secuencia de la cápside de AAV-2, la comparación de estos atributos sería entre un virión de AAV-2 con la secuencia de la cápside mutada en comparación con un virión de AAV-2 con los mismos componentes que el virión mutado, excepto con la secuencia de la proteína de la cápside de AAV-2 de tipo salvaje.

Como se explicó anteriormente, los mutantes de AAV de la presente descripción exhiben preferiblemente una inmunorreactividad reducida con relación a la de anticuerpos neutralizantes que pueden estar presentes en el huésped al que se administran los viriones mutantes. De esta manera, las células y los tejidos de sujetos que han sido infectados de forma natural con AAV (es decir, debido a la infección natural previa) o han sido infectados artificialmente con AAV (es decir, debido a la terapia génica previa o la inmunización con ácido nucleico) pueden ser transfectados de manera más eficiente con viriones de AAV recombinantes con el fin de tratar o prevenir una enfermedad nueva o en curso.

Un mecanismo bien estudiado para la neutralización es que un anticuerpo neutralizante bloquea físicamente una región en el virus requerida para unirse a receptores que se requieren para la infección. Estudios previos con otros virus han demostrado que los receptores y anticuerpos neutralizantes se unen a un conjunto distinto de aminoácidos y que es posible identificar mutantes en las posiciones particulares en cápsides virales que afectan a la unión de anticuerpos neutralizantes, pero no los receptores u otras funciones necesarias para la infección viral. Experimentos en los cuales se seleccionan virus replicantes de tipo salvaje para que sean resistentes a los anticuerpos neutralizantes han demostrado que las mutaciones, incluso en los aminoácidos individuales, tales como los aquí descritos, pueden resultar en un aumento significativo en la resistencia a la neutralización de anticuerpos.

La capacidad o incapacidad de un virión de AAV mutante de unirse a antisueros de AAV es parcialmente una función de la secuencia de las proteínas de la cápside (codificadas por el gen *cap* de AAV). Por lo tanto, la descripción contempla cambios de aminoácidos individuales, dobles, triples, cuádruples y mayores realizados en la superficie del virión de AAV, así como deleciones y/o inserciones, con el fin de disminuir la inmunorreactividad, p. ej., para alterar la capacidad del virión de AAV para unirse a antisueros de AAV. Tales mutantes pueden ser evaluados en cuanto a la resistencia a la neutralización y, de ser necesario, se pueden hacer cambios más drásticos o múltiples.

Métodos para identificar porciones del virión de AAV susceptibles de mutación con un virión de rAAV funcional resultante se describen en los ejemplos que figuran más adelante. Tal como se detalla en el mismo, se prefieren mutaciones a los aminoácidos en la superficie viral tales como mutaciones a las características que sobresalen de la cápside, incluyendo porciones de la cápside conocidas como el "pico", "cilindro" y "meseta". Las mutaciones son preferiblemente a la región VP2, más preferiblemente a la región VP3 y, en particular, dentro de la región de solapamiento entre VP1, VP2 y VP3 tal como se muestra en la Figura 11. Mutaciones particularmente preferidas se

encuentran dentro de las posiciones 80-598 de VP2 (correspondientes a los aminoácidos 217-735 de VP1 y a los aminoácidos 15-533 de VP3).

La secuencia de una VP2 representativa se muestra en la Figura 9 en esta memoria (SEQ ID NO: 12). La proteína principal de la envuelta, VP3 abarca los aminoácidos 203-735 de VP1. La mutación comprende al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácido a la proteína nativa. Mutaciones representativas incluyen una o más sustituciones de los aminoácidos que se producen en una posición correspondiente a una posición de la proteína de la cápside VP2 de AAV-2, seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos 126, 127, 128, 130, 132, 134, 247, 248, 315, 334, 354, 357, 360, 361, 365, 372, 375, 377, 390, 393, 394, 395, 396, 407, 411, 413, 418, 437, 449, 450, 568, 569 y 571.

Generalmente, el aminoácido que se produce de forma natural está sustituido con un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña y/o no está cargado y, por lo tanto, es menos inmunogénico. Aminoácidos de este tipo incluyen, sin limitación, alanina, valina, glicina, serina, cisteína, prolina, así como análogos de los mismos, prefiriéndose alanina. Además de ello, pueden estar presentes mutaciones adicionales. Combinaciones representativas incluyen cualquier combinación de los aminoácidos identificados inmediatamente arriba tales como, pero no limitados a una mutación del aminoácido 360 a histidina y el aminoácido 361 a alanina; el aminoácido 334 a alanina y el aminoácido 449 a alanina; el aminoácido 334 a alanina y el aminoácido 568 a alanina, el aminoácido 568 a alanina y el aminoácido 571 a alanina; el aminoácido 334 a alanina, el aminoácido 449 a alanina y el aminoácido 568 a alanina; el aminoácido 571 a lisina y cualquiera de los aminoácidos especificados anteriormente. Las combinaciones anteriores son meramente ilustrativas y, por supuesto, se determinan fácilmente numerosas otras combinaciones basándose en la información proporcionada en esta memoria.

Tal como se describe adicionalmente en los ejemplos, determinados aminoácidos en la cápside son adyacentes al sitio de unión a heparina. Esta región se denomina "zona muerta" o "DZ" en esta memoria e incluye los aminoácidos G128, N131, D132, H134, N245, N246, D356, D357, H372, G375, D391, D392, E393 y E394. Los aminoácidos en la zona muerta son importantes para la función de AAV y, por tanto, son también dianas para la unión de anticuerpos neutralizantes. Dado que esta región es importante para la función de AAV, sustituciones conservadoras de aminoácidos tales como Q por H, D por E, E o N por D, y similares, se prefieren en la región de la zona muerta y resultan en un mutante de la zona muerta más funcional.

Las diversas posiciones de aminoácidos que se producen en la proteína de la cápside se numeran aquí con referencia a la secuencia de VP2 de AAV-2 descrita en NCBI N° de Acceso AF043303 y se muestran en la Figura 9 en esta memoria. La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de VP1 de AAV-2. Sin embargo, se debe entender que las mutaciones de aminoácidos que se producen en posiciones correspondientes en cualquiera de los serotipos de AAV quedan abarcadas por la presente descripción. Las secuencias para la cápside de diversos serotipos de AAV aislados a partir de múltiples especies son conocidas y se describen, p. ej., en Gao et al. (2.002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11854-11859; Rutledge et al. (1998) *J. Virol.* 72:309-319; NCBI N°s de Acceso NC001863; NC004828; NC001862; NC002077; NC001829; NC001729; U89790; U48704; AF369963; AF028705; AF028705; AF028704; AF513852; AF513851; AF063497; AF085716; AF43303; Y18065; AY186198; AY243026; AY243025; AY243024; AY243023; AY243022; AY243021; AY243020; AY243019; AY243018; AY243017; AY243016; AY243015; AY243014; AY243013; AY243012; AY243011; AY243010; AY243009; AY243008; AY243007; AY243006; AY243005; AY243004; AY243003; AY243002; AY243001; AY243000; AY242999; AY242998; y AY242997.

Además de ello, los autores de la invención han descubierto un nuevo AAV caprino, aislado de cabra, denomina "AAV-G1" en esta memoria. La secuencia de VP1 de AAV caprino es altamente homóloga a la secuencia VP1 de AAV-5, pero es aproximadamente 100 veces más resistente a la neutralización por anticuerpos de AAV existentes que la secuencia de AAV-5 nativa. Más particularmente, un fragmento de PCR de 2805 pb del AAV caprino descrito en esta memoria, que codifica 603 pb de *rep*, el intrón central, y todo el *cap*, muestra un 94% de homología con la secuencia de AAV-5 correspondiente. Las homologías de ADN y proteínas para el *rep* parcial son 98% y 99%, respectivamente. Una comparación de la secuencia codificante de VP1 caprina con una secuencia codificante de VP1 de AAV-5 de primate se muestra en las Figuras 12A-12B. El ADN para la región *cap* del AAV caprino es un 93% homólogo al de AAV-5. Las secuencias de aminoácidos para la VP1 caprina frente a un AAV-5 de primate se muestran en la Figura 13. La secuencia caprina codifica una proteína VP1 de 726 aminoácidos, mientras que VP1 de AAV-5 es de 724 aminoácidos de longitud. Adicionalmente, las secuencias exhiben un 94% de identidad de la secuencia y un 96% de similitud de la secuencia. Existen 43 diferencias de aminoácidos entre la secuencia VP1 de AAV-5 caprina y la de primate. Con respecto a la secuencia de aminoácidos lineal de VP1, la distribución de las diferencias de aminoácidos entre AAV-5 y AAV caprina es altamente polar. Todas las diferencias de aminoácidos se producen exclusivamente en la región hipervariable C-terminal de VP1 de manera dispersa. Esta región con relación a AAV-5 y caprina incluye aproximadamente 348 aminoácidos desde el aminoácido 386 al extremo C, numerados con relación a VP1 de AAV-5. Las regiones hipervariables correspondientes en otros serotipos de AAV son

fácilmente identificables y la región de un cierto número de serotipos de AAV se muestra en las figuras en esta memoria.

5 Sin estar ligados a una teoría particular, el hecho de que todas las diferencias de aminoácidos en VP1 de AAV-5 y AAV caprino se producen en regiones que probablemente están expuestas en la superficie, implica que la evolución de la cápside está siendo impulsada principalmente por el sistema inmune humoral de el nuevo huésped y/o por la adaptación a receptores de rumiantes.

10 Una comparación de la secuencia de VP1 de AAV caprino con un cierto número de otras secuencias VP1 de primate, incluyendo AAV-1, AAV-2, AAV-3B, AAV-4, AAV-6, AAV-8 y AAV-5, se muestra en las Figuras 14A-14H. La accesibilidad de las distintas posiciones de aminoácidos en base a la estructura cristalina también se muestra en las figuras. Además de ello, las características superficiales de los aminoácidos, la ubicación de las mutaciones individuales que disminuyen la unión y neutralización; los sitios de unión de heparina; posible contacto de Mg²⁺; el dominio A2 de fosfolipasa; así como las posiciones posibles para el contacto de base y de unión al ADN, también se muestran posibles contactos de fosfato y ribosa. Como puede verse en la figura, AAV-5 y AAV caprino son idénticos entre sí en 17 posiciones que difieren tanto en AAV-2 como en AAV-8.

15 De manera similar, los autores de la invención han descubierto un nuevo AAV bovino, aislada de vacas, denominado "AAV-C1" en esta memoria. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de VP1 de AAV-C1 se muestran en las Figuras 20A y 20B, respectivamente. Las Figuras 21A-21H muestran una comparación de la secuencia de aminoácidos de VP1 de AAV-C1 con AAV-1, AAV-2, AAV-3B, AAV-4, AAV-6, AAV-8, AAV-5 de primate y AAV caprino (AAV-G1). La accesibilidad de las distintas posiciones de aminoácidos en base a la estructura cristalina también se muestra en las figuras. Además de ello, las características superficiales de los aminoácidos, la ubicación de las mutaciones individuales que disminuyen la unión y neutralización; los sitios de unión de heparina; posible contacto de Mg²⁺; el dominio de la fosfolipasa A2; así como las posiciones posibles para el contacto de base y de unión al ADN, también se muestran posibles contactos de fosfato y ribosa.

25 Como puede verse en la figura, VP1 de AAV-C1 muestra aproximadamente un 76% de identidad con AAV-4. Las diferencias de secuencia entre AAV-4 y AAV-C1 se encuentran dispersadas por la cápside. VP1 de AAV-C1 exhibe una identidad de aproximadamente 54% con VP1 de AAV-5, con una alta homología en la proteína Rep, los primeros 137 aminoácidos de VP1 de AAV-5 y la región no traducida después de la parada de VP1 de AAV-5 (no mostrado). Por lo tanto, AAV-C1 parece ser un híbrido natural entre AAV-5 y AAV-4. AAV-C1 también exhibía aproximadamente un 58% de identidad de la secuencia con VP1s de AAV-2 y AAV-8, aproximadamente un 59% de identidad de la secuencia con VP1s de AAV-1 y AAV-6, y aproximadamente un 60% de identidad de la secuencia con VP1 de AAV-3B.

35 Tal como se describe con más detalle en los ejemplos, el AAV bovino es de aproximadamente 16 veces más resistente a la neutralización por anticuerpos AAV existentes que la secuencia nativa AAV-2. Por lo tanto, las secuencias caprinas y bovinas, y otras secuencias de mamíferos no primates se pueden utilizar para producir viriones de AAV recombinantes con una inmunorreactividad reducida con relación a secuencias de AAV de primates tal como en relación con AAV-2 y AAV-5. Adicionalmente, las regiones de cápsides de AAV que pueden ser mutadas para proporcionar viriones de AAV con una inmunorreactividad reducida de aislados y cepas de AAV no caprino y no bovino, de modo que cualquiera de los serotipos de AAV se pueden predecir razonablemente basándose en las secuencias de AAV caprino y bovino proporcionadas en esta memoria y una comparación de estas secuencias y las propiedades inmunorreactivas con los de otros productos aislados y serotipos.

45 Sobre la base de la discusión anterior, y los ejemplos proporcionados en esta memoria, un experto en la técnica puede predecir razonablemente mutaciones que se pueden hacer a secuencias de AAV de tipo salvaje con el fin de generar viriones de AAV con una inmunorreactividad reducida. Se espera que los cambios de aminoácidos en aminoácidos encontrados en la superficie de la cápside de AAV, y especialmente los de la región hipervariable, proporcionen viriones de AAV con una inmunorreactividad reducida. Además de ello, en base al conocimiento proporcionado por las secuencias de AAV caprino y bovino, se pueden identificar otros AAVs de mamíferos no primates para proporcionar secuencias de AAV no mutado para uso en la preparación de viriones de AAV recombinantes con una inmunorreactividad reducida con respecto a AAVs de primates tales como AAV- 2 y AAV-5. Por ejemplo, tal como se muestra en los ejemplos que figuran más adelante, las posiciones en mutantes de AAV-2 que se correlacionan con la resistencia a la neutralización y que están en común entre los mutantes de AAV-2 y AAV caprino incluyen cambios en las posiciones 248, 354, 360, 390, 407, 413 y 449 de AAV-2.

55 Los mutantes de AAV de la presente descripción pueden ser generados mediante mutagénesis dirigida al sitio de la región del gen cap de AAV. La región cap mutada puede entonces ser clonada en un vector de función helper adecuado, y se pueden generar viriones de rAAV utilizando el vector de función helper mutado y cualquier método de transfección adecuado, incluyendo el método de triple transfección descrito en esta memoria. Mutantes

5 adecuados para uso con la presente invención se identifican por su inmunorreactividad reducida, tal como se definió anteriormente. Preferiblemente, los mutantes de la presente descripción tienen una capacidad reducida para ser neutralizados por antisueros anti-AAV, preferiblemente antisueros anti-AAV-2, al tiempo que conservan otras funciones biológicas tales como la capacidad de ensamblar viriones intactos, empaquetar ADN viral, unir receptores celulares y transducir células.

10 Por lo tanto, la presente descripción implica la identificación y el uso de secuencias de AAV mutado, así como secuencias de AAV de mamíferos no primates de tipo salvaje, que exhiben una inmunorreactividad reducida para la incorporación en viriones de rAAV. Estos viriones de rAAV se pueden utilizar para suministrar un "ácido nucleico heterólogo" (un "HNA") a un sujeto vertebrado tal como un mamífero. Como se ha explicado anteriormente, un "virión de AAV recombinante" o "virión de rAAV" es un virus infeccioso compuesto de una envuelta proteica de AAV (es decir, una cápside) que encapsula un "vector de AAV recombinante (rAAV)", comprendiendo el vector de rAAV el HNA y una o más repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV. Los vectores de AAV pueden construirse utilizando técnicas recombinantes que se conocen en la técnica e incluyen uno o más HNAs flanqueados por ITRs funcionales. Las ITRs del vector de rAAV no tienen por qué ser las secuencias de nucleótidos de tipo salvaje, y pueden ser alteradas, p. ej., mediante inserción, delección, o sustitución de nucleótidos, siempre y cuando las secuencias proporcionen la función apropiada, es decir, rescate, replicación y empaquetamiento del genoma de AAV.

20 Viriones de AAV recombinantes se pueden producir utilizando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo el método de transfección triple (descrito en detalle en la Patente de EE.UU. N° 6.001.650). Este sistema implica el uso de tres vectores para la producción de viriones de rAAV, incluyendo un vector de función helper de AAV, un vector de función accesoria y un vector de rAAV que contiene el HNA. Un experto en la técnica apreciará, sin embargo, que las secuencias de ácidos nucleicos codificadas por estos vectores se pueden proporcionar en dos o más vectores en diversas combinaciones. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "vector" incluye cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., que sea capaz de replicación cuando se asocia con los elementos de control apropiados y que pueda transferir secuencias de genes entre células. Por lo tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales.

25 El vector de la función helper de AAV codifica las secuencias de la "función helper de AAV" (es decir, *rep* y *cap*), que funcionan *in trans* para la replicación y la encapsidación de AAV productivas. Preferiblemente, el vector de la función helper de AAV apoya la producción eficiente de vector de AAV, sin generar viriones de AAV de tipo salvaje detectable (es decir, los viriones de AAV que contienen genes *rep* y *cap* funcionales). Ejemplos de vectores adecuados para uso con la presente invención incluyen pHLPI9, descrito en la patente de EE.UU. N° 6.001.650 y el vector pRep6cap6, descrito en la patente de EE.UU. N° 6.156.303.

35 El vector de función accesoria codifica secuencias de nucleótidos para funciones virales y/o celulares no derivadas de AAV en las que AAV es dependiente para la replicación (es decir, "funciones accesorias"). Las funciones accesorias incluyen las funciones requeridas para la replicación de AAV, incluyendo, sin limitación, los restos implicados en la activación de la transcripción de genes de AAV, etapa específica para el corte y empalme de ARNm de AAV, la replicación del ADN de AAV, la síntesis de productos de expresión *cap*, y el ensamblaje de la cápside de AAV. Funciones accesorias basadas en virus se pueden derivar de cualquiera de los virus helper conocidos tales como adenovirus, virus herpes (distintos al virus herpes simplex de tipo-1) y el virus vacuna. En una realización preferida, se utiliza el plásmido de la función accesoria pladeno5 (detalles con respecto a pLadeno5 se describen en la patente de EE.UU. N° 6.004.797). Este plásmido proporciona un conjunto completo de funciones accesorias de adenovirus para la producción del vector de AAV, pero carece de los componentes necesarios para formar adenovirus competentes en la replicación.

40 El vector de rAAV que contiene el ácido nucleico heterólogo (HNA) puede construirse utilizando ITRs de cualquiera de los diversos serotipos de AAV. El HNA comprende secuencias de ácido nucleico unidas entre sí que de otro modo no se encuentran en la naturaleza, definiendo este concepto el término "heterólogo". Para ilustrar este punto, un ejemplo de un HNA es un gen flanqueado por secuencias de nucleótidos que no se encuentran en asociación con ese gen en la naturaleza. Otro ejemplo de un HNA es un gen que por sí mismo no se encuentra en la naturaleza (p. ej., secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). La variación alélica o eventos mutacionales que se producen de forma natural no dan lugar a HNAs tal como se utiliza en esta memoria. Un HNA puede comprender una molécula de ARN anti-sentido, un ribozima o un gen que codifica un polipéptido.

45 El HNA está enlazado operativamente a un promotor heterólogo (constitutivo, específico para células o inducible) de modo que el HNA sea capaz de ser expresado en las células diana del paciente bajo condiciones apropiadas o deseables. Numerosos ejemplos de promotores constitutivos, específicos para células e inducibles son conocidos en la técnica, y un experto fácilmente podría seleccionar un promotor para un uso específico previsto, p. ej., la selección

del promotor de α -actina del esqueleto específico para el músculo o el promotor/potenciador de creatina quinasa específico para el músculo para la expresión específica para la célula muscular, la selección del promotor de CMV constitutivo para fuertes niveles de expresión continua o casi continua, o la selección del promotor de ecdisona inducible para la expresión inducida. La expresión inducida permite que el experto en la técnica controle la cantidad de proteína que se sintetiza. De esta manera, es posible variar la concentración de producto terapéutico. Otros ejemplos de promotores inducibles bien conocidos son: promotores esteroides (p. ej., promotores de estrógenos y andrógenos) y promotores de metalotioneína.

La descripción incluye nuevos viriones mutantes que comprenden HNAs que codifican una o más moléculas de ARN anti-sentido, siendo administrados los viriones de rAAV preferiblemente a una o más células o tejido muscular de un mamífero. Moléculas de ARN antisentido adecuadas para su uso con la presente invención en la terapia anti-sentido del cáncer o el tratamiento de enfermedades virales se han descrito en la técnica. Véase, p. ej., Han et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4313-4317; Uhlmann et al., (1990) *Chem. Rev.* 90:543-584; Helene et al., (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* 1049:99-125; Agarawal et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7079-7083; y Heikkila et al., (1987) *Nature* 328:445-449. La descripción también abarca el suministro de ribozimas utilizando los métodos descritos en esta memoria. Para una discusión de ribozimas adecuadas, véase, p. ej., Cech et al., (1992) *J. Biol. Chem.* 267:17479-17482 y la patente de EE.UU. N° 5.225.347.

La descripción abarca preferiblemente viriones de rAAV mutantes que comprenden HNAs que codifican uno o más polipéptidos, siendo administrados los viriones de rAAV preferiblemente a una o más células o tejidos de un mamífero. Por lo tanto, la descripción abarca el suministro de HNAs que codifican uno o más péptidos, polipéptidos o proteínas, que son útiles para el tratamiento o la prevención de estados de enfermedad en un sujeto mamífero. Un ADN de este tipo y estados de enfermedad asociados incluyen, pero no se limitan a: ADN que codifica glucosa-6-fosfatasa, asociado con la deficiencia de almacenamiento de glucógeno tipo 1A; ADN que codifica fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, asociado con la deficiencia en Pepck; ADN que codifica galactosa-1 fosfato uridil transferasa, asociado con galactosemia; ADN que codifica fenilalanina hidroxilasa, asociado con fenilcetonuria; ADN que codifica alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, asociado con la enfermedad de orina de jarabe de arce; ADN que codifica fumarilacetato hidrolasa, asociado con tirosinemia tipo 1; ADN que codifica metilmalonil-CoA mutasa, asociado con acidemia metilmalónica; ADN que codifica acil CoA deshidrogenasa de cadena media, asociado con la deficiencia de acetyl CoA de cadena media; ADN que codifica ornitina transcarbamilasa, asociado con deficiencia en ornitina transcarbamilasa; ADN que codifica ácido argininosuccínico sintetasa, asociado con citrulinemia; ADN que codifica proteína del receptor de lipoproteína de baja densidad, asociado con hipercolesterolemia familiar; ADN que codifica UDP-glucouronosiltransferase, asociado con la enfermedad de Crigler-Najjar; ADN que codifica adenosina desaminasa, asociado con la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave; ADN que codifica hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, asociado con el síndrome de Gout y Lesch-Nyan; ADN que codifica biotinidasa, asociado con deficiencia en biotinidasa; ADN que codifica beta-glucocerebrosidasa, asociado con la enfermedad de Gaucher; ADN que codifica beta-glucuronidasa, asociado con el síndrome de Sly; ADN que codifica la proteína de la membrana de peroxisoma de 70 kDa, asociado con el síndrome de Zellweger; ADN que codifica porfobilinógeno deaminasa, asociado con porfiria aguda intermitente; ADN que codifica alfa-1 antitripsina para el tratamiento de la deficiencia en alfa-1 antitripsina (enfisema); ADN que codifica eritropoyetina para el tratamiento de la anemia debido a la talasemia o la insuficiencia renal; ADN que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular, el ADN que codifica angiopoyetina-1 y ADN que codifica el factor de crecimiento de fibroblastos para el tratamiento de enfermedades isquémicas; ADN que codifica trombomodulina e inhibidor de la vía del factor tisular para el tratamiento de vasos sanguíneos ocluidos como se ven, por ejemplo, en la aterosclerosis, trombosis o embolismos; ADN que codifica aminoácido descarboxilasa aromática (AADC) y ADN que codifica tirosina hidroxilasa (TH) para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; ADN que codifica el receptor beta-adrenérgico, ADN que codifica anti-sentido a , o ADN que codifica una forma mutante de, fosfolamban, ADN que codifica adenosina trifosfatasa-2 del retículo el sarco(endo)plásmico (SERCA2) y ADN que codifica la adenilil ciclasa cardíaca para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva; ADN que codifica un gen supresor de tumores tal como p53 para el tratamiento de diversos cánceres; ADN que codifica una citoquina tal como una de las diversas interleuquinas para el tratamiento de trastornos y cánceres inflamatorios e inmunes; ADN que codifica distrofina o minidistrofina y ADN que codifica utrofina o miniutrofina para el tratamiento de distrofias musculares; y ADN que codifica insulina para el tratamiento de la diabetes.

La descripción también incluye nuevos viriones mutantes que comprenden un gen o genes que codifican proteínas de la coagulación de la sangre, proteínas que pueden ser suministradas, utilizando los métodos de la presente invención, a las células de un mamífero que tiene hemofilia para el tratamiento de la hemofilia. Por lo tanto, la descripción incluye: el suministro del gen del Factor IX a un mamífero para el tratamiento de la hemofilia B, el suministro del gen del Factor VIII a un mamífero para el tratamiento de la hemofilia A, el suministro del gen del Factor VII para el tratamiento de la deficiencia en Factor VII, el suministro del gen del factor X para el tratamiento de la deficiencia en Factor X, el suministro del gen del Factor XI para el tratamiento de la deficiencia en Factor XI, el suministro del gen del Factor XIII para el tratamiento de la deficiencia en Factor XIII, y el suministro del gen de la Proteína C para el tratamiento de la deficiencia en Proteína C. El suministro de cada uno de los genes arriba citados

a las células de un mamífero se lleva a cabo generando primero un virión de rAAV que comprende el gen y luego administrando el virión de rAAV al mamífero. Por lo tanto, la descripción incluye viriones de rAAV que comprenden genes que codifican uno cualquiera de Factor IX, Factor VIII, Factor X, Factor VII, Factor XI, Factor XIII o Proteína C.

