

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 352**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)	<b>C07K 7/06</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)	<b>C07K 7/08</b>	(2006.01)
<b>C12N 7/01</b>	(2006.01)		
<b>C12N 7/04</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/63</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/64</b>	(2006.01)		
<b>C12N 15/864</b>	(2006.01)		
<b>C07H 21/04</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/015</b>	(2006.01)		
<b>C07K 7/04</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2002 PCT/US2002/33630**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2003 WO03052051**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2002 E 02795539 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 1453547**

54 Título: **Secuencias de serotipo 8 de virus adenoasociado (VAA), vectores que las contienen y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**17.12.2001 US 341151 P**  
**01.05.2002 US 377133 P**  
**05.06.2002 US 386122 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.02.2017**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)**  
**3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200**  
**PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**GAO, GUANGPING;**  
**WILSON, JAMES, M. y**  
**ALVIRA, MAURICIO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 602 352 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

Secuencias de serotipo 8 de virus adenoasociado (VAA), vectores que las contienen y usos de las mismas

## 5 Antecedentes de la invención

Un virus adenoasociado (VAA), un miembro de la familia *Parvovirus*, es un pequeño virus icosaédrico