5 El suministro de los viriones recombinantes que contienen uno o más HNAs a un sujeto mamífero puede ser mediante inyección intramuscular o mediante administración en el torrente sanguíneo del sujeto mamífero. La administración en el torrente sanguíneo puede ser mediante inyección en una vena, una arteria, o cualquier otro conducto vascular los viriones mutantes en el torrente sanguíneo a modo de perfusión de extremidad aislada, una técnica bien conocida en las técnicas quirúrgicas, permitiendo esencialmente el método al experto aislar una extremidad de la circulación sistémica antes de la administración de los viriones de rAAV. Una variante de la técnica de perfusión de extremidad aislada, descrita en la patente de EE.UU. N° 6.177.403, se puede emplear también por el experto en la técnica para administrar los viriones mutantes en la vasculatura de una extremidad aislada para mejorar potencialmente la transducción en células o tejido muscular. Además de ello, para determinadas afecciones, puede ser deseable administrar los viriones mutantes al SNC de un sujeto. Por "SNC" se quiere dar a entender todas las células y tejido del cerebro y la médula espinal de un vertebrado. Por lo tanto, el término incluye, pero no está limitado a células neuronales, células gliales, astrocitos, fluido cerebrospinal (CSF), espacios intersticiales, hueso, cartílago y similares. Viriones de AAV recombinante o células transducidas *in vitro* pueden ser suministrados directamente al SNC o al cerebro mediante inyección en, p. ej., la región ventricular, así como al cuerpo estriado (p. ej., el núcleo caudado o putamen del cuerpo estriado), la médula espinal y la unión neuromuscular, o el lóbulo del cerebelo, con un agujero, catéter o dispositivo relacionado, utilizando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica tales como mediante inyección estereotáctica (véase, p. ej., Stein et al, *J Virol* 73:3424-3429,1999; Davidson et al., *PNAS* 97: 3428-3432, 2000; Davidson et al., *Nat. Genet.* 3:219-223,1993; y Alisky y Davidson, *Hum. Gene Ther.* 11:2315-2329, 2000).

25 La dosis de viriones de rAAV requerida para lograr un "efecto terapéutico" particular, p. ej., las unidades de dosis en genomas de vectores/por kilogramo de peso corporal (vg/kg), variarán en función de varios factores, incluyendo, pero no limitados a: la vía de administración del virión de rAAV, el nivel de la expresión del gen (o ARN anti-sentido o ribozima) requerido para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad o trastorno específico que esté siendo tratado, una respuesta inmune del huésped al virión de rAAV, una respuesta inmune del huésped al gen (o ARN anti-sentido o ribozima) del producto de expresión, y la estabilidad del producto gen (o ARN anti-sentido o ribozima). Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un intervalo de dosis de virión de rAAV para tratar un paciente que tiene una enfermedad o trastorno particular sobre la base de los factores antes mencionados, así como otros factores que son bien conocidos en la técnica.

35 En términos generales, por "efecto terapéutico" se quiere dar a entender un nivel de expresión de uno o más HNAs suficientes para alterar un componente de una enfermedad (o trastorno) hacia un resultado o criterio de valoración clínico deseado, de modo que una enfermedad o trastorno del paciente muestra una mejora clínica, a menudo reflejada por la mejoría de un signo o síntoma clínico relacionado con la enfermedad o trastorno. Utilizando la hemofilia como un ejemplo de enfermedad específica, un "efecto terapéutico" para la hemofilia se define en esta memoria como un aumento en la eficiencia en la coagulación de la sangre de un mamífero afectado con hemofilia, determinándose la eficiencia, por ejemplo, por criterios de valoración o técnicas bien conocidos tal como empleando ensayos para medir el tiempo de coagulación de la sangre entera o el tiempo de protromboplastina activado. Las reducciones en el tiempo de coagulación de la sangre entera o el tiempo de protromboplastina activado son indicios de una eficiencia incrementada en la coagulación de la sangre. En casos graves de hemofilia, los hemofílicos que tienen menos de 1% de los niveles normales de Factor VIII o Factor IX tienen un tiempo de coagulación de la sangre entera de más de 60 minutos, en comparación con aproximadamente 10 minutos para los no hemofílicos. La expresión de 1% o mayor de Factor VIII o Factor IX ha demostrado reducir el tiempo de coagulación de la sangre entera en modelos animales de hemofilia, de modo que al lograr una concentración plasmática de Factor VIII o Factor IX circulante mayor que 1% es probable lograr el efecto terapéutico deseado de un aumento en la eficiencia en la coagulación de la sangre.

50 Las construcciones de la presente descripción pueden utilizarse alternativamente para suministrar un HNA a una célula huésped con el fin de elucidar su o sus funciones fisiológicas o bioquímicas. El HNA puede ser un gen endógeno o heterólogo. Utilizando cualquiera de un enfoque *ex vivo* o *in vivo*, el experto puede administrar los viriones mutantes que contienen uno o más HNAs de función desconocida a un animal experimental, expresar el o los HNAs y observar cualesquiera cambios funcionales posteriores. Tales cambios pueden incluir: interacciones proteína-proteína, alteraciones en las vías bioquímicas, alteraciones en el funcionamiento fisiológico de las células, tejidos, órganos o sistemas de órganos, y/o la estimulación o el silenciamiento de la expresión génica.

55 Alternativamente, el experto puede sobre-expresar un gen de función conocida o desconocida y examinar sus efectos *in vivo*. Este tipo de genes pueden ser endógenos para el animal experimental o de naturaleza heteróloga (es decir, un transgén).

Mediante el uso de los métodos de la presente descripción, el experto en la materia también puede suprimir o reducir significativamente la expresión génica, empleando con ello otros medios para determinar la función génica. Un método de lograr esto es por medio de la administración de viriones de rAAV que contienen ARN antisentido a un animal experimental, la expresión de la molécula de ARN antisentido para que el gen endógeno objetivo es "inactivado", y luego observando cualesquiera cambios fisiológicos o bioquímicos subsiguientes.

Los métodos de la presente descripción son compatibles con otras tecnologías bien conocidas tales como ratones transgénicos y ratones inactivados y se puede utilizar para complementar estas tecnologías. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente combinaciones de tecnologías conocidas con los métodos de la presente descripción para obtener información útil sobre la función del gen.

Una vez suministrado, en muchos casos no es suficiente expresar simplemente el HNA; en su lugar, a menudo es deseable variar los niveles de expresión de HNA. La variación de los niveles de expresión de HNA, que varía la dosis del producto de expresión de HNA, es con frecuencia útil para adquirir y/o depurar información funcional sobre el HNA. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la incorporación de un promotor inducible heterólogo en el virión de rAAV que contiene el HNA, de modo que el HNA será expresado sólo cuando se induzca el promotor. Algunos promotores inducibles también pueden proporcionar la capacidad para el depurado de los niveles de expresión de HNA; es decir, la variación de la concentración de inductor ajustará la concentración del producto de expresión de HNA. Esto a veces es más útil que tener un sistema "on-off" (es decir, cualquier cantidad de inductor proporcionará el mismo nivel de producto de expresión de HNA, una respuesta "todo o nada"). Numerosos ejemplos de promotores inducibles son conocidos en la técnica, incluyendo el promotor de ecdisona, promotores esteroides (p. ej., promotores estrógenos y andrógenos) y promotores de metalotioneína.

3. EXPERIMENTAL

Más adelante se presentan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente descripción. Los ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos. Es de señalar que en la medida en que los ejemplos se refieran a la materia objeto de las reivindicaciones, los mismos serán ilustrativos de la invención. Todos los otros ejemplos se proporcionan únicamente para fines informativos.

Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se permitirá algún error y desviación experimental.

EJEMPLO 1

PREPARACIÓN DE VIRIÓN MUTANTE DE AAV-LACZ RECOMBINANTE Y PROPIEDADES DEL MISMO

Viriones de AAV-2 recombinantes que contenían el gen β -galactosidasa (rAAV-2 lacZ) se prepararon utilizando un proceso de triple transfección descrito en la patente de EE.UU. N° 6.001.650. La secuencia completa de ADNc para β -gal está disponible bajo GenBank N° de Acceso NC 000913 REGIÓN: complemento (362455 .. 365529).

I. Construcción del Vector

A. Vector de la Función Helper de AAV Mutante

Basándose en la estructura de AAV-2 (véase, Xie et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2002) 99:10405-10410), se construyeron 61 mutantes mediante mutagénesis específica del sitio, dirigida a oligonucleótidos. Toda la superficie de AAV se compone de 60 unidades estructurales asimétricas idénticas dispuestas en una forma icosaédrica. Esto tiene dos implicaciones importantes. En primer lugar, cualquier mutación de un solo aminoácido que se haga se puede encontrar en 60 lugares en el virus, todos en la misma posición en relación con otros aminoácidos dentro de la unidad estructural asimétrica. En segundo lugar, mediante el estudio de una sola unidad estructural asimétrica se puede comprender toda la superficie del virus.

La estructura de AAV-2 se determinó como sigue. Coordenadas para la proteína de la cápside de AAV-2 monomérica (aminoácidos 217-735 de VP1; aminoácidos 80-598 de VP2) se obtuvieron de Protein Data Bank (número de identificación 1LP3). La estructura se analizó utilizando la versión Swiss PDB Viewer 3.7, la versión Vector NTI 3D-Mol 8.0 (Invitrogen, Inc.), o Chime (MDL Information Systems, Inc. Estructuras multiméricas de la cápside de AAV-2 se generaron utilizando el programa generador de oligómeros en el sitio web de Virus Particle Explorer (VIPER), utilizando las funciones de transformación de coordenadas de Swiss PDB viewer junto con la matriz de coordenadas en el archivo PDB (1LP3), o se descargaron de la base de datos de la estructura cuaternaria de proteínas en el European Bioinformatics Institute (nombre de archivo = 1lp3). Se analizaron posibles sitios de

unión de anticuerpo en multímeros de la cápside de AAV-2 construyendo la unidad estructural asimétrica de la cápside de AAV-2 y luego ensamblando manualmente una estructura de IgG (anticuerpo monoclonal IgG2a murino; PDB número de identificación 1IGT) a esa estructura o a otras unidades multiméricas de la cápside de AAV-2 utilizando Swiss PDB Viewer. Las distancias, los enfrentamientos de aminoácidos y las zonas de contacto entre la IgG y la cápside de AAV-2 podrían evaluarse utilizando las herramientas adecuadas en el programa Swiss PDB Viewer.

Se aplicaron varios criterios para seleccionar qué aminoácidos de un total de aproximadamente 145 aminoácidos externos, expuestos en la superficie (dentro de cada una de las 60 unidades estructurales asimétricas idénticas, véase la Figura 1) mutaban. Las mutaciones se realizaron sólo en los aminoácidos externos "expuestos en la superficie", aunque es posible que los aminoácidos debajo de la superficie externa o sobre la superficie interna influyan en la unión del anticuerpo. Los aminoácidos que fueron mutados eran aquellos con cadenas laterales previstas como las más accesibles a la unión de anticuerpos. Esto incluía los aminoácidos en los rasgos que sobresalen de la cápside, conocidos como "pico", "cilindro" y "meseta". Estos rasgos que sobresalen son a menudo dianas para la unión de anticuerpos neutralizantes. Los aminoácidos en zonas que no eran lo suficientemente amplias como para alojar a un anticuerpo ("cañón", "surcos", centro del eje de simetría de 3 pliegues, centro del eje de simetría de 5 pliegues) no estaban mutados. Además de ello, la cadena lateral de aminoácido se seleccionó en base a una zona expuesta de al menos 20 Å², porque disminuciones de 20 Å² o más en la zona de contacto entre un antígeno y un anticuerpo (de una zona de contacto total de aproximadamente 600 Å² a 900 Å²) pueden tener un efecto mensurable sobre la afinidad antígeno-anticuerpo y, por lo tanto, sobre el título de neutralización del anticuerpo. Los aminoácidos seleccionados eran aquellos con la cadena lateral (y no sólo la cadena principal peptídica) expuesta. Se supuso que si sólo la cadena principal peptídica estaba expuesta, entonces un anticuerpo que se unía a un aminoácido de este tipo podía no ser capaz de discriminar bien entre diversos aminoácidos, puesto que todos los aminoácidos tienen la misma cadena principal peptídica. Finalmente, zonas relativamente planas de antígenos proteicos interactúan a menudo con zonas relativamente planas de anticuerpos, de manera que los aminoácidos seleccionados para la mutación se encontraban en una zona relativamente plana (lado del pico, parte superior del cilindro, parte superior de la meseta). La aplicación de todos los criterios anteriores a los aproximadamente 145 aminoácidos de la cápside situados en la superficie externa de AAV-2 resultó en la selección de 72 posiciones que serían más propensas a afectar a la unión de anticuerpos neutralizantes cuando se cambiaba a otros aminoácidos. La ubicación de estos aminoácidos se indica en la Figura 2 y se lista en las Tablas 1, 4 y 5.

La mayoría de los 127 mutantes (en las 72 posiciones) que se hicieron cambiaron los aminoácidos individuales a alanina, utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica de la biología molecular. Se eligió la alanina, porque se ha determinado que, de todas las mutaciones que se podrían hacer, la alanina es la menos perjudicial para la estructura de la proteína. También, dado que alanina solamente tiene una cadena lateral de metilo, el cambio de la mayoría de los otros aminoácidos a alanina es probable que interrumpa la unión del anticuerpo. Es decir, en comparación con otros aminoácidos, alanina es menos inmunogénica porque carece de una cadena lateral que contribuye de manera significativa a las zonas de contacto antígeno/anticuerpo y, por lo tanto, a la afinidad de antígeno/anticuerpo. Obsérvese que la numeración que sigue se basa en la secuencia de VP2 de AAV-2 tal como se representa en la Figura 9. Unas pocas posiciones se cambiaron a un aminoácido distinto de alanina. Por ejemplo, en la posición 356 en donde ya hay una alanina, se insertó una arginina. La arginina es lo suficientemente polar como para permanecer en la superficie del AAV y lo suficientemente grande que podría interferir con la unión de los anticuerpos. Existen cinco glicinas que puedan ser accesibles a los anticuerpos. Glicinas se encuentran a menudo cuando gira una cadena peptídica y, por lo tanto, puede ser un componente crítico de la estructura. La mutación de glicinas puede ser problemática debido a la posibilidad de que la estructura pueda ser drásticamente alterada. Por lo tanto, cada una de las cinco glicinas en la superficie de AAV-2 fue considerada sobre una base de caso por caso para decidir qué cambiar en ellas. G128 fue cambiada a aspartato, porque glicina 128 se encuentra en AAV-1 a 6, a excepción de AAV-5, en donde la posición 128 es un ácido aspártico. G191 fue cambiada a serina porque glicina 191 se encuentra en AAV-1 a 6, a excepción de AAV-5, en donde la posición 191 es una serina. G329 fue cambiada a arginina, porque glicina 329 se encuentra en AAV-1 a 6, a excepción de AAV-4, en donde la posición 329 es una arginina. G375 fue cambiada a prolina porque glicina 375 está conservada en AAV-1 a 6 y se pensó que la prolina podría preservar un giro en la cadena del péptido encontrado en esa posición. G449 fue cambiada a alanina, porque, aunque es serina o asparagina en otros AAVs, está entre R448 y R451 en AAV-2, que son críticos para la unión de heparina y la transducción. Por lo tanto, la posición 449 se mutó a un aminoácido más cercano en tamaño a glicina (es decir, alanina). En algunos casos se aislaron mutantes dobles (S130A/N131A, N360H/S361A, S361A/N358K, S361A/S494P, S361A/R592K) además del mutante deseado. Estos fueron presumiblemente un resultado de errores en la polimerasa introducidos durante la mutagénesis, pero se ensayaron como los otros mutantes.

Vectores de función helper de AAV se construyeron utilizando pHLPI9 (descrito en la Patente de EE.UU. N° 6.001.650), 116 oligodesoxinucleótidos mutagénicos y un kit de mutagénesis *in vitro* (Quik Change XL, Stratagene, San Diego, CA). En síntesis, dos oligodesoxinucleótidos complementarios, cada uno de los cuales contiene una secuencia mutante deseada y tienen una temperatura de fusión entre 74-83°C (calculado utilizando la ecuación: $T_m = 81,5 + 0,41 (\%G+C) - (675/N) - \% \text{ apareamiento erróneo}$, en donde G es guanosina, C es citosina, N es la longitud

del cebador en nucleótidos) se mezclaron por separado con pHLp19. Se realizaron tres ciclos de PCR utilizando las siguientes condiciones: la desnaturalización se realizó a 95°C durante 1 min, la reasociación se realizó a 60°C durante 1 min y la extensión se realizó a 68°C durante 1 min. A continuación, las dos reacciones separadas se mezclaron y se sometieron a 18 ciclos adicionales de PCR utilizando las siguientes condiciones: la desnaturalización se realizó a 95°C durante 1 min, la reasociación se realizó a 60°C durante 1 min, y la extensión se realizó a 68°C durante 15 min. Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción Dpn I para destruir plásmidos totalmente metilados o hemi-metilados (es decir, no mutantes), y luego fueron transformados en la cepa de *E. coli* XL-10 (Stratagene). Se recogió una colonia de cada una de las reacciones de mutagénesis, se prepararon 500 ng de ADN de plásmido y se sometieron a secuenciación de ADN. Un subconjunto de los oligodesoxinucleótidos mutagénicos se utilizaron como cebadores de secuenciación para confirmar las secuencias de mutantes. En cada caso se secuenció el gen de la cápside entera. La mayoría de los mutantes se pudo aislar de esta manera. Si un mutante no se aisló en la primera ronda de secuenciación de ADN, se recogieron 1-3 más colonias y se prepararon 500 ng de ADN del plásmido y se sometieron a secuenciación de ADN.

B. Vector de Función Accesorio pLadeno5

El vector de función accesoria pLadeno5 se construyó como sigue. Fragmentos de ADN que codifican las regiones de ARN E2a, E4 y VA aisladas de ADN de adenovirus serotipo-2 purificado (obtenido de Gibco/BRL) se ligaron en un plásmido denominado pAmpscript. El plásmido pAmpscript fue ensamblado de la siguiente manera. La mutagénesis dirigida a oligonucleótidos se utilizó para eliminar una región de 623 pb que incluía el poli-enlazador y la casete de expresión de complementación alfa de pBSII s/k+ (obtenida de Stratagene), y se reemplazó por un sitio EcoRV. La secuencia del oligo mutagénico utilizado en la mutagénesis dirigida al oligonucleótido era 5'-CCGCTACAGGGCGCGATATCAGCTCACTCAA-3' (SEQ ID NO: 1).

Un polienlazador (que contiene los siguientes sitios de restricción: Bam HI; KpnI ; SrfI ; XbaI; ClaI; Bst1 1071; Sall; PmeI y NdeI) se sintetizó y se insertó en el sitio EcoRV creado por encima, de manera que el lado BamHI del enlazador era proximal al origen f1 en el plásmido modificado para proporcionar el plásmido pAmpscript. La secuencia del polienlazador era

5'-GGATCCGGTACCGCCCGGGCTCTAGAATCGATGTATACGTCGACGTTTAAACCATATG-3' (SEQ ID NO: 2).

Fragmentos de ADN que comprenden las secuencias E2a de adenovirus serotipo 2 y ARN de VA fueron clonados directamente en pAmpscript. En particular, un fragmento (parcial) de SrfI-KpnI de 5962 pb que contiene la región E2a se clonó entre los sitios SrfI y KpnI de pAmpscript. El fragmento de 5962 pb comprende los pares de bases 21.606-27.568 del genoma del adenovirus serotipo-2. La secuencia completa del genoma del adenovirus serotipo-2 es accesible bajo GenBank N° 9626158.

El ADN que comprende las secuencias E4 del adenovirus serotipo 2 se modificó antes de que se insertara en el poli-enlazador pAmpscript. Específicamente, se utilizó la mutagénesis por PCR para reemplazar la repetición E4 proximal, adenoviral terminal con un sitio SrfI. La ubicación de este sitio SrfI es equivalente a los pares de bases 35.836-35.844 del genoma del adenovirus serotipo-2. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis fueron: 5'-AGAGCCCGGGCGTTTTAGGGCGGAGTAACCTTGC-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-ACATACCCGCAGGCGTAGAGAC-3' (SEQ ID NO: 4). Un fragmento de E4 de 3.192 pb, producido mediante la escisión del gen E4 modificado anteriormente descrito con SrfI y SpeI, se ligó entre los sitios SrfI y XbaI de pAmpscript que ya contenía las secuencias E2a y ARN de VA para dar como resultado el plásmido pLadeno5. El fragmento de 3.192 pb es equivalente a los pares de bases 32.644-35.836 del genoma del adenovirus serotipo-2.

C. Vector hF.IX de rAAV-2

El vector hF.IX de rAAV-2 es un plásmido de 11.442 pb que contiene el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), exón 1 de hF.IX, un fragmento de 1,4 kb del intrón 1 de hF.IX, los exones 2-8 de h.FIX, 227 pb de h.FIX 3' UTR, y la secuencia de poliadenilación tardía de SV40 entre las dos repeticiones terminales invertidas de AAV-2 (véase la Patente de EE.UU. N° 6.093.392). El fragmento de 1,4 kb del intrón 1 de hF.IX consiste en el extremo 5' del intrón 1 hasta el nucleótido 1098 y la secuencia desde el nucleótido 5882 que se extiende hasta la intersección con el exón 2. El promotor temprano inmediato de CMV y las secuencias señal de poliadenilación tardía de SV40 se pueden obtener a partir de la secuencia publicada de pCMV-Script®, que está disponible del catálogo de Stratagene, Stratagene, La Jolla, CA.

D. Vector lac Z de rAAV-2

Construcción del plásmido recombinante pVmLacZ de AAV

1. Un fragmento de ADN de Xba I de 4311 pb se escindió de pSUB201 que contiene secuencias rep/cap de AAV. Los extremos de Xba I fueron re-asociados con un oligonucleótido sintético Not I de 10 pb (5'-AGCGGCCGCT-3') (SEQ ID NO: 5) para dar un plásmido intermedio pUC/ITR-Not I que tiene tanto ITRs (repeticiones terminales invertidas) de AAV separadas por 116 pb de la secuencia AAV residual como ADN de enlazador Not I.
- 5 2. Un fragmento de ADN de Not I de 1319 pb se escindió de p1.1c que contiene el promotor de CMV y las secuencias de intrón hGH. Esta secuencia de ADN se insertó en el sitio Not I de pUC/ITR-Not I, para dar el pSUB201N intermedio.
3. Una casete de expresión de CMV de 1668 pb unida a ITR de Pvu II (5131-1493) se escindió de pSUB201N y se insertó en el sitio Pvu II (posición 12) de pWee.1a, para dar el intermedio de plásmido pWee.1b. La escisión del
10 fragmento PvuII de 1668 pb de pSUB201N separó 15 pb desde el exterior de cada una de las ITRs, en la región palindrómica "A".
4. Una secuencia de ADN Not I/Eco RV "AAVrep/cap" de 4737 pb que se escindió de pGN1909 y los extremos se hicieron romos rellenando los extremos rebajados en 3' utilizando ADN polimerasa de Klenow. Enlazadores Asc I se ligaron a ambos extremos, seguido de la clonación de este fragmento de ADN "pGN1909/AscI" en la cadena principal de pWee1909 en un sitio Asc I (2703), para dar el pWee1909 intermedio (8188 pb). Este plásmido tiene la
15 casete de expresión de CMV unida a ITR con una cadena principal del gen rep/cap de AAV.
5. Un gen Sma I/Dra I LacZ de 3246 pb se escindió de pCMV-beta y los enlazadores Asc I se ligaron al fragmento de extremos romos. Este fragmento LacZ/Asc I se clonó en p1.1c entre los sitios Bss HII, para dar p1.1cADHLacZ, que tiene el gen LacZ dirigido por el promotor de CMV.
- 20 6. Un fragmento de ADN Not I de 4387 pb se escindió de p1.1cADHLacZ que tiene el gen LacZ dirigido por el promotor de CMV. Este fragmento se insertó entre los sitios Not I de pWee1909, después de separar una casete de expresión de "promotor de CMV/intrón de hGH" de 1314 pb. La construcción resultante, pW1909ADHLacZ, tiene el gen β -galactosidasa bajo el control del promotor de CMV y ligado por ITRs. La cadena principal del plásmido porta los genes "rep" y "cap" que proporcionan funciones helper de AAV y el gen β -lactamasa (ampicilina) gen confiere
25 resistencia a los antibióticos.
7. Un fragmento de ADN Sse I de 4772 pb que contiene una casete "CMV/LacZ" se escindió de pW1909ADHLacZ y se insertó en el sitio Sse I de pUC19, para dar Pre-pVLacZ. Esta construcción todavía contiene aproximadamente 50 pb de las secuencias pSUB201 5' y 3' remanentes internas a cada una de las ITRs.
8. Las secuencias pSUB201 remanentes fueron separadas mediante escisión 2912 bp de un fragmento de ADN Msc I "pUC/ Δ ITR" de Pre-pVLacZ, que también separa aproximadamente 35 pb de la región "D" de cada una de las ITRs. Un enlazador sintético "145NA/NB" (5'-CCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCC-3') (SEQ ID NO: 6) que contiene un sitio de restricción Msc I, la región "D" de ITR y un sitio Not I se utilizó para la clonación en un fragmento de Not I de 4384 pb de pW1909ADHLacZ, que tiene la casete de expresión "CMV/LacZ". El plásmido resultante
30 pVLacZ, tiene al gen β -galactosidasa bajo el control de una secuencia potenciadora de la alcohol deshidrogenasa y el promotor de CMV, todos ligados por ITRs de AAV.
- 35 9. pVLacZ se modificó adicionalmente separando elementos LacZ y la secuencia de poli-enlazador fuera de la casete de expresión de LacZ ligada por ITR, como sigue. Una secuencia Ehe I/Afl III-LacZ/polienlazador de 534 pb se escindió de pUC119, los extremos se hicieron romos utilizando ADN polimerasa de Klenow y el plásmido se ligó a un enlazador Sse I (5'-CCTGCAGG-3') (SEQ ID NO: 7), para producir pUC119/Sse I. La secuencia de ADN "AAVLacZ" se separó de pVLacZ cortando un fragmento de Sse I de 4666 pb. Este fragmento de Sse I se clonó en el sitio Sse I de pUC119/SseI para generar pVmLacZ. pVmLacZ tiene el promotor de CMV/potenciador de ADH/gen β -galactosidasa ligado por ITRs de AAV en una cadena principal derivada de pUC119 que confiere resistencia a la ampicilina y tiene un origen de replicación con un alto número de copias.

II. Proceso de Transfección Triple

- 45 Los diversos vectores de la función helper de AAV mutados (arriba descritos), el vector de función accesoria pLadeno5 (descrito en la patente de EE.UU. N° 6.004.797) y el vector de rAAV2-lacZ, pVmLacZ (descrito anteriormente) se utilizaron para producir viriones recombinantes.

En síntesis, células de riñón embrionario humano tipo 293 (American Type Culture Collection, número de catálogo CRL-1573) se sembraron en placas estériles tratadas con cultivo de tejidos de 10 cm a una densidad de 3×10^6
50 células por placa en 10 mL de medio de cultivo celular que consiste en medio de Eagle modificado por Dulbecco

5 suplementado con suero de ternera fetal al 10% y se incubaron en un ambiente humidificado a 37°C en 5% de CO₂. Después de la incubación durante la noche, las células 293 eran aproximadamente un ochenta por ciento confluente. Las células 293 fueron entonces transfectadas con ADN mediante el método de precipitado de fosfato de calcio, un método de transfección bien conocido en la técnica. 10 µg de cada uno de los vectores (pHLP19 mutado, pLadeno5 y pVM lacZ.) se añadieron a un tubo con tapa a presión de poliestireno, estéril, de 3 mL utilizando puntas de pipeta estériles. 1,0 mL de CaCl₂ 300 mM (calidad JRH) se añadió a cada uno de los tubos y se mezcló pipeteando arriba y abajo. Un volumen igual de 2X HBS (NaCl 274 mM, KCl 10 mM, HEPES 42 mM, Na₂PO₄ 1,4 mM, dextrosa 12 mM, pH 7,05, calidad JRH) se añadió con una pipeta de 2 mL, y la disolución se pipeteó arriba y abajo tres veces. La mezcla de ADN se añadió inmediatamente a las células 293, una gota de una vez, uniformemente por toda la placa. Las células se incubaron entonces en un ambiente humidificado a 37°C en 5% de CO₂ durante seis horas. Un precipitado granular era visible en los cultivos de células transfectadas. Después de seis horas, la mezcla de ADN se separó de las células, que entonces se proveyeron de medio de cultivo celular reciente sin suero de ternera fetal y se incubaron durante 72 horas adicionales.

15 Después de 72 horas, las células se lisaron mediante 3 ciclos de congelación sobre dióxido de carbono sólido y se descongelaron en un baño de agua a 37°C. Lisados de congelación-descongelación de este tipo de las células transfectadas se caracterizaron con respecto a la síntesis total de la cápside (mediante transferencia Western), al empaquetamiento de ADN (mediante Q-PCR), unión a heparina, transducción *in vitro* (en células HeLa o HepG2 más adenovirus-2 o etopósido) y neutralización por anticuerpos.

III. Propiedades de los viriones mutantes

20 A. Ensayo de Síntesis de la Cápside

Las mutaciones en proteínas pueden hacerlos inestables y más susceptibles de lo normal a la degradación por proteasas. Con el fin de determinar el nivel de cápsides hechas por los mutantes descritos en esta memoria, se realizó la transferencia Western de lisados brutos. Un microlitro de cada uno de los lisados brutos se desnaturizó mediante incubación en Tris 20 mM, pH 6,8, SDS al 0,1% a 80°C durante 5 minutos. Las proteínas se fraccionaron mediante SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida al 10% (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y luego se detectaron mediante transferencia Western de la siguiente manera. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente (módulo de transferencia Xcell II, Invitrogen, Carlsbad, CA) a membranas de nilón (Hybond-P, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las membranas se sondearon con un anticuerpo anti-AAV (clon monoclonal B1, Maine Biotechnology Services, Inc. Portland, ME) a una dilución de 1:20 y luego con un anticuerpo anti-ratón de oveja acoplado a peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.) a una dilución de 1:12000. Las proteínas de unión a anticuerpos B1 se detectaron utilizando el sistema de detección de transferencia Western ECL Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.). Las membranas se expusieron a una película de rayos X Biomax MS, Kodak, Rochester, NY) durante 1-5 minutos y las señales se cuantificaron utilizando un aparato Alphamager 3300 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA).

35 B. Ensayo de empaquetamiento de ADN

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR) para evaluar el empaquetamiento de ADN por parte de viriones de AAV-2 con cápsides mutantes. En este proceso, el lisado bruto se digirió con DNasa I antes de la amplificación por PCR para separar cualquier plásmido (utilizado en la transfección) que pudiera dar lugar a una falsa señal positiva. Los lisados brutos se diluyeron 100 veces (5 µl de lisado bruto más 495 µl de tampón) en Tris 10 mM, pH 8,0, 10 µg/ml de ARNt de levadura. Una parte alícuota de la dilución (10 µl) se digirió con 10 unidades de DNasa I (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) en Tris 25 mM, pH 8,0, MgCl₂ 1 mM, a 37°C durante 60 minutos en un volumen final de 50 µl. La DNasa I se inactivó mediante calentamiento a 95°C durante 30 minutos. Se añadió un microlitro (20 µg) de Proteinasa K (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) y se incubó a 55°C durante 30 minutos. La proteinasa K se inactivó mediante calentamiento a 95°C durante 20 minutos. En este punto, la muestra se diluyó en Tris 10 mM, pH 8,0, 10 µg/ml de ARNt de levadura si es necesario. Diez microlitros de muestra tratada con DNasa I y proteinasa K se añadieron a 40 µl de mezcla patrón Q-PCR, que consistía en:

4 µl de H₂O

5 µl de cebador lac Z 9 µM nº LZ-1883F (5'-TGCCACTCGCTTTAATGAT-3', (SEQ ID NO: 8) Operon, Inc., Alameda, CA)

50 5 µl de cebador lac Z 9 µM nº LZ-1948R (5'-TCGCCGCACATCTGAACTT-3', (SEQ ID NO: 9) Operon, Inc., Alameda, CA)

1 µl de sonda lacZ 10 µM nº LZ-1906T (5'-6FAM- AGCCTCCAGTACAGCGCGGCTGA-TAMRA-3', (SEQ ID NO: 10) Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA)

25 µl de Mezcla Patrón PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA)

55 Una amplificación mediante Q-PCR se realizó utilizando un Sistema de Detección de la Secuencia de Applied Biosystems modelo 7000 de acuerdo con el siguiente programa. Había dos incubaciones iniciales a 50°C

durante 2 minutos y a 95°C durante 10 minutos para activar la Taq polimerasa y desnaturalizar el molde de ADN, respectivamente. A continuación, el ADN se amplificó mediante incubación a 95°C durante 15 s, a continuación a 60°C durante 60 segundos durante 40 ciclos.

- 5 Se construyó una curva patrón utilizando diluciones de 4 veces de pV_m lac Z linearizado que oscila entre un número de copias de 61 a 1.000.000. El número de copias de genomas de rAAV-lacZ empaquetados en cada una de las muestras se calculó a partir de los valores de C_t obtenidos de la Q-PCR utilizando el software versión 1.0 Sequence Detection System de Applied Biosystems Prism 7000.

C. Ensayo de unión a Heparina

- 10 La unión a heparina de los virus en lisados brutos se realizó como sigue. Veinte microlitros de lisado celular bruto que contenía viriones de AAV-2 con cápsides de tipo salvaje o mutantes se mezclaron con 25 µl de una suspensión al 50% de perlas de heparina. Las perlas de heparina (Ceramic Hyper-DM Hydrogel-Heparin, Biosepra, Cergy-Saint-Christophe, Francia) eran de 80 µm de diámetro y tenían poros de 1000 Å para permitir que el AAV (que es de ~300 Å de diámetro) acceda a la heparina. Las perlas se lavaron a fondo en disolución salina tamponada con fosfato antes de su uso. Las perlas y los viriones se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Las perlas se sedimentaron. Se guardó el sobrenadante que contenía viriones no ligados. Las perlas se lavaron 2 veces con 500 µl de PBS. Los sobrenadantes se reunieron y las proteínas de la cápside no ligadas se precipitaron con ácido tricloroacético a una concentración final de 10%. Las proteínas precipitadas se desnaturalizaron mediante incubación en Tris 20 mM, pH 6,8, SDS al 0,1% a 80°C durante 5 minutos. Los viriones ligados a perlas de heparina fueron liberados mediante incubación de las perlas en Tris 20 mM, pH 6,8, SDS al 0,1% a 80°C durante 5 minutos. Todas las muestras de proteínas preparadas de esta manera se fraccionaron por el peso molecular mediante SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida al 10% (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) y luego se detectaron mediante transferencia Western de la siguiente manera. Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nilón (Hybond-P, Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.). Las membranas eran sondas con un anticuerpo anti-AAV (clon monoclonal B1, Maine Biotechnology Services, Inc. Portland, ME) a una dilución de 1:20 y luego con un anticuerpo anti-ratón de oveja acoplado a peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.) a una dilución de 1:12000. Las proteínas de unión a anticuerpos B1 se detectaron utilizando el sistema de detección de transferencia Western ECL Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.). Las membranas se expusieron a una película de rayos X Biomax MS, Kodak, Rochester, NY) durante 1-5 minutos y las señales se cuantificaron utilizando un aparato Alphamager 3300 (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA).

30 D. Ensayo de transducción *in vitro*.

- Células HeLa (American Type Culture Collection, n° de catálogo CCL-2) se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 5e4 células por pocillo. Las células se cultivaron durante 24 h en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco) y penicilina-estreptomina (Gibco) a 37°C. Diluciones décuplos de lisados brutos que contienen los virus control de tipo salvaje y mutantes se hicieron en DME/FBS al 10%. Las diluciones de virus se añadieron a las células junto con el adenovirus-5 de tipo salvaje (American Type Culture Collection, n° de catálogo VR-5). La cantidad de adenovirus utilizado era 0,1 µl por pocillo, que se tituló previamente y demostró estimular al máximo transducciones rAAV-2 lac Z de células HeLa. Después de 24 horas a 37°C, las células se fijaron utilizando formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% y se tiñeron para la actividad de β-galactosidasa utilizando 1 mg/ml (2,5 mM) de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido en PBS, MgCl₂ 2 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM, pH 7,2. Después de otras 24 horas, se contó el número de células azules en cuatro campos microscópicos al azar y se calculó la media para cada uno de los pocillos. En lugar de utilizar células HeLa y adenovirus-5, también se podrían utilizar células HepG2 y etopósido 20 µM, y se obtuvieron resultados similares.

E. Ensayos de neutralización de anticuerpos y suero.

- 45 Células Hep G2 (American Type Culture Collection, n° de catálogo HB-8065) se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 1,5e5 células por pocillo. Las células se cultivaron durante 24 h en medio mínimo esencial (de Eagle) (KMEM) (ATCC) suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina-estreptomina a 37°C. Diluciones dobles del anticuerpo A20 (Maine Biotechnology, Portland, ME) se hicieron utilizando PBS. Virus de tipo salvaje y mutante se diluyó mezclado 1 microlitro de lisado bruto de la preparación viral con 15 microlitros de KMEM/Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 0,1%. Muestras de KMEM/BSA al 0,1% y PBS se incluyeron como controles negativos. Un total de 16 µL de la dilución de A20 se mezcló con 16 µL de virus y se incubó a 37°C durante una hora. Diez microlitros de la mezcla de virus/A20 se añadieron a cada uno de tres pocillos de células. Después de una hora de incubación a 37°C, se añadió etopósido (disolución patrón 20 mM en dimetilsulfóxido, Calbiochem) se añadió a cada uno de los pocillos a una concentración final de 20 µM. Después de 24 horas, las células se fijaron utilizando formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% y se tiñeron para la actividad de β-galactosidasa utilizando 1 mg/ml (2,5

mM) de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido en PBS, $MgCl_2$ 2 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM, pH 7,2. Después de otras 24 horas, se contó el número de células azules en cuatro campos microscópicos al azar y se calculó la media para cada uno de los pocillos. El título de neutralización de un anticuerpo se define como la dilución de anticuerpo a la cual hay una reducción del 50% en el número de eventos de transducción virales (es decir, células azules) en comparación con la transducción en ausencia de anticuerpo.

La neutralización de mutantes por sueros humanos recogidos de hemofílicos o a IgG humana purificada de > 10.000 donantes (Panglobulina, ZLB Bioplasma AG, Berna, Suiza) se ensayó de la misma manera. Para IgG humana purificada, se consideró que una concentración de 10 mg/ml era equivalente a sueros sin diluir, ya que la concentración normal de IgG en sueros humanos varía de 5-13 mg/ml.

10 F. ELISAs

(a) ELISA de A20:

Se utilizó un kit de ELISA (American Research Products, Belmont, MA) que utiliza un anticuerpo monoclonal (A20) para capturar y detectar AAV-2 para cuantificar el número de partículas. El kit se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La densidad óptica se midió en un lector de placas Spectramax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de 450 nm. Se calculó la concentración de virus necesaria para resultar en una lectura de la densidad óptica máxima media y se utilizó para comparar los resultados de diferentes muestras.

(b) ELISA de IgG/A20:

Placas de microtitulación (96 pocillos, EIA/RIA de fondo plano, poliestireno de alta unión, Costar, Corning, NY) se recubrieron con 100 μ l (10 μ g) de Panglobulina en tampón bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 9,2 durante 16 horas a 20°C. Las placas se bloquearon con 200 μ l de PBS, BSA al 1%, Tween-20 al 0,05% durante 1 hora a 20°C. Se añadieron cantidades crecientes de AAV-2 nativo o mutante purificado con gradiente de CsCl que oscilan entre $3,0^8$ y $1,0^{10}$ genomas de vector por pocillo y se incubaron durante 16 horas a 20°C. El virus no ligado se separó por lavado utilizando partes alícuotas de 3-200 μ l de PBS, tampón Tween-20 al 0,1%. A20-biotina del kit de ELISA de AAV-2 se diluyó en la relación 1:50, se añadieron 100 μ l por pocillo y se incubó durante 1 hora a 37°C. A20-biotina no ligada se separó por lavado utilizando partes alícuotas de 3-200 μ l de PBS, tampón Tween-20 al 0,1%. Después estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante se diluyó en la relación 1:20 y se incubó durante 1 hora a 37°C. Estreptavidina-HRP no ligada se separó por lavado utilizando partes alícuotas de 3-200 μ l de PBS, tampón Tween-20 al 0,1%. Se añadieron sustratos de peroxidasa de rábano picante (kit de sustrato Immunopure TMB Pierce, Rockford, IL) y se incubaron durante 15 min a 20°C. La reacción se detuvo con 100 μ l de ácido sulfúrico 2M y la densidad óptica se midió en un lector de placas Spectramax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de 450 nm. Se calculó la concentración de virus necesaria para resultar en una lectura de la densidad óptica máxima media y se utilizó para comparar los resultados de diferentes muestras.

(c) ELISA de IgG:

Placas de microtitulación (96 pocillos, EIA/RIA de fondo plano, poliestireno de alta unión, Costar, Corning, NY) se recubrieron con cantidades crecientes de AAV-2 nativo o mutante purificado con gradiente de CsCl que oscilan entre $3,0^8$ y $1,0^{10}$ genomas de vector por pocillo durante 16 horas a 20°C. en tampón bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 9,2 durante 16 horas a 20°C. Las placas se bloquearon con 200 μ l de PBS, BSA al 1%, Tween-20 al 0,05% durante 1 hora a 20°C. El virus no ligado se separó por lavado utilizando partes alícuotas de 3-200 μ l de PBS, tampón Tween-20 al 0,1%. Se añadió Panglobulina y se incubó durante 1 hora a 37°C. La Panglobulina no ligada se separó por lavado utilizando partes alícuotas de 3-200 μ l de PBS, tampón Tween-20 al 0,1%. Después se añadió IgG anti-humana de burro, acoplada a peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y se incubó durante 1 hora a 37°C. El anticuerpo secundario no ligado se separó por lavado utilizando partes alícuotas de 3-200 μ l de PBS, tampón Tween-20 al 0,1%. Se añadieron sustratos de peroxidasa de rábano picante (kit de sustrato Immunopure TMB Pierce, Rockford, IL) y se incubaron durante 15 min a 20°C. La reacción se detuvo con 100 μ l de ácido sulfúrico 2M y la densidad óptica se midió en un lector de placas Spectramax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de 450 nm. Se calculó la concentración de virus necesaria para resultar en una lectura de la densidad óptica máxima media y se utilizó para comparar los resultados de diferentes muestras.

El empaquetamiento del ADN, la unión a heparina y las propiedades de transducción de mutantes aquí descritos se resumen en la Tabla 1. Las propiedades de neutralización de anticuerpos de algunos de los mutantes descritos aquí se resumen en las Tablas 2 y 3.

Tabla 1. Propiedades mutantes de la cápside de AAV-2.

ES 2 563 064 T3

<u>Mutante¹</u>	<u>Síntesis de la cápside²</u>	<u>Empaquetamiento de ADN³</u>	<u>Unión a heparina⁴</u>	<u>Transducción⁵</u>
tipo salvaje	100	100	>95	100
Q126A	65	67	>95	55
Q126A/S127L	78	4	>95	0,02
S127A	68	98	>95	53
G128D	100	674	>95	0,02
Δ 128ins1	77	777	>95	0,02
S130A/N131A	55	nt	>95	0,02
N131A	67	563	>95	0,005
D132A	75	23	>95	0,04
H134A	44	540	>95	2
Q188A	55	16	>95	0,36
D190A	60	51	>95	95
G191S	108	18	>95	22
T193A	38	7	>95	6
S247A	18	83	>95	24
Q248A	60	374	>95	280
S315A	101	122	>95	232
T317A	101	111	>95	208
T318A	100	132	>95	224
Q320A	97	89	>95	68
R322A	100	560	>95	106
G329R	43	21	>95	0,24
S331A	168	80	>95	158
D332A	85	474	>95	8
R334A	169	601	>95	79
D335A	136	127	>95	38
T354A	132	301	>95	93
S355A	69	353	>95	38
S355T	110	183	>95	88
A356R	85	18	25	13
D357A	39	166	>95	4
N359A	24	365	>95	89
N360A	8	246	>95	33
N360H/S361A	145	472	>95	38
S361A	81	608	>95	89
S361A/N358K	59	nt	>95	0,45
S361A/S494P	87	nt	90	0,02
S361A/R592K	108	nt	90	180
E362A	149	56	>95	12
W365A	195	60	>95	4
T366A	151	8	>95	0,01
G375P	221	82	50	0,01

ES 2 563 064 T3

<u>Mutante¹</u>	<u>Síntesis de la cápside²</u>	<u>Empaquetamiento de ADN³</u>	<u>Unión a heparina⁴</u>	<u>Transducción⁵</u>
D377A	211	80	>95	20
K390A	155	267	>95	189
D392A	98	48	>95	0,01
E393A	54	81	>95	2
E394A	29	108	>95	22
K395A	34	2046	>95	14
F396A	178	nt	>95	148
K407A	220	112	>95	32
E411A	90	513	>95	20
T413A	233	34	>95	252
E418A	264	74	>95	37
K419A	81	806	>95	160
E437A	239	94	>95	24
Q438A	28	101	>95	92
G449A	104	106	>95	196
N450A	217	144	>95	207
Q452A	313	533	>95	473
N568A	439	412	>95	536
K569A	831	333	>95	20
V571A	98	251	>95	142

¹ Los mutantes se denominan de la siguiente manera: La primera letra es el aminoácido en la cápside de AAV-2 de tipo salvaje, el número es la posición en la cápside que fue mutada (numerada de acuerdo con la secuencia de VP2 de AAV-2) y la última letra es el aminoácido mutante. Δ128ins1 tiene el aminoácido 128 suprimido y la secuencia DASNDNLSSQSD insertada en su lugar.

² Según se determina mediante transferencia Western de lisados brutos. Expresado como porcentaje de la síntesis de la cápside de tipo salvaje.

³ ADN específico para el vector, resistente a ADNasa, cuantificado mediante Q-PCR y expresado como un porcentaje de tipo salvaje, que se normalizó a 100%. Media de 2 experimentos, cada uno realizado por triplicado. nt, no sometido a ensayo.

⁴ Unión a heparina, expresada como un porcentaje de tipo salvaje. Determinaciones individuales, excepto para el tipo salvaje, que está en una media de tres determinaciones, normalizado a 100%.

⁵ Transducción en células 293 humanas, expresada como un porcentaje del tipo salvaje. Media de 2 experimentos.

Tabla 2. Propiedades de neutralización de anticuerpos de mutantes de la cápside de AAV-2.

<u>Mutante de suero¹</u>	<u>Transducción</u> <u>(% de wt)</u>	<u>células azules</u> <u>(- suero)</u>	<u>células azules</u> <u>(+ suero)</u>	<u>% Neut.</u>	<u>Múltiplo resistente</u> <u>a neutralización</u>
HA2 tipo salvaje	100	13275	3	99,98	1,0
R334A	114	15102	146	99,04	42,7
N450A	89	11802	14	99,88	5,2
Tipo salvaje	100	25960	8	99,97	1,0
E394A	6	1593	6	99,64	11,2
T413A	21	5505	15	99,73	8,5
N360H/S361A	41	10691	7	99,94	2,0
HA151 tipo salvaje	100	11965	16	99,87	1,0
R334A	185	22125	459	97,93	15,8

ES 2 563 064 T3

<u>Mutante de suero</u> ¹	Transducción (% de wt)	células azules (- suero)	células azules (+ suero)	% Neut.	Múltiplo resistente a neutralización
E394A	16	1947	14	99,27	5,6
V571A	73	8732	39	99,56	3,4
G449A	218	26137	121	99,54	3,5
N568A	122	14632	36	99,75	1,9
N450A	95	11387	53	99,54	3,5
tipo salvaje	100	15989	13	99,92	1,0
E411A	18	2876	13	99,54	5,7
N360H/S361A	100	15989	21	99,87	1,6
HA165 tipo salvaje	100	22833	14	99,94	1,0
N360A	16	3717	9	99,75	4,0
R334A	74	16872	162	99,04	15,3
E394A	11	2566	2	99,91	1,4
N568A	102	23246	30	99,87	2,1
N450A	64	14514	26	99,82	2,9
N360H/S361A	49	9558	8	99,92	1,3

¹ Los mutantes se rastrearon rápidamente comparando el número de células transducidas que resultan de la infección de células HepG2 por parte de rAAV-2 lac Z con cápsides mutantes o de tipo salvaje en presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal (A20) a una dilución de 1:80 o suero policlonal humano a una dilución de 1:100.

5

Tabla 3. Propiedades de la titulación de anticuerpos de 4 anticuerpos frente a mutantes de la cápside de AAV-2.

Anticuerpo ² :	<u>Múltiplo de disminución en título neutralizante</u> ¹			
	A20	151	165	HA2
<u>Mutante</u> ³				
tipo salvaje	1,0	1,0	1,0	1,0
Q126A	2,5	NR	NR	NR
S127A	57,0	NR	NR	NR
S247A	2,8	NR	NR	NR
Q248A	5,7	NR	NR	NR
R334A	NR	3,6	2,4	2,0
N360H/S361A	NR	2,2	1,2	1,3
E394A	NR	2,1	1,2	1,9
N450A	NR	1,7	1,6	1,3

Resistencia multiplicativa predicha:

2415	29	6	11
------	----	---	----

10 ¹ Los títulos se determinaron utilizando diluciones dobles de anticuerpo monoclonal y ajustando los datos a una curva logística de cuatro parámetros utilizando el software Sigma Plot graphing.

Los valores indicados en la tabla son el múltiplo de disminución en el título de los mutantes en relación con la cápside de tipo salvaje. NR, no resistente a la neutralización por el anticuerpo indicado.

15 ² A20 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-AAV-2 purificado con proteína A. Sueros 151, 165 y HA2 son 3 sueros humanos no purificados.

³ Los mutantes se denominan como sigue: La primera letra es el aminoácido en la cápside de AAV-2 de tipo salvaje, el número es la posición en la cápside que fue mutado (numeradas de acuerdo con la secuencia de VP2 de AAV-2),

y la última letra es el aminoácido mutante. $\Delta 128\text{ins}1$ tiene el aminoácidos 128 suprimido y la secuencia DASNDNLSSQSD (SEQ ID NO: 11) insertada en su lugar.

5 Como puede verse, cambiando los aminoácidos individuales en la superficie de AAV-2 se identificaron 32 mutantes de 61 que tenía propiedades casi normales con respecto a la síntesis de la cápside, el empaquetamiento del ADN, la unión a heparina, y la transducción de células *in vitro*. Diez mutantes eran más resistentes a la neutralización por anticuerpos.

10 Los mutantes produjeron la proteína de la cápside a un nivel entre 5 veces inferior y 8 veces superior que la de tipo salvaje. Empaquetaron el ADN en un nivel entre 25 veces inferior y 20 veces superior que el de tipo salvaje. Con respecto a la transducción, 28 de los mutantes transdujeron al menos 50% de tipo salvaje, 16 transdujeron 10-50% de tipo salvaje, 6 transdujeron 1-10% de tipo salvaje y 11 transdujeron menos de 1% de tipo salvaje (Tabla 1). No hubo diferencias significativas en la transducción de células HeLa derivadas de carcinoma cervical humano o células Hep G2 derivadas de hígado humano, o cuando se utilizó cualquiera de adenovirus o etopósido para potenciar la transducción. Varios mutantes tenían de manera reproducible hasta 5 veces más actividad de transducción que el tipo salvaje (Tabla 1).

15 La mayoría de los mutantes con una actividad de transducción $< 1\%$ se agruparon en una sola zona, en un lado del sitio de unión a heparina (propuesto) (Tabla 1, compárese la Figura 4 con la Figura 5). Sin estar ligados por una teoría particular, las mutaciones cubren una zona que puede ser un sitio de unión a proteínas. El mutante que era más defectuoso para la transducción era N131A. No se ha descrito una función para N131, pero está conservada en 40 de los 42 subtipos de AAV conocidos.

20 Cuatro mutaciones afectaban de manera más notable a la unión a heparina que las otras (A356R, G375A, S361A/S494P, S361A/R592K). Cada una de éstas está próxima a R347, R350, K390, R448 y R451, que han sido previamente identificados como los aminoácidos que son importantes para la unión a heparina (Figura 5).

25 Cuarenta y cinco de los mutantes (Q126A, S127A, D190A, G191S, S247A, Q248A, S315A, T317A, T318A, Q320A, R322A, S331A, D332A, R334A, D335A, T354A, S355A, S355T, A356R, D357A, N359A, N360A, N360H/S361A, S361A, S361A/R592K, E362A, D377A, K390A, E393A, E394A, K395A, F396A, K407A, E411A, T413A, E418A, K419A, E437A, Q438A, G449A, N450A, Q452A, N568A, K569A, V571A) con más de aproximadamente el 10% de la actividad de transducción de la cápside de AAV-2 de tipo salvaje fueron rastreados en cuanto a la neutralización por el anticuerpo monoclonal murino A20. Cuatro mutantes (Q126A, S127A, S247A, Q248A) eran significativamente más resistentes a la neutralización por parte de A20 que VAA2 con una cápside de tipo salvaje (véase la Tabla 3). El título de estos mutantes (Q126A, S127A, S247A, Q248A) era 1:203, 1:9, 1:180 y 1:89, respectivamente (Figura 8), que es 2,5, 57, 2,8 y 5,7 veces mayor que el título de neutralización del anticuerpo monoclonal A20 frente a la cápside de AAV-2 de tipo salvaje (1:509). Estos 4 mutantes están situados inmediatamente adyacentes entre sí en la superficie de la cápside de AAV-2 (Figura 6).

35 Tres (Q 126A, 127A S, Q248A) de las cuatro mutaciones que reducen la neutralización por A20 eran esencialmente normales con respecto a la síntesis de la cápside, el empaquetamiento de ADN, la unión a heparina y la transducción. La síntesis de la cápside y la transducción por parte de S247A mutante eran 4 a 5 veces menores que las de la cápside de AAV-2 de tipo salvaje. Por lo tanto, es posible tener un virus que sea normal en varias propiedades importantes pero que tenga una resistencia incrementada a la neutralización de anticuerpos.

40 Los viriones de rAAV Q126A, S127A, S247A, Q248A mutantes proporcionaron una resistencia inesperada de 2,5 a 57 veces a anticuerpos neutralizantes, manteniendo la eficacia de transducción en 2 líneas celulares humanas diferentes (HeLa y HepG2). Estos cuatro aminoácidos están inmediatamente adyacentes entre sí en la superficie de AAV-2 (Figura 6). Además de ello, se encuentran en una zona que había sido previamente implicada en la unión del anticuerpo A20, basado en la competencia de péptidos y experimentos de mutagénesis por inserción. En base a estas observaciones, es posible que el anticuerpo A20 bloquee una o más funciones necesarias para que AAV-2 transduzca células. En un estudio previo se ha demostrado que A20 no bloquea la unión de AAV-2 a heparina (Wobus et al (2000) *J. Virol.* 74:9281-93). Los resultados aquí presentados apoyan estos datos, ya que las mutaciones que afectan a la unión a heparina se encuentran lejos de las mutaciones que afectan a la unión de A20. Aunque A20 no bloquea la unión a heparina, impide que AAV-2 penetre en las células. Es posible que A20 no interfiere en la unión a un "receptor de acoplamiento" tal como heparina, pero en su lugar interfiere en la unión de AAV-2 a un "receptor de acoplamiento". Se han descrito dos proteínas que se requieren para la transducción de AAV-2 que pueden ser receptores de entrada: el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF^R) e integrina $\alpha_v\beta_5$. No se han identificado las zonas en AAV-2 que pueden unir estos receptores. Es posible que integrina $\alpha_v\beta_5$, bFGF^R, o ambos puedan unirse a la zona localizada descrita en esta memoria que tiene una alta concentración de mutantes que son significativamente defectuosos en la transducción de ($< 1\%$ de normal). Obsérvese que la zona que es más defectuosa para la transducción se encuentra adyacente a los mutantes que afectan la unión de A20.

Los mismos 45 mutantes (Q126A, S127A, D190A, G191S, S247A, Q248A, S315A, T317A, T318A, Q320A, R322A, S331A, D332A, R334A, D335A, T354A, S355A, S355T, A356R, D357A, N359A, N360A, N360H/S361A, S361A, S361A/R592K, E362A, D377A, K390A, E393A, E394A, K395A, F396A, K407A, E411A, T413A, E418A, K419A, E437A, Q438A, G449A, N450A, Q452A, N568A, K569A, V571A) con más de aproximadamente 10% de la actividad de transducción de la cápside de AAV-2 de tipo salvaje fueron rastreados para la neutralización por 3 antisueros neutralizantes humanos. Cuatro mutantes (R334A, N360H/S361A, E394A, N450A) fueron identificados en un rastreo inicial que eran más resistentes a la neutralización por los tres antisueros humanos, que era AAV2 con una cápside de tipo salvaje (véase la Tabla 2). El título de los antisueros cuando se someten a ensayo estos mutantes osciló entre 1,3 y 3,6 veces mayor que el título de neutralización de los tres antisueros humanos contra la cápside de AAV-2 de tipo salvaje (Tabla 3). Otros seis mutantes (N360A, E411A, T413A, G449A, N568A, V571A) tenían niveles incrementados de resistencia a la neutralización por 1 ó 2 de los 3 sueros sometidos a ensayo (Tabla 2).

La ubicación de las mutaciones que confieren resistencia a la neutralización de anticuerpos es informativa. En primer lugar, los mutantes que confieren resistencia a un anticuerpo monoclonal de ratón están situados inmediatamente adyacentes entre sí en la superficie de la cápside de AAV-2, mientras que los que confieren resistencia a los antisueros humanos se extienden a lo largo de un área mayor (Figura 7). Esto sugiere que los antisueros humanos son policlonales, lo cual no es sorprendente. En segundo lugar, los dos conjuntos de mutantes se encuentran en la meseta y el pico, pero no en el cilindro, incluso a pesar de que el cilindro sería fácilmente accesible para la unión del anticuerpo. En tercer lugar, las mutaciones que afectan a la neutralización están próximas a las zonas importantes para la función de AAV. Varios mutantes que afectan a la neutralización por antisueros humanos (en las posiciones 360, 394, 449, 450) se encuentran dentro de 2 aminoácidos del sitio de unión a heparina, que es probable que sea una diana funcionalmente importante para la unión por anticuerpos neutralizantes. Otros mutantes (en las posiciones 126, 127, 247, 248, 334, 568, 571) se encuentran en la periferia de la gran región de la meseta (zona muerta) que contiene la mayoría de los mutantes que tenían < 10% de actividad de transducción de tipo salvaje (Figura 4). Al igual que el sitio de unión a heparina, esta zona tiene presumiblemente una función importante y es probable que sea un objetivo funcionalmente importante para la unión por anticuerpos neutralizantes.

Cuando se combinan múltiples mutaciones que confieren resistencia a la neutralización de anticuerpos, la resistencia acumulativa a la neutralización de anticuerpos es a menudo multiplicativa, especialmente cuando las mutaciones individuales resultan en bajos niveles de resistencia. Por lo tanto, es probable que si los mutantes descritos aquí se combinan en una cápside, las cápsides podrían ser 5 veces a más de 1000 veces más resistentes a la neutralización en comparación con una cápside de tipo salvaje (Tabla 3). Diluciones de A20 mayores que 1:1000 neutralizan < 3% de AAV-2 de tipo salvaje. Así, un mutante con una combinación de los 4 aminoácidos individuales que proporcionan alguna resistencia a la neutralización por A20 podría ser casi completamente resistente a la neutralización, incluso por los antisueros A20 sin diluir.

Aunque mutantes con < 10% actividad de transducción de tipo salvaje también pueden ser resistentes a la neutralización de anticuerpos que no fueron sometidos a ensayo debido a que el ensayo de neutralización, tal como se describe aquí, funciona mejor cuando se utiliza para ensayar mutantes que tienen > ~ 10% de la actividad de transducción de tipo salvaje (Figura 3). Esto es debido a que es deseable poder detectar la neutralización en un amplio intervalo de concentraciones de anticuerpo, de manera que se puede calcular con precisión un título. Sin embargo, mutantes con < 10% la actividad de transducción de tipo salvaje todavía podrían ser sometidos a ensayo en cuanto a su capacidad para unir anticuerpos neutralizantes utilizando una modificación del ensayo descrito aquí en el que un mutante defectuoso en la transducción se utilizaría como un competidor. Por ejemplo, un virus lac Z de rAAV "informador" de tipo salvaje se podría mezclar con un AAV-2 "competidor" defectuoso en la transducción que carece de cualquier genoma ("virus vacío") o con un virus de AAV-2 que tiene empaquetado otro gen (p. ej., proteína fluorescente verde). Si un AAV-2 "competidor" protege a un AAV-2 informador de la neutralización, entonces la cápside "competidora" debería ser capaz de unirse a anticuerpos neutralizantes y, por lo tanto, no sería resistente a la neutralización. Si un AAV-2 "competidor" no protege a un AAV-2 informador de la neutralización, entonces la cápside "competidora" puede no ser capaz de unirse a un anticuerpo neutralizante y, por lo tanto, podría ser resistente a la neutralización, siempre y cuando se demostrara que produjera una cantidad normal de cápside. De esta manera, se podrían identificar incluso los mutantes que son defectuosos en la transducción, pero resistentes a la neutralización de anticuerpos. Con el fin de hacer a este tipo de mutantes útiles como vehículos para el suministro de genes en presencia de anticuerpos neutralizantes, sería deseable encontrar una sustitución de aminoácido distinto de alanina que restaurara la actividad normal de transducción, pero que todavía conservara una susceptibilidad disminuida a la neutralización.

66 mutantes más se produjeron y se sometieron a ensayo utilizando los protocolos arriba descritos. El empaquetamiento de ADN, la unión a heparina y las propiedades de transducción de los mutantes adicionales se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades de mutantes de la cápside de AAV-2 Adicionales.

ES 2 563 064 T3

<u>Mutante</u>	<u>Síntesis de la cápside²</u>	<u>Empaquetamiento de ADN</u>	<u>de Unión a heparina</u>	<u>a Transducción</u>
G128A	+	207	>95%	1,5
S130A	+	172	>95%	92
S130T	+	232	>95%	1164
N131Q	+	113	>95%	0,01
D132E	+	202	>95%	4
D132N	+	188	>95%	75
N133A	+	187	>95%	418
H134F	+	180	>95%	0,2
H134Q	+	340	>95%	17
H134T	+	102	>95%	0,4
N245A	+	145	>95%	1,8
G246A	+	353	>95%	0,6
R350K	+	52	>95%	16
D357E	+	222	>95%	427
D357N	+	157	>95%	28
D357Q	+	204	>95%	1,6
N360H	+	129	>95%	37
N360K	+	59	>95%	0,06
W365F	+	253	>95%	6
T366S	+	251	>95%	18
H372F	+	130	>95%	4,1
H372K	+	154	>95%	72
H372N	+	221	>95%	122
H372Q	+	248	>95%	73
G375A	+	55	>95%	2,4
D391A	+	140	>95%	1,21
D392E	+	158	>95%	15
D392I	+	411	>95%	0,5
D392N	+	236	>95%	0,2
D392V	+	247	>95%	0,001
E393D	+	218	>95%	80
E393K	+	123	>95%	0,02
E393Q	+	92	>95%	1,2
E394K	+	190	>95%	6,0
E411K	+	28	>95%	4,6
T413K	+	196	>95%	57
R448A	+	3255	< 1%	0,3
R448K	+	768	>95%	80

ES 2 563 064 T3

<u>Mutante</u>	<u>Síntesis de la cápside²</u>	<u>Empaquetamiento de ADN</u>	<u>de Unión a heparina</u>	<u>a Transducción</u>
G449K	+	270	>95%	3,1
N450K	+	281	>95%	0,7
R451A	+	2971	< 1%	0,07
R451K	+	10	>95%	133
N568K	+	488	>95%	16
V571K	+	614	>95%	40
R334A/ N360K	+	380	>95%	0,6
R334A/ G449A	+	87	>95%	91
R334A/ N450A	+	738	>95%	238
R334A/ N568A	+	150	>95%	147
N360K/ N450A	+	166	>95%	0,2
E411A/ T413A	+	548	>95%	74
G449A/ N450A	+	94	>95%	111
G449A/ N568A	+	102	>95%	105
G449K/ N568K	+	284	>95%	0,02
N568A/ V571A	+	139	>95%	59
R334A/ N360K/ E394A	+	38	>95%	0,8
R334A/ N360K/ E394A ins ² ¹	+	21	>95%	0,001
R334A/ N360K/ G449K	+	320	>95%	0,01
R334A/ G449A/ N568A	+	746	>95%	424
R334A/ G449K/ N568K	+	50	>95%	2,0
R347C/ G449A/ N450A	+	102	50%	0,02
R334A/ N360K/ N450A	+	26	>95%	0,3
R334A/ N360K/ E394A/ N450A	+	445	>95%	0,9
R334A/ N360K/ G449K/ N568K	+	26	>95%	0,001
E411A/ T413A/ G449A/ N450A	+	372	>95%	74

Mutante	Síntesis de la cápside ²	Empaquetamiento de ADN	Unión a heparina	Transducción
E411A/T413A/ G449A/ N450A/ N568A/ V571A	+	437	>95%	14
R334A/ N360K/ E394A/ E411A/ T413A/G449A	+	152	>95%	0,006
N450A/ N568A/ V571A				

¹ ins2 es una inserción de la secuencia HKDDEAKFFPQ después del aminoácido 399 de VP2.

² + = dentro del décuplo de tipo salvaje.

5 Tal como se muestra en la Tabla 4, se obtuvieron varios mutantes con una transducción incrementada en comparación con cápsides de tipo salvaje. Por ejemplo, los mutantes S130T, N133A, D357E, H372N, R451K, G449A/N450A, R334A/N450A, R334A/G449A/N568A, R334A/N568A, G449A/N568A exhibían una transducción incrementada. El mutante S130T era el mejor transductor, con aproximadamente 11 veces más frente a los niveles de tipo salvaje. Esto era notable, debido a que la única diferencia entre S (serina) y T (treonina) es un grupo CH₂.
10 También como se ve en la Tabla 4, los mutantes de combinación generalmente transducían al mismo nivel que el del mutante individual con el nivel más bajo de transducción.

Determinados aminoácidos en la cápside solapan el sitio de unión a heparina. Esta región se denomina "zona muerta" o "DZ" en esta memoria. Las mutaciones en la zona muerta pueden resultar en cápsides que todavía unen a uno de los receptores de AAV-2 (p. ej., heparina), pero no transducen células. Las sustituciones de aminoácidos se realizaron en los aminoácidos de la zona muerta y estas sustituciones se compararon con la sustitución del mismo aminoácido con alanina. Los resultados se muestran en la Tabla 5.
15

Tabla 5. Efecto de sustituciones no alanina en la zona muerta.

Posición en la zona muerta	Sustitución	Transducción (% de tipo salvaje)
G128	A	1,5
	D	0,02
N131	A	0,005
	Q	0,01
D132	A	0,04
	E	4
	N	75
H134	A	2
	F	0,2
	Q	17
	T	0,4
D357	A	4
	E	427
	N	128
	Q	1,6
H372	A	0,008 ^a
	F	4

Posición en la zona muerta	Sustitución	Transducción (% de tipo salvaje)
	K	72
	N	122
	Q	73
G375	A	2,4
	P	0,01
D392	A	0,01
	E	15
	I	0,5
	N	0,2
	V	0,001
E393	A	2
	D	80
	K	0,2
	Q	1,2

^aDatos de Opie, S.R., et al., J. Virology 77,6995-7006, (2003)

5 Tal como se muestra arriba, cuanto más conservadora era la sustitución más funcional era el mutante de la zona muerta. Por ejemplo Q era un buen sustituto de H. D era un buen sustituto de E. E o N eran buenos sustitutos de D. No fue una sorpresa que la glicina, que tiene varias propiedades únicas, fuese difícil de sustituir.

10 Se compararon las propiedades de unión a heparina de G375P mutante (transducción 0,01% de tipo salvaje) y G375A (transducción de 2,4% de tipo salvaje). G375P mutante unía heparina en un 50% y G375A en un 95%. La posición 375 podría ser necesaria tanto para la zona muerta como para la función de sitio de unión a heparina. La sustitución de glicina por alanina en el mutante de G375A resulta en un fenotipo que es el mismo que otros mutantes de la zona muerta - une heparina normalmente, pero exhibe <10% de la transducción normal. Sin embargo, la sustitución de glicina por prolina en el mutante de G375P resulta en un fenotipo más similar a un mutante defectuoso en la unión a heparina (tal como R347C/G449A/N450A). Sin estar ligados por una teoría particular, las diferencias en la estructura entre glicina, alanina y prolina implican que la cadena lateral de glicina puede ser necesaria para la función de la zona muerta, ya que la sustitución con alanina reduce la transducción. El grupo amina puede ser necesario para la unión a heparina, ya que la sustitución con prolina, que no tiene un grupo amina heparina, afecta a la unión a heparina. Alternativamente, la sustitución de prolina puede afectar a la estructura del sitio de unión de heparina desde una distancia. Existían tres mutantes (R448A, R451A, R347C/G449A/N450A) que no se unían a heparina, pero éstos estaban en posiciones conocidas previamente que se requieren para la unión a heparina (347, 448, 451).

20 Se determinó la actividad de neutralización de varios de estos mutantes por el anticuerpo monoclonal murino (A20) y también por una IgG humana purificada, agrupada. Se utilizó la preparación de IgG humana agrupada, ya que está bien caracterizada, está comercialmente disponible, está altamente purificada y se cree que representa casi todas las especificidades antigénicas que se encontrarían en los Estados Unidos, que era la fuente de sangre utilizada para purificar la IgG. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

25 Tabla 6. Neutralización por IgG humana purificada, agrupada y el anticuerpo monoclonal murino A20

Mutante	Múltiplo de disminución en título neutralizante ¹	Múltiplo de disminución en título A20
WT	1,0	
S127A	2,2 *	
G128A	4,1 *	
S130A	1,4	

ES 2 563 064 T3

<u>Mutante</u>	<u>Múltiplo de disminución en título neutralizante¹</u>	<u>Múltiplo de disminución en título A20</u>
S130T	1,8	
D132N	3,8 *	
N133A	0,9	
H134Q	1,5	
R334A	2,2 *	
T354A	2,9 *	
D357E	1,7	
D357N	1,8	
N360H/S361A	2,1 *	
W365A	10,4 *	0,5
H372K	1,1	
G375P	1,9	
D377A	1,9	
K390A	2,3 *	
E394A	1,5	
E394K	2,3 *	0,9
K395A	4,9 *	0,9
F396A	1,6	
K407A	3,3*	1,6
E411A		2,7*
T413K	2,6*	
E418A	1,5	
E437A	2,0*	0,8*
Q438A	1,3	
R448K	1,0	
G449A	2,5 *	
N450A	1,6	
Q452A	1,3	
N568A	2,0 *	
K569A	4,0 *	1,7
V571A	3,9 *	1,4
V571K	1,0	217*
R334A/ G449A	3,9 *	
R334A/ N568A	2,4 *	
G449A/ N568A	1,7	
N568A/ V571A	2,5 *	
R334A/ G449A/N568A	3,0 *	
E411A/ T413A/G449A/ N450A	1,0	
E411A/ T413A/ G449A/ N450A/N568A/V571A	1,3	

^{1*} = estadísticamente significativo, $p < 0,05$. Los títulos se determinaron haciendo diluciones dobles de IgG. Los datos se representaron utilizando el software Sigma Plot y el recíproco de la dilución a la que se producía el 50% de la neutralización se define como el título.

5 Como se muestra en la tabla, 21 mutantes (S127A, G128A, D132N, R334A, T354A, N360H/S361A, W365A, K390A, E394K, K395A, K407A, T413K, E437A, G449A, N568A, K569A, V571A, R334A/G449A, R334A/N568A, N568A/V571A, R334A/G449A/N568A) eran 2-10 veces más resistentes a la neutralización por un gran grupo de IgG humana en comparación con la cápside de AAV-2 nativo. Como era de esperar, algunos de los mutantes que eran resistentes a la neutralización por IgG humana agrupada también eran resistentes a la neutralización por sueros humanos individuales (p. ej., R334A, N360H/S361A, G449A, N568A, V571A). Sin estar ligados por una teoría particular, los epítomos que contienen esos aminoácidos pueden unir anticuerpos con alta afinidad o a alta frecuencia. Sin embargo, algunos mutantes resistentes a la neutralización por IgG humana agrupada no se identificaron como resistentes a sueros individuales, posiblemente debido a que epítomos que contienen los aminoácidos se encuentran más rara vez en la población humana. Además, algunos mutantes eran resistentes a la neutralización por sueros individuales, pero no a IgG humana agrupada (p. ej., E394A, N450A). En estos casos es posible que los anticuerpos que se unen a epítomos que contienen estos aminoácidos sean de baja afinidad o baja abundancia, de modo que mutaciones que afectan a su unión no son detectables en el contexto de una gran mezcla compleja de IgG.

20 Como puede verse en la Figura 7, estas mutaciones se encuentran dispersadas en diversos lugares a lo largo de la superficie de AAV-2. El tamaño de la zona que cubren es 2-3 veces el tamaño de un epítomo medio, lo que implica que puede haber por al menos 2-3 epítomos implicados en la neutralización por la suma total de todas las IgGs humanas.

25 Combinaciones de mutantes sencillos de resistencia a la neutralización resultaron a veces en un grado de resistencia a la neutralización ligeramente más alto en comparación con los mutantes individuales que comprendían un mutante múltiple. Sin embargo, el grado del efecto claramente no es multiplicativo para estos mutantes en estos niveles de resistencia a la neutralización.

30 También se identificaron dos mutantes más, resistentes a la neutralización por el anticuerpo monoclonal murino A20: E411A que es 2,7 veces resistente y V571K que es 217 veces resistente a la neutralización por A20. El mutante V571K proporciona evidencia de un concepto denominado por los autores de la presente invención como "escaneo de lisina". En lugar de separar parte de un sitio de unión del anticuerpo cambiando un aminoácido con una cadena lateral grande por uno con una cadena lateral más pequeña tal como alanina, el concepto de escaneo de lisina es sustituir un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña (p. ej., V571) por lisina que tiene una cadena lateral grande. En lugar de la separación de parte de un sitio de unión del anticuerpo como podría ser el caso de sustituciones de alanina, el objetivo del escaneo de lisina es insertar aminoácidos más grandes que podrían interferir estéricamente con la unión de anticuerpos. Se eligió lisina, ya que se encuentra comúnmente en la superficie de AAV-2 y, por lo tanto, es probable que sea una sustitución aceptada. Sin embargo, otros aminoácidos grandes tales como arginina, triptófano, fenilalanina, tirosina o glutamina también pueden resultar en un efecto similar sin comprometer la actividad biológica. Obsérvese que mientras que V571A no es resistente a la neutralización por el anticuerpo murino A20, V571K es 217 veces más resistente a la neutralización por A20 que lo es la cápside de AAV-2 de V571 nativo.

40 V571K se encuentra en la meseta, inmediatamente adyacente a los otros cuatro mutantes identificados como resistentes a la neutralización por A20 (Q126A, S127A, S247A, Q248A; Tabla 3). Sin embargo E411A se encuentra en la espiga, aunque lo suficientemente cerca de Q126A, S127A, S247A, Q248A y V571K como para estar dentro del mismo epítomo. La inclusión de E411 en el epítomo de A20 evidencia que A20 puede unirse tanto a la meseta como a la espiga, es decir, a través del cañón. El modelado molecular sugiere que uno de los receptores de AAV-2, el receptor de FGF básico (PDB ID: 1FQ9) podría encajar muy bien en el cañón de AAV-2 (de una forma y ubicación notablemente similares a la forma en que se piensa que el receptor de transferrina se une a parvovirus canino). Si el receptor de FGF básico se une al cañón de AAV-2, entonces la unión de A20 a través del cañón bloquearía la unión del receptor de FGF básico y explicaría la observación de que A20 neutraliza AAV-2 bloqueando la entrada, una etapa en la transducción en la que es probable que medie el receptor de FGF básico.

50 La zona de meseta y pico puede unir anticuerpos que neutralizan otros AAVs mediante la prevención de la unión al receptor. Por ejemplo, AAV-5 ha demostrado requerir el receptor de PDGF para la entrada en células (Di Pasquale et al, *Nature Medicine* (2003) 9:1306-1312). Aunque la estructura del receptor de PDGF no se conoce, es homóloga en la secuencia de aminoácidos al receptor de FGF básico. Por ejemplo, ambas se componen de dominios de secuencia a Ig repetitivos similares y, por lo tanto, sería de esperar que tuvieran estructuras tridimensionales similares. Por lo tanto, es posible que el receptor de PDGF se pueda unir al cañón de AAV-5.

- 5 V571A, pero no V571K, es resistente a la neutralización por IgG humana agrupada. A la inversa, V571K, pero no V571A, es resistente a la neutralización por A20 monoclonal murino. Es posible que anticuerpos en la agrupación de la IgG humana se unan directamente a V571. La sustitución de la cadena lateral de valina para la cadena lateral de alanina más pequeña puede resultar en una menor unión por parte de IgG humana. La cadena lateral de lisina todavía puede proporcionar suficientes contactos hidrofóbicos como para permitir que tenga lugar la unión, pero no sea tan grande como para evitar la unión. A20 no puede unirse directamente a V571 (lo cual explica la ausencia de un efecto del mutante V571A sobre la unión o la neutralización por A20). Sin embargo, A20 se une claramente en las proximidades de V571. Es posible que V571K interfiera indirectamente en la unión con A20, por ejemplo mediante interferencia estérica.
- 10 También se hizo un ELISA de IgG. Hay muchos mecanismos de neutralización potenciales, especialmente *in vivo*. La unión de una IgG a AAV en una región que no se requiere para la función de AAV todavía podría conducir a la reducción de la capacidad de AAV de suministrar genes. Por ejemplo, la función primaria de macrófagos es unir a organismos extraños que están ligados a los anticuerpos. Cuando un organismo ligado al anticuerpo se une a un macrófago (a través de receptores de Fc), el organismo extraño es envuelto y destruido. Otra vía potencial que los anticuerpos podrían utilizar con el fin de neutralizar AAV es mediante reticulación. Los anticuerpos son bivalentes y el AAV probablemente tiene 60 sitios de unión a anticuerpos por epítipo (y posiblemente múltiples epítopos). Por lo tanto, como está bien documentado en la bibliografía científica, a determinadas concentraciones de anticuerpos y virus se puede formar una red reticulada de AAVs y anticuerpos. Complejos inmunes de este tipo pueden llegar a ser tan grandes que precipitan o se alojan en la vasculatura antes de alcanzar a un órgano diana. Por esta razón, los anticuerpos que se unen a AAV *in vivo* en zonas de AAV que no son funcionalmente importantes, pueden resultar en la transducción reducida dado que los anticuerpos se unen a zonas funcionalmente importantes. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. ELISA de IgG

<u>Mutante</u>	<u>Múltiplo de disminución en la unión de IgG humana</u>	<u>Múltiplo de disminución en la unión de A20 murino</u>
Tipo salvaje	1	1
S130A	1	1
S130T	1	1
D132N	1	1
H134Q	1	1
G246A	1	1
R334A	1	1
D357E	1	1
N360H	1	1
H372K	1	1
H372Q	1	1
E393D	1	1
T413K	1	1
G449A	1	1
N568K	1	1
N568A	1	1
V571K	10	10
E411A,T413A	1	1
N568A, N571A	1	1
E411A, T413A, G449A, N450A	1	1
R334A, G449A, N568A	1	1
R334A, G449A	1	1

<u>Mutante</u>	<u>Múltiplo de disminución en la unión de IgG humana</u>	<u>Múltiplo de disminución en la unión de A20 murino</u>
R334A, N568A	1	1
G449A, N568A	1	1

5 Tal como se muestra en la Tabla 7, se identificó un mutante (V571K) que unía tanto A20 como una agrupación de IgG humanas 10 veces peor que el AAV-2 nativo. En todo el ELISA de A20 la unión de V571K mutante se redujo 10 veces. En todo el ELISA de IgG humana la unión de V571K mutante se redujo 10 veces. Cuando se utilizó un formato de ELISA de sándwich de A20/IgG, la unión de V571K mutante se redujo 100 veces. La posición (571) está inmediatamente adyacente a las posiciones 126, 127, 247 y 248 en la superficie de la cápside de AAV-2. Las posiciones 126, 127, 247 y 248 fueron identificadas como importantes para la neutralización por anticuerpo monoclonal A20 de ratón. Por lo tanto, esta región puede ser antigénica tanto en ratones como en seres humanos.

10 Para resumir, se identificaron varias mutaciones a la superficie externa de la cápside de AAV-2 que reducían la neutralización por anticuerpos, pero que tenían efectos mínimos sobre propiedades biológicas. En concreto, se realizaron 127 mutaciones en 72 posiciones (55% de la superficie específica) que se consideraron que fuesen lo más probablemente accesibles para la unión del anticuerpo en base al acoplamiento manual de las estructuras de IgG y AAV-2. Se hicieron sustituciones sencillas de alanina (57), sustituciones no sencillas de alanina (41), mutaciones múltiples (27) e inserciones (2). Todos los mutantes produjeron proteínas de la cápside y ADN empaquetado a niveles dentro de 10 veces los de tipo salvaje. Todos los mutantes ligaban heparina, así como tipo salvaje, a excepción de seis que estaban cerca o dentro del sitio de unión a heparina. 42 de 98 mutantes sencillos transducían al menos tan bien como los de tipo salvaje. Varios mutantes habían aumentado la actividad de transducción. Uno, un mutante de S a T, tenía una actividad de transducción 11 veces mayor que el tipo salvaje. Mutantes de combinación (arriba o abajo) transducían habitualmente al mismo nivel que los mutantes sencillos con el nivel más bajo de transducción.

20 13 de 15 mutantes de sustitución de alanina sencillos con < 10% de actividad de transducción eran adyacentes entre sí en una zona (10% de la superficie) que solapa el sitio de unión a heparina. Aunque estos mutantes de "zona muerta (DZ)" tenían de 0,001%-10% de la actividad normal de transducción, todos ellos se unían a heparina tan eficientemente como los de tipo salvaje. La transducción por mutantes de DZ podría aumentarse, y en tres casos restablecerse a niveles de tipo salvaje, al hacer sustituciones conservadoras.

25 Cinco mutantes tenían una unión reducida a un anticuerpo monoclonal de ratón (A20) en un ELISA y eran 2,5-217 veces más resistentes a la neutralización por A20 in vitro. Estos 5 mutantes eran adyacentes entre sí y con la DZ. Un total de 21 mutantes sencillos eran 2-10 veces más resistentes a la neutralización por tres sueros humanos o por una gran agrupación de IgG humana purificada (IVIG, Panglobulina) en comparación con los de tipo salvaje. Diferentes conjuntos de mutaciones conferían resistencia a diferentes sueros humanos. La ubicación de estas mutaciones estaba muy extendida. El tamaño de la zona que cubrían sugirió que los sueros humanos neutralizan AAV-2 mediante la unión de al menos dos epítopos. Tres mutantes eran resistentes a todos los sueros sometidos a ensayo, pero combinaciones de estos tres mutantes no aumentaban la resistencia a la neutralización por IVIG. Se identificó un mutante (V a K) que ligaba IVIG 10 veces peor que los de tipo salvaje en un ELISA todo-IVIG. Sin embargo, este mutante no era resistente a la neutralización por IVIG.

30 En resumen, las mutaciones en la "zona muerta" afectan a la transducción, pero no a la unión a heparina. Las mutaciones en torno a la DZ pueden aumentar la transducción o disminuir la unión de anticuerpos. La DZ es de carácter muy ácido (6 aminoácidos de carácter ácido, 0 aminoácidos de carácter básico). Sin estar ligados por una teoría particular, puede ser un sitio de unión para una proteína de carácter básico tal como bFGF o el receptor de bFGF. Dado que la zona muerta es adyacente al sitio de unión a heparina en AAV-2, puede ser que si una proteína se une a la zona muerta, entonces esa proteína también puede unir heparina. Tanto bFGF como el receptor de bFGF unen heparina.

EJEMPLO 2

EXPRESIÓN DE FACTOR IX EN RATONES UTILIZANDO AAV-hf.IX MUTANTE

45 rAAV-F.IX se prepara utilizando el vector hF rAAV-2. IX y los métodos descritos anteriormente. Lisados de congelación-descongelación de las células transfectadas se precipitan, los viriones de rAAV se purifican mediante dos ciclos de centrifugación isopícnica; y las fracciones que contienen viriones de rAAV se reúnen, se dializan y se concentran. Los viriones concentrados se formulan, se filtran en condiciones estériles (0,22 µM) y se envasan asépticamente en viales de vidrio. Los genomas de vectores se cuantifican por el método de "Real Time Quantitative

Polymerase Chain Reaction" ("Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativo en Tiempo Real") (Real Time Quantitative PCR. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. y Williams P.M. 1996. Genome Research 6:986-994. Cold Spring Harbor Laboratory Press).

5 A ratones hembra de 4-6 semanas de edad se les inyectan viriones de rAAV-hF.IX mutantes. Los ratones son anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (70 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg), y se practica una incisión longitudinal de 1 cm en la extremidad inferior. Viriones de AAV-hF.IX mutante recombinante (2×10^{11} genomas de vector viral/kg en solución salina tamponada con HEPES, pH 7,8) se inyectan en el músculo tibial anterior (25 μ L) y el músculo cuádriceps (50 μ L) de cada una de las patas utilizando una jeringa Hamilton. Las incisiones se cierran con una sutura 4-0 Vicryl. Las muestras de sangre se recogen a intervalos de siete días del plexo retro-orbital en tubos capilares de microhematocrito y se somete a ensayo plasma en cuanto a hF.IX mediante ELISA. El antígeno de F.IX humano en plasma de ratón se evalúa mediante ELISA tal como se describe por Walter et al. (*Proc Natl Acad Sci USA* (1996) 3:3056-3061). El ELISA no reacciona de forma cruzada con F.IX de ratón. Todas las muestras se evalúan por duplicado. Los extractos de proteína obtenidos de músculo de ratón inyectado se preparan mediante maceración de músculo en PBS que contiene leupeptina (0,5 mg/mL) seguido de tratamiento por ultrasonidos. Los desechos celulares se separan mediante microcentrifugación y se someten a ensayo diluciones 1:10 de los extractos de proteínas para hF.IX en el ELISA. Concentraciones en plasma circulantes de hF.IX se miden mediante ELISA en varios instantes post-inyección IM (p. ej., cero, tres, siete y once semanas).

EJEMPLO 3

TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA B EN PERROS CON AAV-cF.IX MUTANTE

20 Una colonia de perros que tienen *hemofilia* B grave que comprende machos que son hemizigotos y hembras que son homocigotas para una mutación puntual en el dominio catalítico del gen canino factor IX (cf.IX) se utiliza para testar la eficacia de cF.IX suministrado por viriones de rAAV mutantes (rAAV-cF.IX). Los perros hemofílicos graves carecen cF.IX en plasma, lo que resulta en un aumento en el tiempo de coagulación de sangre entera (WBCT) a > 60 minutos (los perros normales tienen un WBCT entre 6-8 minutos), y un aumento en el tiempo de tromboplastina parcial (aPTT) de 50-80 segundos (los perros normales tienen un aPTT entre 13-18 segundos). Estos perros experimentan hemorragias espontáneas recurrentes. Típicamente, episodios de sangrado significativo son gestionados con éxito mediante la infusión intravenosa única de 10 mL/kg de plasma canino normal; ocasionalmente, se requieren infusiones repetidas para controlar el sangrado.

30 Bajo anestesia general, a los perros con hemofilia B se les inyectan por vía intramuscular viriones de rAAV-cF.IX en una dosis de 1×10^{12} vg/kg. A los animales no se les da plasma canino normal durante el proceso.

35 El tiempo de coagulación de sangre entera se evalúa para cf.IX en plasma. Se mide el tiempo de tromboplastina parcial activada. También se realiza un rastreo del inhibidor de la coagulación. El plasma obtenido de un perro hemofílico tratado y de un perro normal se mezcla en volúmenes iguales y se incuba durante 2 horas a 37°C. El rastreo del inhibidor se puntúa como positivo si el tiempo de coagulación de aPTT es 3 segundos más largo que el de los controles (plasma de perro normal incubado con tampón de imidazol y pre-tratamiento de plasma de perro hemofílico se incubaron con plasma de perro normal). Se evalúa el título de anticuerpos neutralizantes contra el vector AAV.

EJEMPLO 4

TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA B EN SERES HUMANOS CON AAV-hF.IX MUTANTE

A. Suministro Muscular

40 El día 0 del protocolo, a los pacientes se les infunde concentrado de hF.IX para elevar los niveles de factor hasta ~100% y, bajo guía ultrasónica, viriones de rAAV-hF.IX mutantes se inyectan directamente en los 10-12 sitios en el vasto lateral de uno o los dos muslos anteriores. El volumen inyectado en cada sitio es 250-500 μ L, y los sitios están separados en al menos 2 cm. La anestesia local a la piel es proporcionada por cloruro de etilo o una mezcla eutéctica de anestésicos locales. Para facilitar la subsiguiente biopsia muscular, se tatúa la piel que cubre varios sitios de inyección y las coordenadas de inyección se registran por ultrasonidos. Los pacientes son observados en el hospital durante 24 h después de la inyección; se observarán las precauciones de aislamiento rutinarias durante este período para minimizar cualquier riesgo de transmisión horizontal de viriones. Los pacientes son dados de alta y son vistos todos los días en consultas externas diarias durante tres días después del alta, y luego semanalmente en el centro de hemofilia en casa durante las próximas ocho semanas, a continuación, dos veces al mes hasta cinco meses, una vez al mes durante el resto del año, y luego anualmente por seguimiento. Los niveles circulantes en plasma de hF.IX se cuantifican utilizando ELISA tal como se ha descrito anteriormente.

B. Suministro Hepático

Utilizando la técnica de Seldinger estándar, la arteria femoral común es canulada con una vaina introductora angiográfica. El paciente es entonces heparinizado mediante inyección IV de 100 U/kg de heparina. Un catéter cola de cochino se hace avanzar entonces hacia la aorta y se realiza un aortograma abdominal. Después del trazado de la anatomía arterial celíaca y hepática, se selecciona el HA apropiado utilizando un catéter de angiografía selectiva estándar (Simmons, Sos-Omni, Cobra o catéteres similares). Antes de la inserción en el paciente, todos los catéteres se lavan con solución salina normal. Se realiza a continuación un arteriograma selectivo, utilizando un material de contraste no iónico (Omnipaque o Visipaque). El catéter se retira sobre un alambre de 0,035 (Bentsen, Glide en ángulo, o alambre similar). Una vaina de Guía 6F (o catéter de guía) se hace avanzar sobre el alambre en el HA común. El alambre se intercambia luego por un alambre de 0,018 (FlexT, Microvena Nitenol, o alambre similar) y un globo 6X2 Savvy se hace avanzar sobre el alambre en el HA adecuado, distal a la arteria gastroduodenal. Se retira entonces el alambre, se confirma la posición de la punta del catéter mediante inyección manual de contraste en el catéter de globo, y el lumen se lava con 15 ml de solución salina normal heparinizada (NS) para esclarecer totalmente el contraste. Antes de la infusión del AAV-hFIX, se infla el globo a 2 atm para ocluir el lumen de flujo del HA. AAV-hFIX, a una dosis de 8×10^{10} - 2×10^{12} , se lleva a un volumen final de aproximadamente menos de o igual a 40 ml (dependiendo de la dosis y del peso del paciente) y luego se infunde a lo largo de 10-12 minutos utilizando una bomba de infusión volumétrica automática. Se infunden entonces tres mililitros (ml) de solución salina normal (NS) (a la misma velocidad que el AAV-hFIX), para esclarecer el volumen vacío del catéter. El globo permanece inflado durante 2 minutos, momento en el que el globo se desinfla y se retira el catéter. Se realiza a continuación una arteriografía diagnóstica del sitio de punción femoral, en la proyección oblicua anterior ipsilateral. El sitio de punción se cierra mediante métodos estándares p. ej., utilizando un dispositivo de cierre percutáneo utilizando un 6 F Closer (Perclose Inc., Menlo Park, CA) o un 6 F Angioseal, o mediante compresión manual aplicada durante 15 a 30 minutos en el sitio de la retirada del catéter.

EJEMPLO 525 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO AAV CAPRINOA. Cultivo Celular y Aislamiento del Virus

Preparaciones de adenovirus ovinos con evidencia de contaminación por parvovirus fueron aisladas de ileon caprino como sigue. El tejido se homogeneizó en medio MEM de Eagle que contenía sales de Earles (pH 7,2) y gentomicina. El homogeneizado se clarificó mediante centrifugación a baja velocidad ($1.500 \times g$) durante 20 minutos y se esterilizó mediante filtro a través de un dispositivo de $0,45 \mu\text{m}$. El sobrenadante ($500 \mu\text{l}$) se inoculó en un matraz de 25 cm^2 que contenía cultivos primarios de células de riñón de cordero fetal en el pasaje 3 y se incubaron con suero bovino fetal (USA) e hidrolizado de lactoalbúmina (USA) a 37°C en húmedo, incubadora con 5% de CO_2 durante una semana. Las células se tripsinizaron, se escindieron y se incubaron de nuevo tal como se ha descrito anteriormente y, finalmente, se sometió a ensayo el efecto citopático (CPE) adenoviral típico. Los matraces que muestran CPE se congelaron a -70°C , se descongelan y se estratificaron sobre otros tipos de células. Estos matraces se incubaron posteriormente y se sometieron a ensayo en cuanto al CPE.

Otros tipos de células utilizadas incluían células turbinadas fetales ovinas no inmortalizadas (pasaje 8) derivadas de tejido fetal ovino y células de riñón bovinas Maden Darby, mantenidas mediante el pasaje a largo plazo (utilizadas en un pasaje 160). Tripsina porcina (USA) se utilizó en todos los procesos de cultivo de tejido y no se utilizaron cultivos o productos de células humanas.

B. Aislamiento de ADN viral e Identificación y Comparación de la Secuencia de AAV

Cuatro preparaciones de cultivos de células diferentes y pasajes fueron procesadas de forma individual para la extracción de ADN. Sobrenadante que contiene el virus se trató con proteinasa K ($200 \mu\text{g}$) en tampón de digestión (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM (pH 8,0) y SDS al 0,5%) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Después de la extracción con fenol-cloroformo y de la precipitación con etanol el ADN viral se resuspendió en TE.

El contenido en ADN de cada una de las preparaciones se determinó mediante la cuantificación de ADN PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, OR) y las preparaciones se diluyeron a $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ para estandarizar la concentración de ADN para posteriores ensayos de PCR.

Cebadores de oligonucleótido

Cebadores de oligonucleótidos se seleccionaron sobre la base de alineamientos de secuencias a partir de los segmentos que estaban altamente conservados entre AAVs conocidos.

5 El cebador directo 1 (GTGCCCTTCTACGGCTGCGTCAACTGGACCAATGAGAACTTTCC) (SEQ ID NO: 23) era complementario al dominio helicasa y el cebador inverso 2 (GGAATCGCAATGCCAATTTCTGAGGCATTAC) (SEQ ID NO: 24) era complementario al dominio de unión de ADN. El tamaño esperado de los fragmentos de PCR era de 1,5 kb.

Amplificaciones por PCR

10 Todas las reacciones se realizaron en 50 µl en un termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf automatizado (PerkinElmer, Boston, MA). Cada una de las mezclas de reacción contenía 200 ng de ADN de molde, 1 µM de cada uno de los cebadores de oligonucleótidos, Mn(Oac)₂ 1 mM, 200 µM de cada uno de los desoxinucleósido trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 1,0 unidades de rTth polimerasa, XL (Applied Biosystems, Foster City, CA) en Tampón II 1 x XL. Ampliwax PCR gem 100 se utilizó para facilitar el arranque en caliente (Applied Biosystems, Foster City, CA).

15 Las condiciones de la ciclación eran las siguientes: 2 min de desnaturalización a 94°C, seguido de 35 ciclos de 15 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de hibridación a 45°C y 2 min de elongación a 72°C.

Los productos de la PCR (10 µl) se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1%NuSieve (FMC BioProducts, Rockland, MN), se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron mediante luz UV. Se utilizaron marcadores moleculares de ADN en cada uno de los geles para facilitar la determinación de los tamaños de los productos de reacción.

20 Para controlar la especificidad del ensayo, también se realizó una PCR con 100 ng de ADN de un plásmido que contenía secuencias de AAV2.

Secuenciación de ADN

Los productos de PCR se purificaron en geles de agarosa al 1% de bajo punto de fusión (FMC Bioproducts, Rockland, ME), y las secuencias se determinaron utilizando cebadores diseñados a partir de secuencias de AAV-5.

25 Los datos de la secuencia se analizaron con el paquete de software NTI vector suite (InforMax, Frederick, MD).

30 Preparaciones de virus de diferentes cultivos de células y pasajes fueron procesados de forma individual para la extracción de ADN y el análisis por PCR. La amplificación por PCR utilizando cebadores directo 1 e inverso 2 revelaron la presencia de secuencias de AAV. El ORF de VP1 de AAV caprino, que corresponde a los nucleótidos 2.207 a 4.381 del genoma de AAV-5, tiene un 93% de identidad de nucleótidos (2.104/2.266, Huecos 6/2.266) con AAV-5 de primates (véanse las Figuras 12A-12B) aislados de seres humanos (*J. Virol* 1999; 73:1309-1319). La comparación de proteínas mostró un 94% de identidad (682/726) y un 96% de similitud (698/726) entre las proteínas VP1 de AAV-5 de primates y AAV caprino (véase, la Figura 13). La mayoría, si no todas las mutaciones, parecían estar en la superficie (véase la Figura 15). La Figura 16 muestra la ubicación predicha de los aminoácidos de superficie que difieren entre AAV-5 y AAV caprino, basado en la estructura de la superficie de la cápside de AAV-2. 35 Los 3 triángulos en negro representan inserciones en AAV caprino, en relación con AAV-2, que es probable que se encuentren en la superficie.

40 Sin estar ligado por una teoría particular, las mutaciones en superficie probablemente fueron impulsadas por presión selectiva debido al sistema inmune humoral y/o adaptación a receptores de rumiantes. La falta de cambios en zonas expuestas no superficiales puede implicar una falta de presión de la respuesta inmune celular. Estas regiones mutadas en el virus caprino pueden mejorar la resistencia a anticuerpos anti-AAV-5 humanos preexistentes.

45 La secuencia de AAV caprino se comparó con otros serotipos de AAV y estos serotipos se compararon entre sí con el fin de analizar las diferencias en la región no conservada. En particular, las Figuras 14A-14H muestran una comparación de la secuencia de aminoácidos de VP 1 de AAV-1, AAV-2, AAV-3B, AAV-4, AAV-6, AAV-8, AAV-5 de primates y AAV caprino. Los aminoácidos conservados en las secuencias se indican mediante * y se muestra la accesibilidad de las diversas posiciones de aminoácidos en base a la estructura cristalina. B indica que el aminoácido está enterrado entre la superficie interior y exterior. I indica que el aminoácido se encuentra en la superficie interior y O indica que el aminoácido se encuentra en la superficie exterior.

La región no conservada entre AAV-5 y AAV caprino incluye 43 mutaciones. 17 de estas 43 son mutaciones no conservada entre AAV-2 y AAV-8. Sólo una de estas mutaciones se originó en el mismo aminoácido en el AAV caprino y AAV-8. La región no conservada entre AAV-5 y AAV caprino incluye 348 aminoácidos. Esta región no conservada se comprime a 157 aminoácidos cuando se analiza la región que contiene las 17 mutaciones conjuntas.

5 Las Tablas 8-11 muestran los resultados de las comparaciones.

Tabla 8

Mutaciones en los residuos en superficie (O) de AAV-2 frente a AAV-8 y AAV-5 frente a AAV Caprino

Región	Mutaciones de AAV-2 frente a AAV-8 (x)/residuos en superficie (O)	Mutaciones de AAV-5 frente a AAV Caprino (*)/residuos en superficie (O)
100-200	04/19 (+2 inserciones)	00/19
200-300	01/20	01/20
300-400	16/31	03/30
400-500	20/46 (+1 inserción)	11/43 (+1 inserción)
500-600	13/27	04/30
700-750	05/24	01/24
100-750	59/167 (35%)	20/167 (12%)
	65% de identidad	88% de identidad

Tabla 9
Mutaciones en residuos en superficie (O) de AAV-2 frente a todos los AAVs

Región	AAV2 frente a AAV1 mut/superficie (1 ins)	AAV2 frente a AAV3a mut/superficie 00/19	AAV2 frente a AAV4 mut/superficie (3 del)	AAV2 frente a AAV5 mut/superficie (1 ins)	AAV2 frente a AAV6 mut/superficie 01/19	AAV2 frente a AAV7 mut/superficie (1 ins)	AAV2 frente a AAV8 mut/superficie (2 ins)	AAV2 frente a AAV Caprino mut/superficie 10/19 (1 ins)
100-200	01/19 (1 ins)	00/19	08/19 (3 del)	10/19 (1 ins)	01/19	05/19 (1 ins)	04/19 (2 ins)	10/19 (1 ins)
200-300	02/20	02/20	07/20 (3 ins)	06/20 (2 ins)	01/20	03/20 (1 ins)	01/20	06/20 (2 ins)
300-400	15/31	11/31	24/31	17/30 (6 del)	17/31	14/31	16/31	18/30 (6 del)
400-500	21/46	14/46	36/46 (ins, 1del)	36/44 (3 ins)	21/46	22/46 (1 del)	20/46 (1 ins)	37/44 (3 ins)
500-600	10/27	07/27	15/27	15/30	10/27	10/27	13/27	17/30
700-750	06/24	00/24	13/24	11/24	06/24	07/24	05/24	11/24
100-750	55/167 (33%) 67% de identidad	34/167 (20%) 80% de identidad	103/167 (62%) 38% de identidad	95/167 (57%) 43% de identidad	56/167 (34%) 66% de identidad	61/167 (37%) 63% de identidad	59/167 (35%) 65% de identidad	99/167 (59%) 41% de identidad

Tabla 10

Identidad de superficie (%)	AAV1	AAV3a	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV Caprino
AAV2	67	80	38	43	66	63	65	41
AAV5								88

Tabla 11

Similitud de la cápside (%)	AAV1	AAV3a	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV Caprino
AAV2	83	87	59	56	83	82	83	56

5

EJEMPLO 6INMUNORREACTIVIDAD DE AAV CAPRINO Y COMPARACIÓN CON OTROS AAVsA. Actividad de Neutralización de Serotipos AAV de Primates

10 La actividad de neutralización de los serotipos de AAV de primates indicada en la Tabla 12 se evaluó utilizando los métodos arriba descritos. La inmunorreactividad se determinó utilizando una IgG humana purificada agrupada (designada IVIg 8 en las Tablas 12 y 13).

15 Tal como se muestra en las Tablas 12 y 13, la mayoría de los serotipos fueron neutralizados por la IgG humana agrupada a concentraciones clínicamente relevantes. AAV-4 y AAV-8 eran más resistentes a la neutralización que AAV-1, AAV-2 y AAV-6, que eran más resistentes a la neutralización que AAV-3, que era más resistente a la neutralización que AAV-5.

B. Actividad de Neutralización de Serotipos de AAV Caprino frente a AAV de Primates

20 La actividad de neutralización de AAV de cabra se comparó con AAV-5 de primates utilizando los métodos arriba descritos. La inmunorreactividad se determinó utilizando una IgG humana purificada agrupada (designada IVIg 8 en la Tabla 14). Tal como se muestra en la Tabla 14, AAV caprino exhibía más resistencia a la neutralización que AAV-5. La Tabla 14 también muestra la actividad de neutralización de AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6 y AAV-8, según se determina en el ejemplo anterior, con relación al AAV caprino.

25 En otro experimento, se examinó la actividad de neutralización de AAV caprino con relación a AAV-8 utilizando tres agrupaciones purificadas diferentes de IgG humana, designadas IVIg 3, IVIg 6 e IVIg 8, respectivamente, en las Tablas 15 y 16. Tal como se muestra en las tablas, AAV caprino era más resistente a la neutralización que AAV-8 utilizando las tres agrupaciones de IgG humana.

TABLA 12

IVIg 8 (ug/ul)	50	10	1	0.1	0.01
Vector					
AAV 1	0	14		86	100
AAV 2	0	2		100	100
AAV 3	0	0	45		92
AAV 4	49		100	100	100
AAV 5	0	1	1	17	
AAV 6	0	14		81	100
AAV 8	0		77	88	90

Se destaca la primera concentración para cada serotipo que muestra >50% de células azules comparado con control

TABLA 13

Vector	Concentración menor de IVIG (mg/ml) que muestra >50% de neutralización del virus IVIG (Panglobulina, ZLB Bioplasma, lote nº 1838-00351))
AAV1	10
AAV2	10
AAV3B	1
AAV4	50
AAV5	0.1

ES 2 563 064 T3

Vector	Concentración menor de IVIG (mg/ml) que muestra >50% de neutralización del virus
	IVIG (Panglobulina, ZLB Bioplasma, lote nº 1838-00351))
AAV6	10
AAV8	50

TABLA 14

Vector	Concentración menor de IVIG (mg/ml) que muestra >50% de neutralización del virus
	IVIG (Panglobulina, ZLB Bioplasma, lote nº 1838-00351))
AAV5	0,1
AAV Caprino	50

TABLA 15

IVig 3 (ug/ul) Vector	50	40	20	10	1	0.1
AAV 8	1	2	32	33		105
AAV de cabra	16	32		69	92	102

IVig 6 (ug/ul) Vector	50	40	20	10	1	0.1
AAV 8	0	0	32	22		110
AAV de cabra	10	14		113	125	126

IVig 8 (ug/ul) Vector	50	40	20	10	1	0.1
AAV 8	0	0	11	44		105
AAV de cabra	8	14		80	93	120

TABLA 16

Vector	Concentración menor de IVIG (mg/ml) que muestra >50% de neutralización del virus.		
	IVIG (Panglobulina, ZLB Bioplasma, lote nº 1838-00299)	IVIG (Panglobulina, ZLB Bioplasma, lote nº 1838-00351)	IVIG (Baxter, Polygam S/D, lote nº 02J06AX11)
AAV8	10	10	10
AAV caprino	40	40	40

EJEMPLO 7CAPACIDAD DE AAV CAPRINA DE TRANSDUCIR NEURONAS ESTRIATALES Y CÉLULAS GLIALES Y COMPARACIÓN CON OTROS AAVs

5 Con el fin de examinar la capacidad de los diversos AAVs de transducir neuronas estriatales y células gliales, se realizó el siguiente experimento. Cultivos primarios de neuronas estriatales disociados se prepararon a partir de embriones de rata Sprague-Dawley embrionarios de 18 días. Tejido estriatal disecado se desmenuzó en trozos pequeños y se incubó en tripsina durante 30 min. El tejido se trituró a través de una pipeta Pasteur y las células se sembraron a una densidad de 350.000 por pocillo en placas de cultivo de 12 pocillos que contenían cubreobjetos de vidrio de 18 mm redondos recubiertos con poli-D-lisina. El medio de cultivo era medio neurobasal suplementado con B-27 al 2%, L-glutamina 0,5 mM y ácido L-glutámico 25 mM. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ y se utilizaron en experimentos de dos a tres semanas después de la disociación. En esta fase, neuronas dopaminérgicas y estriatales se distinguen tanto morfológicamente como por la expresión de marcadores biológicos.

15 Los cultivos estriatales se incubaron durante cinco días con 10⁴ MOI viriones de rAAV derivados de AAV-2, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-8 y AAV caprino que contenían el gen β-galactosidasa (LacZ), preparó utilizando el método de transfección triple descrito en el Ejemplo 1. Para el AAV caprino, la secuencia codificadora de la cápside presente en pHLP19 (descrito en la patente de EE.UU. N° 6.001.650) se sustituyó por la secuencia codificadora de la VP1 caprina como sigue. En síntesis, el plásmido pHLP19 se digirió con *Swal* y *Agel* (New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599), el fragmento de interés se purificó en un gel de agarosa al 1% de bajo punto de fusión (FMC Bioproducts, Rockland, ME) y se utilizó para la ligadura con el fragmento de PCR que contenía la cápside caprina. El fragmento de PCR de la cápside caprina fue amplificado utilizando un cebador directo: AAATCAGGTATGTCTTTTGTGATCACCC (SEQ ID NO: 27) y un cebador inverso: ACACGAATTAACCGGTTTATTGAGGGTATGCGACATGAATGGG (SEQ ID NO: 28). El fragmento de PCR se digirió con la enzima de *Agel* (New England Biolabs, Beverly, MA 01915-5599) y se utilizó para la ligadura con el plásmido digerido.

25 Se observó una expresión eficaz y sostenida de la proteína β-gal en las neuronas estriatales tras la transducción con los vectores. La eficacia de expresión era la mayor en AAV6, seguido por AAV8, AAV2, AAV5, AAV caprino y AAV4. AAV6 transducía neuronas exclusivamente, mientras que la transferencia de genes mediada por AAV5 era ineficiente en las neuronas, pero transducía las células gliales. Todos los otros vectores transducían neuronas y células gliales.

EJEMPLO 8CAPACIDAD DE AAV CAPRINO PARA TRANSDUCIR MÚSCULO Y COMPARACIÓN CON OTROS AAVs

35 Con el fin de determinar la capacidad de los diversos AAVs de transducir músculo en presencia o ausencia de IVIG, se realizó el siguiente experimento. A ratones SCID machos (15- 25 g) se les inyectaron por vía intramuscular 2e11 genomas vectoriales de viriones de rAAV caprinos, viriones de rAAV-1 o viriones de rAAV-8 (5 ratones por grupo), codificando cada uno de dichos viriones el factor IX humano. Estos viriones se prepararon utilizando el método de transfección triple descrito en el Ejemplo 1. La secuencia codificadora de la cápside presente en pHLP19 fue sustituida por la secuencia codificadora de VP1 tal como se describe arriba. Se recogió sangre retro-orbital 1 y 2 semanas después de la inyección de vectores y se extrajo plasma. A los ratones sometidos a ensayo con IVIG (Carimune: inmunoglobulina purificada a partir de una agrupación de suero humano, ZLB Bioplasma, lote n° 03287-00117) se les inyectaron a través de la vena de la cola (250 μl), 24 horas antes de la inyección del vector. FIX humano se midió en las muestras de plasma utilizando un ELISA de hFIX.

40 Tal como se muestra en la Figura 17, Los viriones de rAAV caprino no transducían músculo. Los viriones de rAAV-8 y rAAV-1 exhibían niveles de expresión similares de hFIX. AAV-1 era más resistente a la neutralización que AAV-8 *in vivo*.

EJEMPLO 9CAPACIDAD DE AAV CAPRINO DE TRANSDUCIR HÍGADO Y COMPARACIÓN CON OTROS AAVs Y BIODISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS A PARTIR DE GENES SUMINISTRADOS POR VIRIONES DE AAV CAPRINOS

50 Con el fin de determinar la capacidad de los diversos AAVs de transducir hígado en presencia o ausencia de IVIG, se realizó el siguiente experimento. A ratones SCID machos (15- 25 g) se les inyectaron a través de la vena de la

cola 5e11 genomas vectoriales de viriones de rAAV caprinos o viriones de rAAV-8 (5 ratones por grupo). Los viriones incluían el gen que codifica el factor IX humano (hFIX). Los datos de viriones de rAAV-2 que figuran más adelante eran de otro experimento. En particular, los viriones se generaron utilizando el plásmido pAAV-hFIX16, que contenía el gen del factor IX humano bajo el control de un promotor específico para el hígado (descrito en Miao et al., *Mol. Ther.* (2000) 1:522-532). El plásmido pAAV-hFIX16 es un plásmido de 11.277 pb que codifica un minigen de Factor IX humano. En esta construcción, el ADNc de FIX está interrumpido entre los exones 1 y 2 con una forma suprimida de intrón 1 que ha demostrado aumentar la expresión de FIX. La expresión de FIX está bajo el control transcripcional de la región de control hepática (HCR) de ApoE y el promotor de la alfa 1 antitripsina humana (hAAT), así como una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (gGH PA). La cadena principal del plásmido pAAV-hFIX16 contiene el gen β -lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina, un origen bacteriano de replicación, un origen M13/F1 de replicación, y un fragmento de ADN del bacteriófago lambda. El ADN lambda aumenta el tamaño de la cadena principal del plásmido hasta 6966 pb, lo que impide su empaquetamiento durante la producción del vector de AAV.

Los viriones de AAV recombinantes se produjeron utilizando el método de transfección triple arriba descrito. Para los viriones de rAAV caprino, la secuencia codificadora de VP1 presente en el plásmido pHLP19 fue sustituida por la secuencia codificadora de VP1 caprina tal como se describió arriba.

Después de la inyección, se recogió la sangre retro-orbital 1, 2, 4 (5 ratones por grupo) y 8 semana (2 ratones por grupo) después de la inyección y se extrajo plasma. A ratones sometidos a ensayo con IVIG (Panglobulina: inmunoglobulina purificada a partir de una agrupación de suero humano, ZLB Bioplasma, lote n° 1838-00299) se les inyectaron a través de la vena de la cola (250 μ l), 24 horas antes de la inyección del vector. FIX humano se midió en las muestras de plasma mediante un ELISA de hFIX.

Tal como se muestra en la Figura 18, la transducción de hígado con los viriones de AAV caprino recombinantes después de la administración intravenosa era baja. Se observó una expresión más alta de hFIX utilizando los viriones de rAAV-8 que con los viriones de rAAV-2, y los viriones de rAAV-2 mostraron una expresión más alta que los viriones de rAAV caprino. Los viriones de rAAV caprino eran más resistentes a la neutralización que los viriones de rAAV-2 *in vivo*. La expresión de FIX humano se redujo en los ratones a los que se inyectó rAAV caprino con títulos de IVIG neutralizantes preexistentes de 120, mientras que la expresión de hFIX fue completamente bloqueada en los ratones a los que se inyectó rAAV-2 con títulos de IVIG neutralizantes preexistentes de 10.

Para el análisis de la biodistribución, los ratones (2 ratones por grupo) fueron sacrificados y los órganos se recogieron 4 semanas después de la inyección del vector. Los órganos recogidos incluían cerebro, testículos, músculo (cuádriceps), riñón, bazo, pulmón, corazón e hígado. Para medir el hFIX, se realizó una PCR cuantitativa en muestras de ADN extraídas de diferentes tejidos. Tal como se muestra en la Figura 19, la biodistribución de viriones de rAAV caprino administrados por vía intravenosa en ratones SCID machos demostró que los viriones de rAAV caprino tenían un tropismo pulmonar.

35 EJEMPLO 10

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO AAV BOVINO

La evidencia de contaminación por parvovirus se observó en adenovirus bovino (BAV) tipo 8, cepa Misk/67 (disponible de ATCC, Manassas, VA, n° de Acceso VR-769) aislado de los pulmones de terneros, utilizando técnicas conocidas en la técnica. Este nuevo producto aislado se denominó "AAV-C1". AAV-C1 se amplificó parcialmente mediante PCR y se secuenció. Las Figuras 20A y 20B muestran la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos, respectivamente, de VP1 y de AAV-C1. La secuencia de aminoácidos de VP1 de AAV-C1 se comparó con otras VP1s de AAV. En particular, las Figuras 21A-21H muestran una comparación de la secuencia de aminoácidos de VP1 de AAV-C1 con AAV-1, AAV-2, AAV-3B, AAV-4, AAV-6, AAV-8, AAV-5 de primates y AAV caprino. Los aminoácidos conservados en las secuencias se indican con * y se muestra la accesibilidad de las diversas posiciones de los aminoácidos en base a la estructura cristalina. B indica que el aminoácido está enterrado entre la superficie interior y exterior. I indica que el aminoácido se encuentra en la superficie interior y O indica que el aminoácido se encuentra en la superficie exterior.

VP1 de AAV-C1 exhibía aproximadamente un 76% de identidad con AAV-4. AAV-C 1 exhibía aproximadamente un 54% de identidad con VP1 de AAV 5, con una alta homología en la proteína Rep, los primeros 137 aminoácidos de VP1 de AAV-5 y la región no traducida después de la parada de VP1 de AAV-5 (no mostrado). Por lo tanto, AAV-C1 parece ser un híbrido natural entre AAV-5 y AAV-4. AAV-C1 también exhibía aproximadamente un 58% de identidad de la secuencia con los VP1s de AAV-2 y AAV-8, aproximadamente el 59% de identidad de la secuencia con los VP1s de AAV-1 y AAV-6 y aproximadamente un 60% de identidad de la secuencia con VP1 de AAV-3B.

Las diferencias en la secuencia entre AAV-4 y AAV-C1 estaban dispersadas por toda la cápside, a diferencia de las diferencias entre AAV-5 y AAV caprino (AAV-G1), en donde los cambios eran exclusivamente en la región hipervariable C-terminal de VP1. La similitud con la secuencia de AAV-4 era desde el inicio de VP2 hasta la parada de la cápside. AAV-C1 parece ser uno de los más divergentes de los AAVs de mamíferos con aproximadamente un 58% de homología de la secuencia con AAV-2. En particular, el AAV bovino descrito en Schmidt et al. fue parcialmente amplificado a partir de adenovirus bovino tipo 2. La comparación de la secuencia de nucleótidos de VP1 de AAV-C1 y el AAV bovino descrito en Schmidt et al. mostró 12 cambios de nucleótidos y 5 diferencias de aminoácidos. Estas diferencias se produjeron en las posiciones 334 (Q sustituido por H presente en VP1 de AAV-C1), 464 (K sustituido por N presente en VP1 de AAV-C1), 465 (T sustituido por K presente en VP1 de AAV-C1), 499 (R sustituido por G presente en VP1 de AAV-C1) y 514 (G sustituido por R presente en VP1 de AAV-C1).

La cápside completa de AAV-C1 se clonó en un plásmido que se utilizó para producir vectores de AAV-2 pseudotipados. Un vector de AAV-C1 que contiene el gen LacZ (AAV-C1-LacZ) fue producido para una caracterización adicional, utilizando las técnicas de transfección triple arriba descritas, con la excepción de que la secuencia de la cápside presente en pHLp19 fue reemplazada por la secuencia de la cápside bovina. El título de AAV-C1-LacZ (vg/ml) se calculó utilizando la PCR cuantitativa (Q-PCR) tal como se describe arriba. Tal como se muestra en la Tabla 17, el vector AAV-C1 LacZ se produjo de manera eficiente; altos títulos de vector (2,45e10 vg/ml) se detectaron mediante Q-PCR. El vector AAV-C1 LacZ mostró una transducción eficiente de células *in vitro* (células que expresan LacZ estaban presentes en números equiparables a otros AAVs).

Tabla 17: Análisis mediante Q-PCR de vector AAV-C1-LacZ.

Muestra	Media (vg/mL)	Desv. típ. (vg/mL)	% CV
AAV2-lacZ	1,11E+11	1,09E+10	9,9
AAV-C1-LacZ	2,45E+10	1,88E+09	7,7
LacZ referencia	9,96E+12	7,11E+11	7,1

EJEMPLO 11

INMUNORREACTIVIDAD DE AAV BOVINO Y COMPARACIÓN CON OTROS AAVs

La actividad de neutralización de AAV-C1 bovino en relación con AAV-2 de primate se evaluó utilizando los métodos descritos arriba en el Ejemplo 6. La inmunorreactividad se determinó utilizando una IgG humana purificada agrupada (IVIG-8, Panglobulina Lote n° 1838-00351, ZLB Bioplasma AG, Berna, Suiza). Los ensayos de neutralización *in vitro* demostraron que AAV-C1 era 16 veces más resistente a la neutralización por IVIG humana que AAV-2. La concentración más baja de IVIG (mg/ml) mostrando más de un 50% de neutralización de AAV-2 era de 0,2 mg/ml, mientras que AAV-C1 era 3,25 mg/ml.

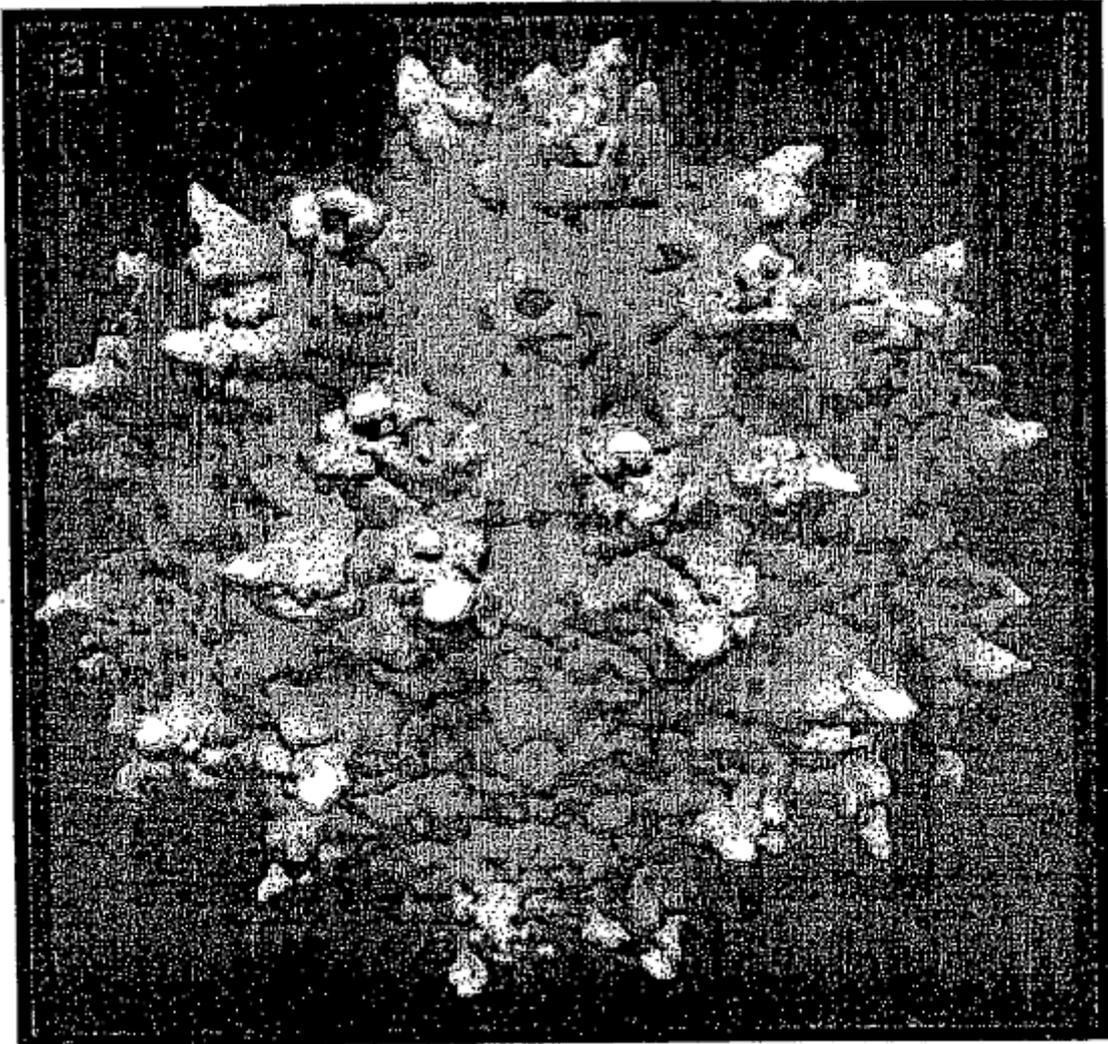
Por lo tanto, se describen métodos para producir y utilizar viriones de AAV mutantes con una inmunorreactividad reducida.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de cápside de virus adeno-asociado (AAV) mutado que, cuando está presente en un virión de AAV, imparte al virión una inmunorreactividad reducida en comparación con el correspondiente virión de tipo salvaje, en donde la mutación comprende al menos una sustitución de aminoácido, y en donde la sustitución de aminoácido comprende una sustitución del aminoácido que aparece en la posición correspondiente a la posición 130 de la cápside de VP2 de AAV-2.
2. La proteína de la reivindicación 1, en donde el aminoácido que aparece de forma natural en la posición está sustituido con una alanina.
- 10 3. La proteína de la reivindicación 2, en donde la proteína comprende, además, una sustitución de histidina para el aminoácido que aparece en la posición correspondiente al aminoácido que se encuentra en la posición 360 de VP2 de AAV-2.
4. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína comprende una sustitución de lisina para el aminoácido que aparece en la posición correspondiente al aminoácido que se encuentra en la posición 571 de VP2 de AAV-2.
- 15 5. Un polinucleótido que codifica la proteína mutada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un virión de AAV recombinante que comprende la proteína mutada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. El virión de AAV recombinante de la reivindicación 6, en donde dicho virión comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un ARN antisentido o una ribozima.
- 20 8. El virión de AAV recombinante de la reivindicación 6, en donde dicho virión comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína terapéutica unida operativamente a elementos de control capaces de dirigir la transcripción y la traducción *in vivo* de dicha proteína.
- 25 9. Un virión de AAV recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, para uso en un método de suministrar una molécula de ácido nucleico heterólogo a una célula o tejido de un sujeto vertebrado *in vivo*, con lo que el producto codificado por la molécula de ácido nucleico heterólogo es expresado a un nivel que proporciona un efecto terapéutico.
10. El virión de AAV recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha célula o dicho tejido es una célula o tejido muscular.
11. El virión de AAV recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha célula o tejido muscular se deriva de músculo esquelético.
- 30 12. El virión de AAV recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho virión de AAV recombinante se ha de suministrar al sujeto mediante inyección intramuscular.
13. El virión de AAV recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho virión de AAV recombinante se ha de suministrar al torrente sanguíneo del sujeto.
- 35 14. El virión de AAV recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho virión de AAV recombinante se ha de suministrar por vía intravenosa.
15. El virión de AAV recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho virión de AAV recombinante se ha de suministrar por vía intra-arterial.
16. El virión de AAV recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho virión de AAV recombinante se ha de suministrar al hígado.
- 40 17. El virión de AAV recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho virión de AAV recombinante se ha de suministrar al cerebro.

18. Uso de un virión de AAV recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, para suministrar una molécula de ácido nucleico heterólogo a una célula o tejido de un sujeto vertebrado *in vitro*.

FIG 1.



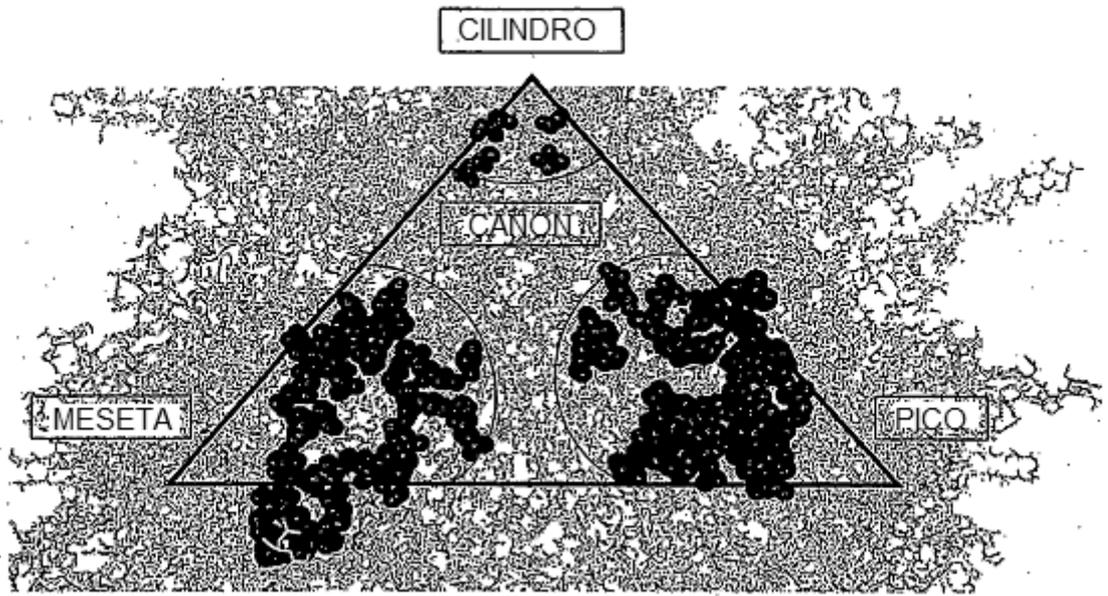


FIG. 2

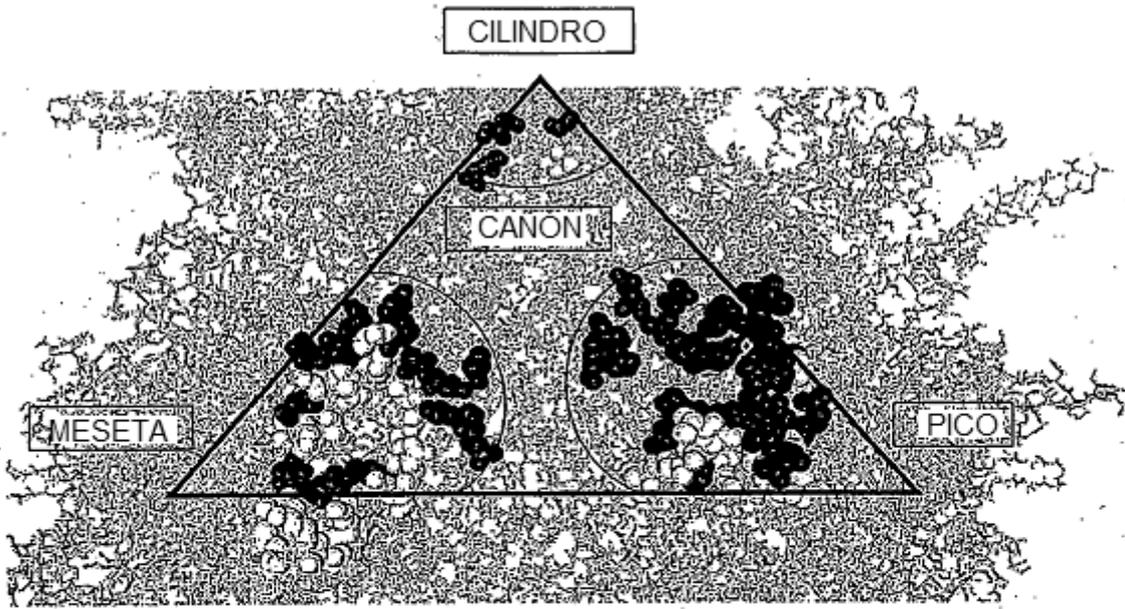


FIG. 3

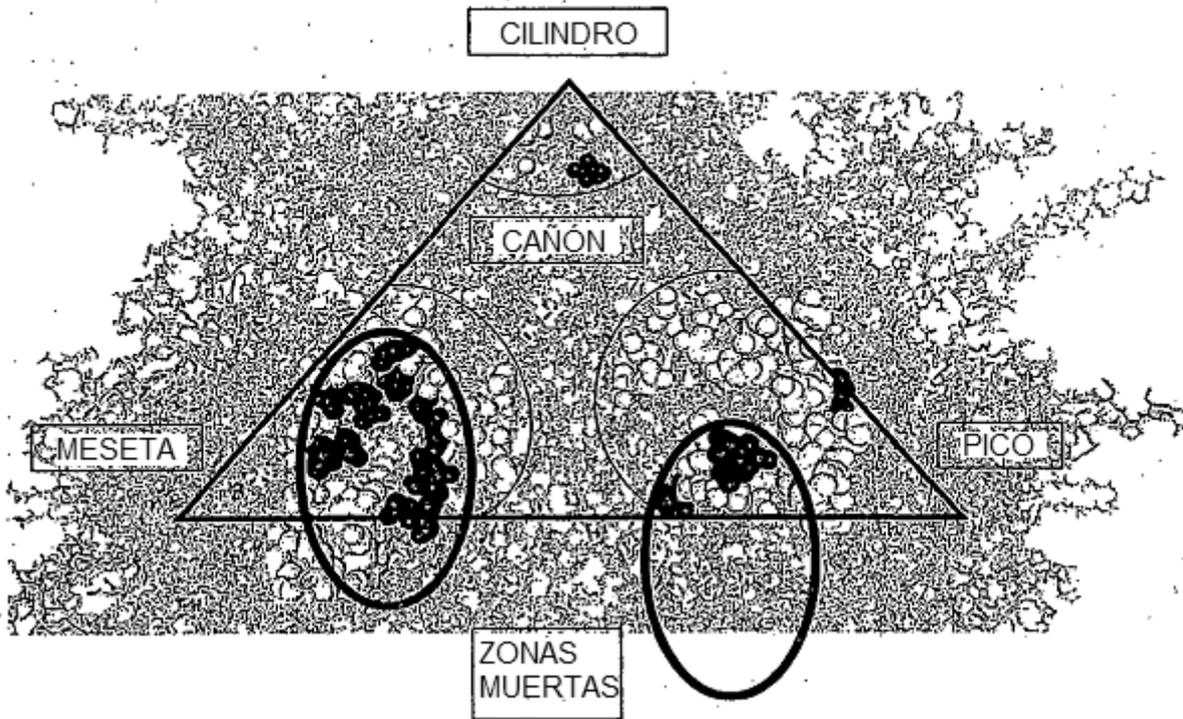


FIG. 4

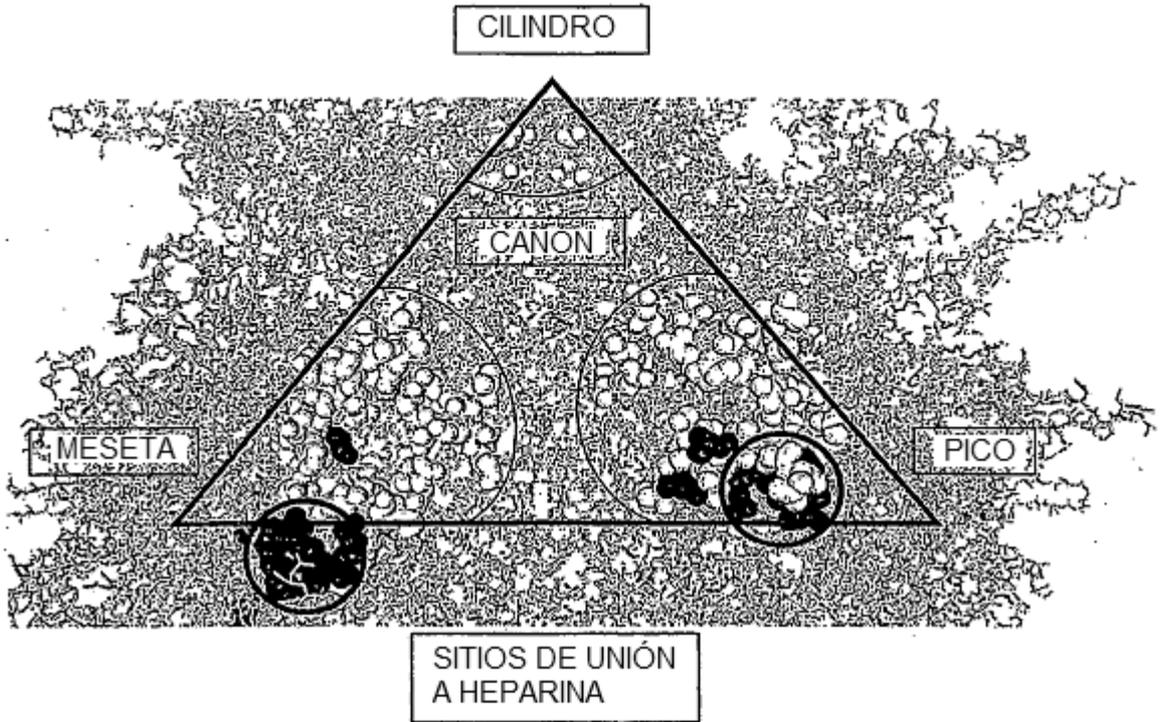


FIG. 5

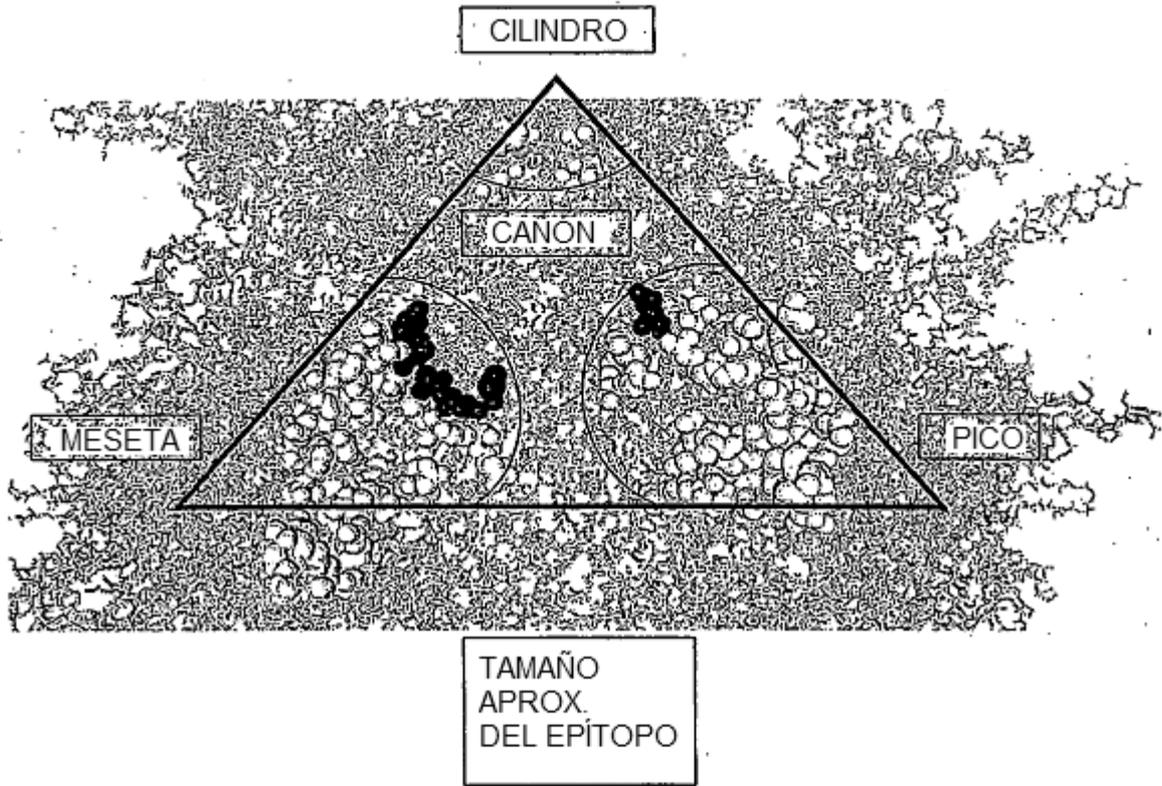


FIG. 6

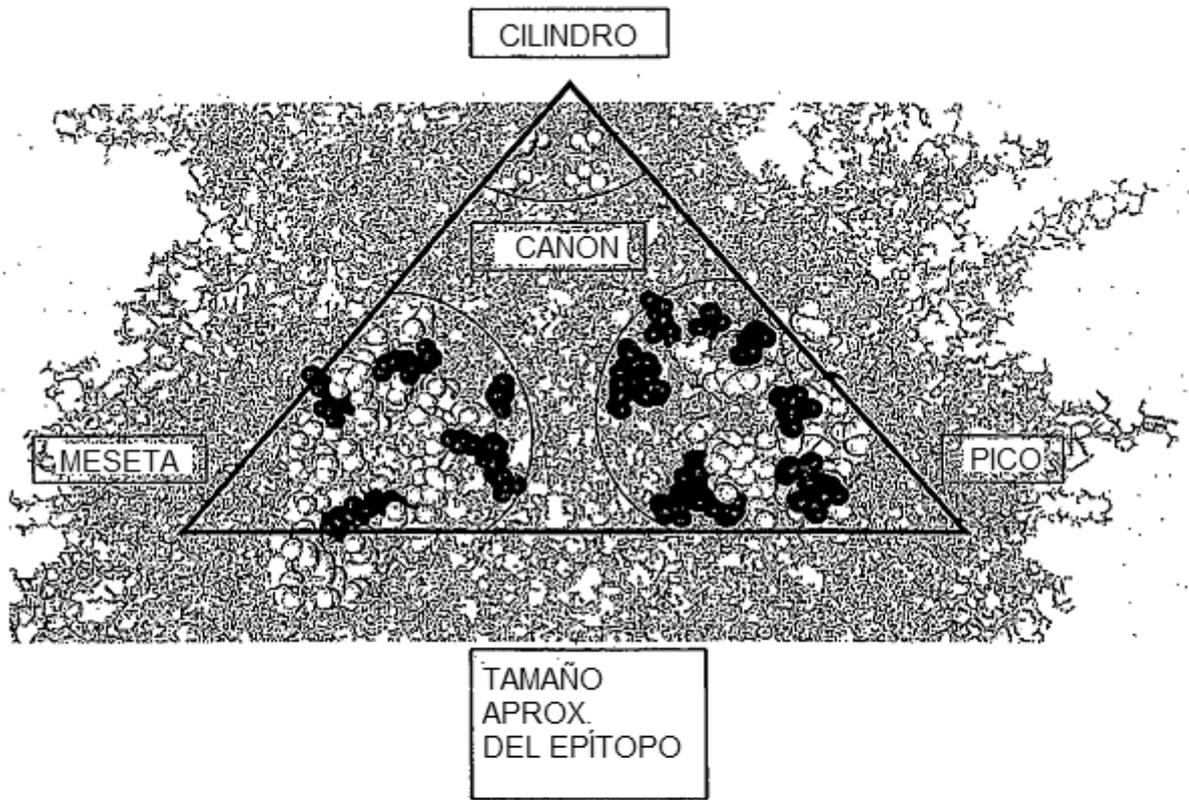
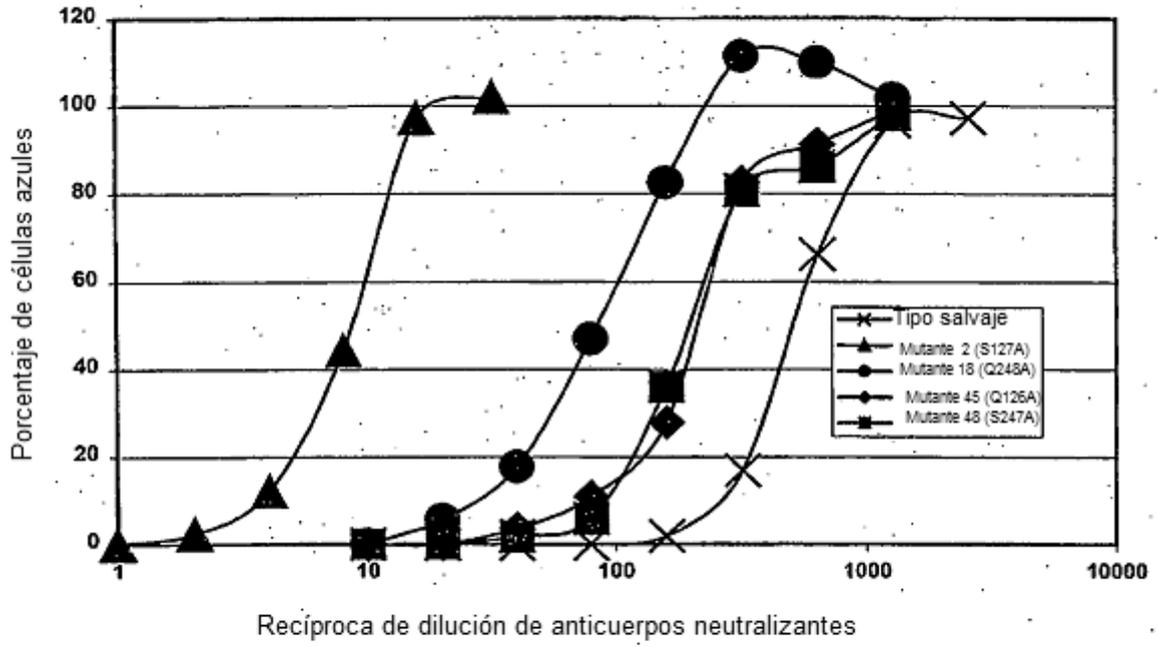


FIG. 7

FIG. 8



1 MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAP
59 SGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSRTRWALPTYN
117 NHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRL
175 NEKLENIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQCLPPFPADV
233 FMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAH
291 QSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQ
349 QRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNCRDVLNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFG
407 KQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV
465 PGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPQILIKNTFVPANPST
523 TFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTN
581 GVYSEPRPIGTRYLTRNL

FIGURA 9

```

1 maadgyldw ledtlsegir qwwklkpgpp ppkpaerhkd dsrglvlpgy kylgpfnfld
61 kgepvneada aalehdkayd rqldsgdnpv lkynhadaef qerlkedtsf ggnlgravfq
121 akkrvleplg lveepvktap gkkrvvehsp vepdsssgtg kagqqparkr lnfgqtgdad
181 svpdpqplgq ppaapsqglg ntmatgsgap madnegadg vgnssgnwhc dstwmgdrvi
241 ttstrtwalp tynnhlykqi ssqsgasndn hyfgystpwg ydfnrfhch fsprdwqrli
301 nnnwgfprkr lnfklfniv kvtdqndgtt tiannltstv qvftdseyql pyvlgsahqg
361 clppfpadvf mvpqygytl nngsqavgrs sfycleyfps qmlrtgnnft fsytfedvpf
421 hssyahsqsl drlmpplidq ylyylsrnt psgtttqsrl qfsqagasdi rdqsrnwlpq
481 pcyrqqrsvk tsadnnsey swtgatkyhl ngrdsvnpg pamashkdde ekffpqsgvl
541 ifgkqgsekt nvdiekvmi deeeirttnp vateqygsvs tnlqrgrnqa atadvntqgv
601 lpgmwqdrd vylqqpiwak iphtdghfhp splmggfglk hpppqilikn tppvpanpstt
661 fsaakfasfi tqystqqvsv eiewelqken skrwnpeiqy tsnynksvvn dftvdtngvy
721 seprpigtry ltrnl

```

FIGURA 10

VP1: N _____ **C (735 AMINOÁCIDOS)**

VP2: N _____ **C (598 AMINOÁCIDOS)**

VP3: N _____ **C (533 AMINOÁCIDOS)**



VP1, VP2 Y VP3 COMPARTEN EL MISMO EXTREMO 533 C-TERMINAL (QUE ES TODO DE VP3)



MUTANTES N° 1-127 DE LA CÁPSIDE CAEN DENTRO DE ESTA ZONA

FIGURA 11

ES 2 563 064 T3

	VP1	
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	atgtcttttgttgatcacccctccagattggttgaagaagtgg	2250
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	tgaaggcttctcgcgagttttgggccttgaagcgggccaccgaaaccaa	2300
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	aacccaatcagcagcatcaagatcaagcccgtgtcttgtgctgcctggt	2350
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	tataactatctcggaccggaaacggctctcgatcgaggagagcctgtcaa	2400
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	cagggcagacgaggtcgcgcgagagcacgacatctcgtacaacgagcagc	2450
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ttgagggcgggagacaaccctacctcaagtacaaccacgaggacgcccag	2500
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	tttcaggagaagctcgcgcgacgacacatccttcggggaaacctcgaaa	2550
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ggcagtctttcaggccaagaaaagggttctcgaacctttggcctggttg	2600
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	aaggggtgctaagacggcccctaccggaaagcggatagacgaccacttt	2650
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ccaaaaagaaagaaggctcggaccgaagaggactccaagccttccacctc	2700
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	gtcagacgccgaagctggaccagcggatcccagcagctgcaaatcccag	2750
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	cccaaccagcctcaagtttgggagctgatacaatgtctgcccggaggtggc	2800
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ggcccattgggcgacaataaccaaggtgccgatggagtgggcaatgcctc	2850
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	gggagattggcattgcgattccacgtggatgggggacagagtcgtcacca	2900
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	agtccaccgaaacctgggtgctgcccagctacaacaaccaccagtaccga	2950
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	gagatcaaaagcggctccgtcgacggaagcaacgccaacgcctactttgg	3000
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	atacagcaccccctgggggtactttgacfttaaccgcttccacagccact	3050
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ggagccccgagactggcaaaagactcatcaacaactactggggcttcaga	3100
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ccccggtcctcagagtcaaaatcttcaacattcaagtcaaagaggtcac	3150
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ggtgcaggactccaccaccaccatcgccaacaacctcacctccaccgtcc	3200
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	aagtgtttacggacgacgactaccagctgcctacgtcgtcggcaacggg	3250
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	accgagggatgcctgcggccttccctccgcaaggtctttacgtgcccga	3300

FIGURA 12A

ES 2 563 064 T3

AAV de primates tipo 5 AAV caprino	gtacgggttacgcgacgctgaaccggaacaacacagaaaatcccaccgagaC.....a.....gg...C..C..g..a...C	3350
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ggagcagcttcttctgcctagagtactttcccagcaagatgctgagaacgt.....g...	3400
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ggcaacaactttgagtttacctacaactttgaggaggtgcccttccactcg.....a.....g	3450
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	cagcttcgctcccagtcagaacctgttcaagctggccaaccgctggtggC..g..C.....C..t.....	3500
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	accagtacttgtaccgcttcgtagacacaataaactgacggagtcacgC.....ctcggc...g...cca.....	3550
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ttcaacaagaacctggccgggagatacgccaacacctacaaaaactggt ..C.a.....g..C.....	3600
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	cccggggcccatggccgaaccagggtggaacctgggctccggggtcaac.a...t..	3650
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	accgagc---cagtgtcagcgccttcgccacgacc-----aataggatg g.a..a.caa...a.....t..aa..aa.tttt..gtctca..cc.....	3691
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	gagctcagaggcgcgagttaccaggtgccccgcagccgaacggcatgac a.C..g....g..C..C....a...aa...C....C....g.....	3741
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	caacaacctccagggcagcaaacctatgccctggagaacactatgatct a....cg.....a.....cg...C..g....a.....C.....	3791
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	tcaacagccagccggcgaaccgggaccaccgcccacgtacctcgagggcgct..aaac..C.cg.....a..t...t.ggt.....ca....a.	3841
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	aacatgctcatcaccagcagagcgcgagcgcagccggtgaaccgctggc ..tc.a..gc.g.....t.....C..C.....g.....	3891
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	gtacaacgtcggcggcagatggccaccaacaaccagagctccaccactg t.....acg.....t.....gc.....a.g.....g.	3941
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ccccgcgaccggcagctacaacctccaggaaatcgtgcccggcagcgtg .t...a..gt...g..C.....g.gc.t..t.....a	3991
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	tggatggagagggacgtgtacctccaaggaccatctgggccaagatccc	4041
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	agagacggggggcactttcaccctctccggccatgggaggattcggac	4091
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	tcaaacaccccaccgcccattgatgctcatcaagaacacgcctgtgccggag.....a.....g.....C	4141
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	aatatcaccagcttctcggacgtgccctcagcagcttcatcaccagta ..C.....	4191
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	cagcaccgggaggtcacctggagatggagtgaggctcaagaaggaaaa.....	4241
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	actccaagaggtggaacccagagatccagtacacaacaactacaacgacC.....	4291
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	ccccagtttgtggactttgccccggacagcaccgggaatacagaaccact..a..g..t...C.....	4341
AAV de primates tipo 5 AAV caprino	cagacctatcggaaaccgataaccttaccgacccttg..C.....C.....	4378

FIGURA 12B

VP1 de AAV de primates tipo 5	MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKFNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPGNGLDR	60
VP1 de AAV caprino	60
VP1 de AAV de primates tipo 5	GEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSPGGNLGKAVFQA	120
VP1 de AAV caprino	120
VP1 de AAV de primates tipo 5	KKRVLEPPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQLQI	180
VP1 de AAV caprino	180
VP1 de AAV de primates tipo 5	PAQPASSLGADTMSAGGGGPLGDNNQCADGVGNASGDWHCDSTWMDRVVTKSTRTWVLP	240
VP1 de AAV caprino	240
VP1 de AAV de primates tipo 5	SYNNHQYREIKSGSVGDSNANAYFGYSTPWGYDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGFRRP	300
VP1 de AAV caprino	300
VP1 de AAV de primates tipo 5	SLRVKIFNIQVKEVTVDSTTTIANNLSTVQVFTDDDYQLPYVVVGNTEGCLPAFPFQV	360
VP1 de AAV caprino	360
VP1 de AAV de primates tipo 5	FTLPQYGYATLNRDNENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPPHSSFAPS	420
VP1 de AAV caprino	420
VP1 de AAV de primates tipo 5	QNLFKLANPLVDQYLYRPFVSTMTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPGPMGRTOGWNLSG	480
VP1 de AAV caprino	480
VP1 de AAV de primates tipo 5	--MNRASVSAFATTNRMELEGASYQWPPQPNGMTNNLOGSNFYALENTMIFNSQANPGT	538
VP1 de AAV caprino	SSV...NN.SMS...N...D...R...A.N.T... 540	
VP1 de AAV de primates tipo 5	TAEYDEGNMLITSESETQPVNRVAYNYGGQMATNQSSTTAPATGYTNLQEIIVPGSVWME	598
VP1 de AAV caprino	...S...L.L...A.KA...TV...VL... 600	
VP1 de AAV de primates tipo 5	RDVYLOGPIWAKIPETGAHFHSPAMGGFGLKHPPMMLIKNTPEVPGNITSFSDVPVSSF	658
VP1 de AAV caprino	660
VP1 de AAV de primates tipo 5	ITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPFIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTRREIGTR	718
VP1 de AAV caprino	720
VP1 de AAV de primates tipo 5	YLTRPL 724	
VP1 de AAV caprino 726	

FIG. 13

VP1 VP2
450 313

VP1 de AAV-2 : QMLRTGNNFT FSYTFEDVPP HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTN-T
 VP1 de AAV-3B : QMLRTGNNFQ FSYTFEDVPP HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLNRTQGT
 VP1 de AAV-6 : QMLRTGNNFT FSYTFEDVPP HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLNRTQ-N
 VP1 de AAV-1 : QMLRTGNNFT FSYTFEEVPP HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLNRTQ-N
 VP1 de AAV-8 : QMLRTGNNFQ FTYTFEDVPP HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTQ-T
 VP1 de AAV-4 : QMLRTGNNFE ITYSFEKVPF HSMYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLWGLQSTT-T
 VP1 de AAV-5 : KMLRTGNNFE FTYNFEVPP HSSFAPSQNL FKLANPLVDQ YLYRFVSTN-N
 VP1 de AAV caprino : KMLRTGNNFE FTYSFEVPP HCSFAPSQNL FKLANPLVDQ YLYRFVSTS-A

Parvovirus :

Accesibilidad : IIBBBIII IIIIIIII BIBIBIBOB OBBBBBOOB BBBBBOBB O

Característica superficie :

ADN : P B BB D DD P P YYY S S S

VP1 de AAV-2 : PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TSA-----DNNNSEY 500

363

VP1 de AAV-3B : TSGTTNQSRL LFSQAGPQSM SLQARNWLPG PCYRQQRVSK TAN-----DNNNSNF
 VP1 de AAV-6 : QSGSAQNKDL LFSRGSFAGM SVQPKNWLPG PCYRQQRVSK TKT-----DNNNSNF
 VP1 de AAV-1 : QSGSAQNKDL LFSRGSFAGM SVQPKNWLPG PCYRQQRVSK TKT-----DNNNSNF
 VP1 de AAV-8 : TGGTANTQTL GFSQGGPNTM ANQAKNWLPG PCYRQQRVST TTG-----QNNNSNF
 VP1 de AAV-4 : TTLNAGTATT NFKLRPTNF SNFKKNWLPG PSIKQQGFSK TANQYKIPATGSDS
 VP1 de AAV-5 : TGG-----V QFNKNLAGRY ANTYKNWFPG PMGRTQGWNL GSG-----VNRASVS
 VP1 de AAV caprino : TGA-----I QFQKNLAGRY ANTYKNWFPG PMGRTQGWNT SSGSSTNRVSVN

Neutralización : #

#

Accesibilidad : OOOOOOOOB OBBBBBOOB BBOOBBOOB OOO OBOOOOB

Característica superficie : SSSSSSSSS S PPPP PP SS SS S SSS S SSSS

Otros :

H H

FIG. 14E

VP1 VP2

735 598

la estructura de la cápside de AAV-2 termina aquí \

VP1-de AAV-2 : TSNYNKSVNV DFTVDITNGVY SEPRPIGTRY LTRNL
 VP1-de AAV-3B : TSNYNKSVNV DFTVDITNGVY SEPRPIGTRY LTRNL
 VP1-de AAV-6 : TSNYAKSANV DFTVDNNGLY TEPRPIGTRY LTRPL
 VP1-de AAV-1 : TSNYAKSANV DFTVDNNGLY TEPRPIGTRY LTRPL
 VP1-de AAV-8 : TSNYYKSTSV DFAVNTGVI SEPRPIGTRY LTRNL
 VP1-de AAV-4 : TSNYGQNSL LWAPDAAGKY TEPRPIGTRY LTHHL
 VP1-de AAV-5 : TNNYNDPQFV DFAPDSTGEY RTTRPIGTRY LTRPL
 VP1-de AAV caprino : TNNYNDPQFV DFAPDGSGEY RTTRAIGTRY LTRPL

Neutralización : ## #

Accesibilidad : OB000000B OB000000B OB000000B OB000000B BBIIB

Característica superficie : Y YYYPYP Y YPP Y Y YYY Y

ADN : PB
 ADN : R
 Otros : A

FIG. 14H

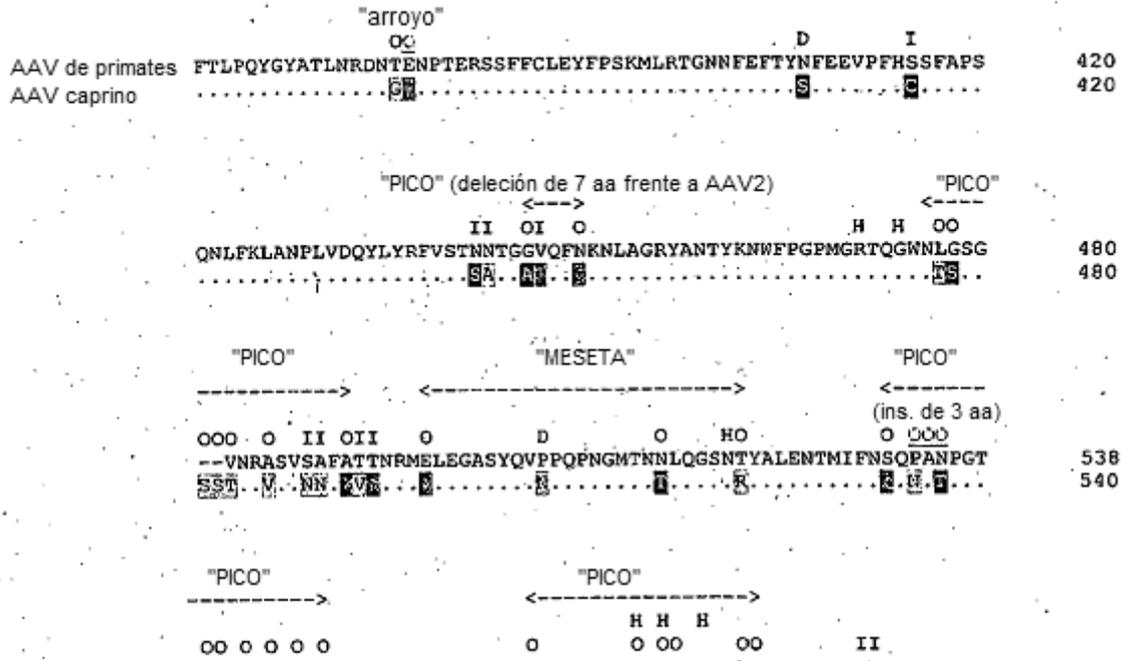


FIG. 15

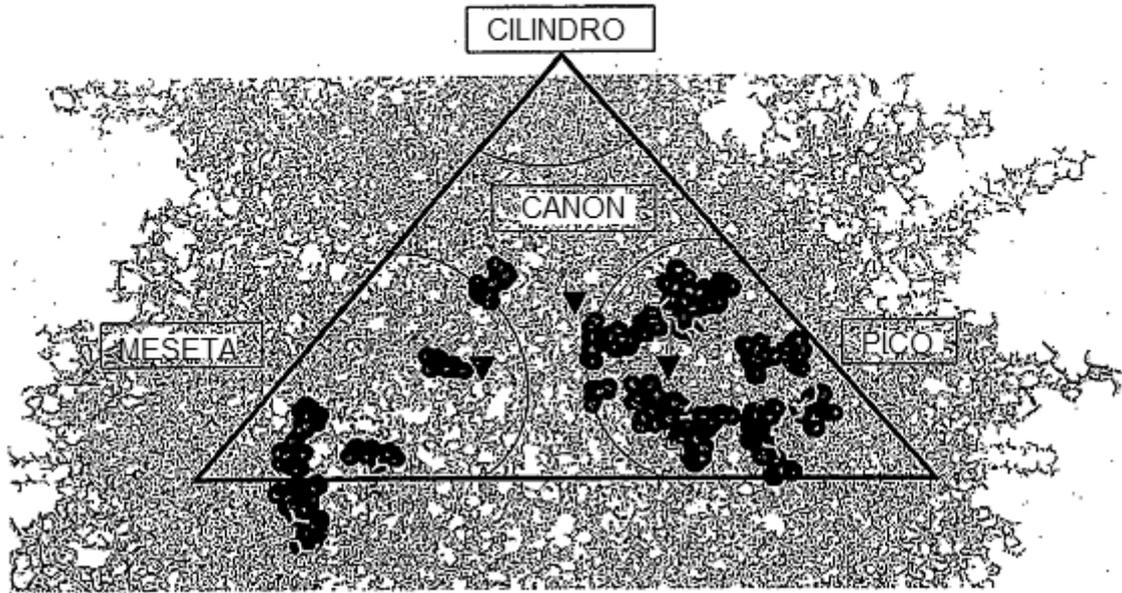


FIG. 16

FIGURA 17

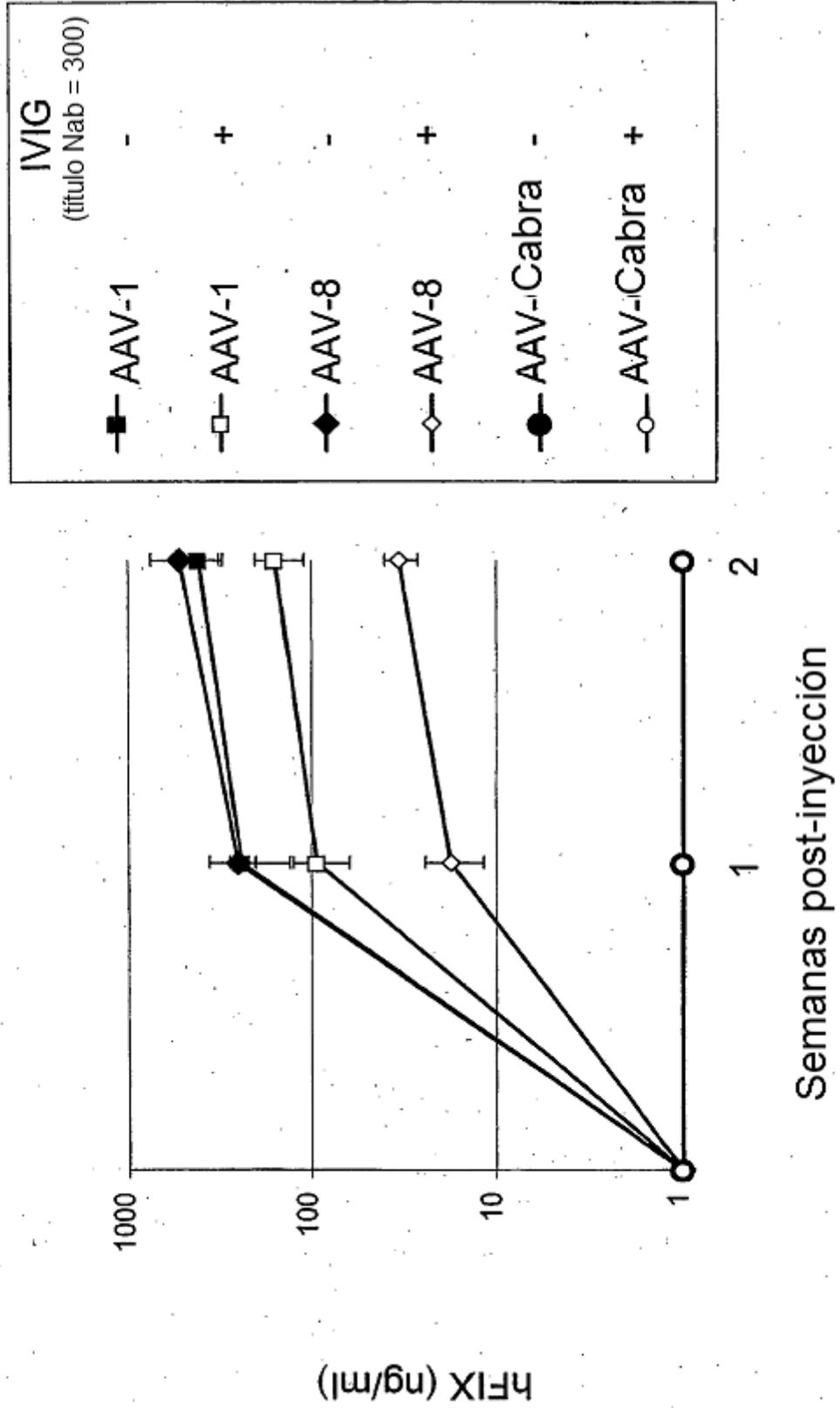


FIGURA 18

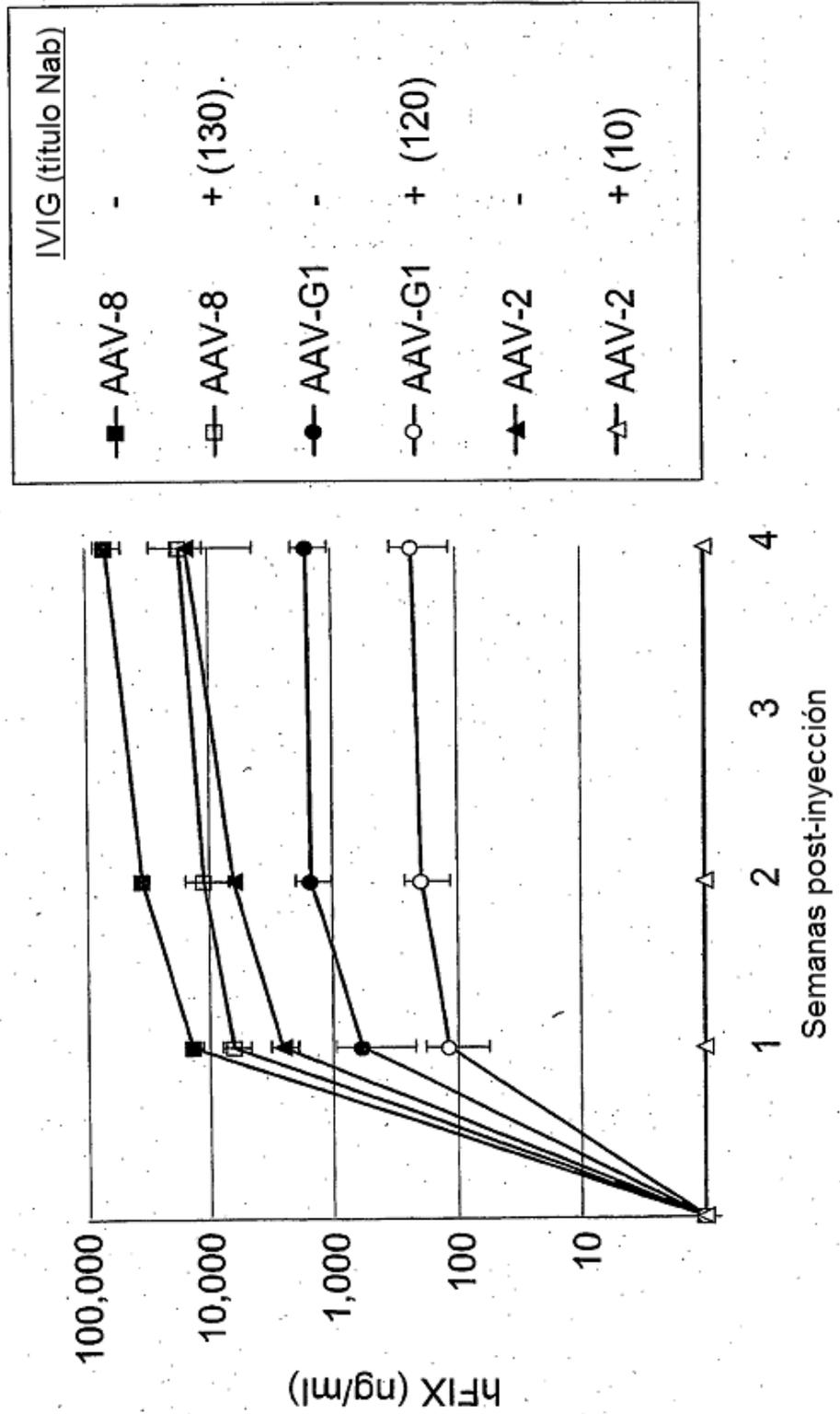
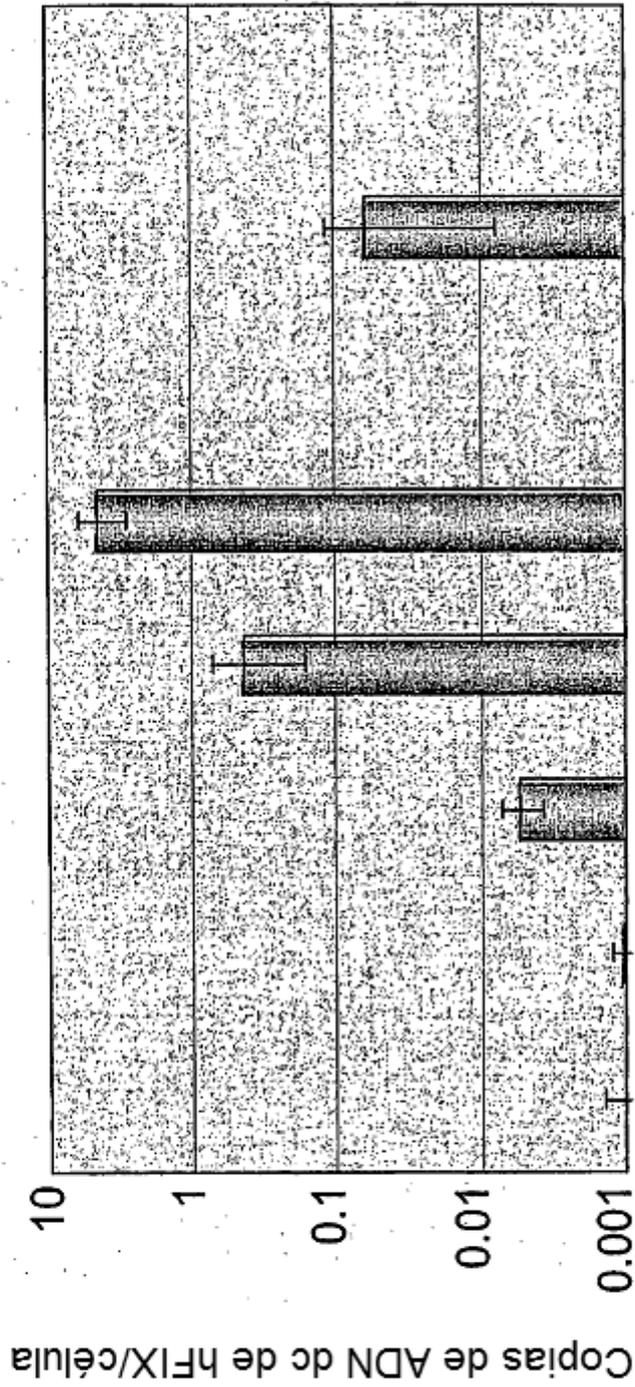


FIGURA 19



AAV-G1 hF.IX (n=2)	0.0008	0.001	0.005	0.43	4.52	< 0.0005	0.060	0.0005
Cerebro								
Corazón								
Riñón								
Hígado								
Pulmón								
Músculo								
Bazo								
Testículos								

ATGTCCTTTTGTGACCACCCTCCAGATTGGTTGGAATCGATCGGGCAGCGCTTTCGTGAATTTCTCGGCCTTGAGGCGGG 80
 TCCCCGAAACCCAAAGGCCAATCAACAGAAGCAAGATAACGCTCGAGGCTTGTGCTTCTGGGTACAAGTATCTTGGTC 160
 CTGGGAACGGCCTTGATAAGGGCGATCCTGTCAATTTTGGCTGACGAGGTTGCCCGAGAGCACGACCTCTCCTACCAGAAA 240
 CAGCTTGAGGGGGGCGATAACCCTTACCTCAAGTACAACCACGGGACGAGAGTTTCAGGAGAACTCGCTTCTGACAC 320
 TTCTTTTGGAGGAACTTGGGAAGGCTGTTTTCCAGGCTAAAAAGAGGATTCTCGAACCTCTTGGCCTGGTTGAGACGC 400
 CGGATAAAACGGCGCCTGCCGCAAAAAAGAGGCCTTAGAGCAGAGTCTCAAGAGCCAGACTCCTCGAGCGGAGTTGGC 480
 AAGAAAGGCCAACAGCCTGCCAGAAAGAGACTCACTTTGACGACGACCTGGAGCCGGAGACGGGCTCCCCAGAAGG 560
 ACCATCTTCCGGAGCTATGTCTACTGAGACTGAAATGCGTGCAGAGCTGGCGGAAATGGTGGCGATGCGGGACAAGGTG 640
 CCGAGGAGTGGGTAATGCCCTCCGGTATTGGCATTGGCATTCCACTTGGTCAGAGAGCCACGTCACCACCACCTCAACC 720
 CGCACCCTGGGTCCTGCCGACCTACAACAACCACCTGTACCTGCGGCTCGGCTCGAGCAACGCCAGCGACACCTTCAACGG 800
 ATTCTCCACCCTGGGGATACTTTGACTTTAACCGCTTCCACTGCCACTTCTCGCCAAGAGACTGGCAAAGGCTCATCA 880
 ACAACCCTGGGGACTGCGCCCCAAAAGCATGCAAGTCCGCATCTTCAACATCCAAGTTAAGGAGGTCACGACGCTTAAC 960
 GGGGAGACGACCGTATCCAACAACCTCACCAGCACGGTCCATATCTTTGCGGACAGCACGTACGAGCTCCCGTACGTGAT 1040
 GGATGCAGGTCAGGAGGGCAGCTTGCCTCCTTTCCCAACGACGTTTCATGGTGCCTCAGTACGGGTACTGCGGACTGG 1120
 TAACCGGAGGCAGCTCTCAAACCAGACAGACAGAAATGCCTTCTACTGTCTGGAGTACTTTCCAGCCAGATGCTGAGA 1200
 ACCGGAACAACCTTTGAGATGGTGTACAAGTTGAAAACGTGCCCTTCCACTCCATGTACGCTCACAGCCAGAGCCTGGA 1280
 TAGGCTGATGAACCCGCTGCTGGACCAGTACCTGTGGAACTCCAGTCTACCACCTCTGGAGGAACTCTCAACCAGGGCA 1360
 ATTCAGCCACCAACTTTGCCAAGCTGACCAACAAAACCTTTTCTGGCTACCGCAAAAACCTGGCTCCCGGGGCCATGATG 1440
 AAGCAGCAGAGATTCTCAAGACTGCCAGTCAAACTACAGATTCCCGAGGAGGAAACAACAGTCTGCTCCATTATGA 1520
 GACCAGAACTACCCTCGACAGAAAGATGGAGCAATTTTGGCCCGGGAACGGCCATGGCAACCCGACGCCAACGACGCCACCG 1600
 ACTTCTCAGGCCAGCTCATCTTTGCGGGGCCAACATACCCGCAACACCACCACAGATGCCAATAATCTGATGTTCT 1680
 ACTTCAGAAGATGAACCTTAGGGCCACCAACCCCGGACACTGACCTGTTGGCCACCTGGCAACCAACCAGCAAAACGC 1760
 CACCACCGTTCCTACCGTAGACGACGTTGGACGGAGTCCGGCTGTACCCGGGAATGGTGTGGCAGGACAGACATTACT 1840
 ACCAAGGGCCCATTTGGGCCAAATTCACACACGGATGGACACTTTCACCCGCTCCTCTCATTGGCGGATTTGGACTG 1920
 AAAAGCCCGCCTCCACAAATATTCATCAAAAACACTCCTGTACCGCCAATCCCGCAACGACCTTCTCTCCGGCCAGAAT 2000
 CAACAGCTTCATCACCCAGTACAGCACCGGACAGGTGGCTGTCAAAATAGAATGGGAAATCCAGAAAGGAGCGGTCACA 2080
 GATGGAACCCAGAGGTCAGTTCACGTCACACTACGGAGCACAGGACTCGCTTCTCTGGGCTCCCGACAACGCCGGAGCC 2160
 TACAAAGAGCCAGGGCCATTGGATCCCGATACCTCACAACCACTCTAG -2211

FIG 20A

MSFVDHPPDWLESIGDGFREFLGLLEAGPPKPKANQQKQDNARGLVLPGYK 50
 YLPGNGLDKGDVNFADDEVAREHDLQSYQKQLEAGDNPYLKYNHADAEFQ 100
 EKLASDTSFGGNLGKAVFQAKKRILEPLGLVETPKDTAPAAKKRPLEQSP 150
 QEPDSSSGVGGKKGQPARKRLNFDDEPGAGDGPPEGPSSGAMSTETEMR 200
 AAAGNGGDAGQGAEGVGNASGDWHCDSTWSESHVTTTSTRFWVLPYNN 250
 HLYLRLGSSNASDTFNGFSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNHWGLR 300
 PKSMQVRIFNIQVKEVTTSNGETTVSNLSTVHIFADSTYELPYVMDAG 350
 QEGSLPFPNDVFMVPOYGYCGLVTGGSSQNQTDRNAFYCLEYFPSQMLR 400
 TGNNFEMVYKFENVPFHSMYAHSQSLDRLMNPLLDQYLWELQSTTSGGTL 450
 NQONSATNFAKLTNKNFSGYRKNWLPMPMMKQRFASKTASQNYKIPQGGN 500
 NSLLHYETRITLDRRWSNFAAGTAMATAANDATDFSQAQLIFAGPNITGN 550
 TTTDANNLMFTSEDEL RATNPRD TDLFGHLATNQONATTVPTVDDVDGVG 600
 VYPGMVWQDRDIYYQGIWAKI PHTDGHFHPSP LIGGFGLKSPPPQIFIK 650
 NTPVPANPATTFSPARINSFITQYSTGQVAVKIEWEIQERSKRWNPEVQ 700
 FTSNYGAQDSLLWAPDNAGAYKEPRAIGSRYLTNHL 736

FIG 20B

VP1 VP2
50

VP1 de AAV-2: MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWVKLKPFP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY
 VP1 de AAV-3B:N..... E..A..... Q..A.....
 VP1 de AAV-6:N..... E..D..... A..K..ANQKQ..G.....
 VP1 de AAV-1:N..... E..D..... A..K..ANQKQ..G.....
 VP1 de AAV-8:N..... E..A..... A..K..ANQKQ..G.....
 VP1 de AAV-4: -T..... V..E..A..Q..A..K..ANQKQ..NA.....
 VP1 de AAV-C1: SFVDHP... S-IGD.F. EFLG.EA... K.KANQKQ..NA.....
 VP1 de AAV-5: SFVDHP... E-VG..L. EFLG.EA... K...NQK.Q.QA.....
 VP1 de AAV-G1: SFVDHP... E-VG..L. EFLG.EA... K...NQK.Q.QA.....

Parvovirus: *

Otros: f

PPPPPPP

VP1 de AAV-2: KYLGPFENGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADAEEF 100
 VP1 de AAV-3B:G..... Q..KA.....
 VP1 de AAV-6:A..... Q..KA.....R.....
 VP1 de AAV-1:A..... Q..KA.....R.....
 VP1 de AAV-8:A..... Q..QA.....R.....
 VP1 de AAV-4:G..... Q..KA.....
 VP1 de AAV-C1:G..... D...F..E.V.R...IS.Q.K.EA.....
 VP1 de AAV-5: N...G...R...R...E.V.R...IS.N.E.EA.....
 VP1 de AAV-G1: N...G...R...R...E.V.R...IS.N.E.EA.....

Parvovirus: *

Otros: ** *

PPPPPPPPPP PPPPPPPPPPP PPPPPPPPPPP PPPPPPPPPPP PPPPPPPPPPP

FIG. 21A

VP1 VP2
350 213

VP1 de AAV-2: NNNWGFPRKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL
 VP1 de AAV-3B:K .S.....
 VP1 de AAV-6:T...V.....S.....
 VP1 de AAV-1:T...V.....S.....
 VP1 de AAV-8:S.....E.K.....I.....
 VP1 de AAV-4:M...A MRV.I.....TSN.E..V.....I.A..S.E.
 VP1 de AAV-C1: H..L...S MQVRI.....TSN.E..VS.....HI.A..T.E.
 VP1 de AAV-5: Y.....RS LRV.I.....VQ.S.....DD.....
 VP1 de AAV-G1: Y.....RS LRV.I.....VQ.S.....DD.....

Parvovirus: * * * * *
 Accesibilidad: IIBIBBIIII IIBIBBBBB OOOOOOOOO OOBIBBBBB BBIIIIIIBB
 Característica superficie: CCCCCCCCCC CC

ADN: B D BB PB D
 Otros: M

VP1 de AAV-2 : PYVLGSAHQG CLPPFPADV MWPQYGLTL N--NGSQ-AVGRS SFYCLEYFPS. 400/263
 VP1 de AAV-3B :I.....
 VP1 de AAV-6 :I.....
 VP1 de AAV-1 :I.....
 VP1 de AAV-8 :I.....
 VP1 de AAV-4 :MDAGQE. S.....N.....CG. VTG.T..QOTD.N A.....
 VP1 de AAV-C1 :MDAGQE. S.....N.....CG. VTG..S.NQTD.N A.....
 VP1 de AAV-5 :V.NGTE. .A..PQ.. TL.....A...RD.TEN-PTE.. .F.....
 VP1 de AAV-G1 :V.NGTE. .A..PQ.. TL.....A...RD..DN-PTE.. .F.....

Parvovirus: * * * * *
 Accesibilidad: BBBBBBBBBB BBBBBBBBBB OBOBBBBBBB O OOOBBBBB BBBBBBBIII
 Característica superficie: Y YY P PPPP AA

FIG. 21D

VP1 VP2
650 513

VP1 de AAV-2: LFGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPFQILIKN
 VP1 de AAV-3B:M.....
 VP1 de AAV-6:
 VP1 de AAV-1:N.....
 VP1 de AAV-8:N.....
 VP1 de AAV-4: V.....I.....F.....
 VP1 de AAV-C1: Y.....I.....S.....F.....
 VP1 de AAV-5: V S ME.....E.GA.....A.....MM.....
 VP1 de AAV-G1: L S ME.....E.GA.....A.....MM.....
 Parvovirus: * * * * *

Accesibilidad:BBBBBIBBO BBBBIBBI IBIIIIIII IBBBBBBII IIIIBBBBBB
 Característica superficie: S
 ADN: P B BB B

VP1 de AAV-2: TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPFIQY 700 563
 VP1 de AAV-3B:P.....
 VP1 de AAV-6:PAE...T.....V.....
 VP1 de AAV-1:PAE...T.....V.....
 VP1 de AAV-8:
 VP1 de AAV-4:A...STPVN...Q.D.I...V.F...
 VP1 de AAV-C1:A...P.RIN...A.K...I...V.F...
 VP1 de AAV-5:G-I.S...DVPVS...T.M...K...
 VP1 de AAV-G1:GN-I.S...DVPVS...T.M...K...
 Parvovirus: * * * * *

Accesibilidad:BBBBBOBBOO OBOOOOOO OOOBBBBBII IIIIIIIIII IIBBBBBBOO
 Característica superficie: YY YYY YY YYYYYY YYY
 ADN: P

FIG. 21G

VP1 VP2

735 598

la estructura de la cápside de AAV-2 termina aquí \

VP1-de AAV-2 : TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL
 VP1-de AAV-3B :
 VP1-de AAV-6 : ...A..A.. N . L . T P .
 VP1-de AAV-1 : ...A..A.. N . L . T P .
 VP1-de AAV-8 : ...Y..TS. A . N . E
 VP1-de AAV-4 : ...GQNSL LWAP . AA . K . T A HH .
 VP1-de AAV-C1 : ...GAQDSL LWAP . NA . A . K A . S NH .
 VP1-de AAV-5 : .N. DPQF. AP . ST . E . RTT P .
 VP1-de AAV-G1 : .N. DPQF. AP . GS . E . RTT . A P .

Neutralización: ## #

Accesibilidad: OB0000000B OBB0000B00 O0000BB00 BBIIB

Característica superficie: Y YYYPYPY Y YPP YY YYYYYY YY

ADN: PB

ADN: R

Otros: A

FIG. 21H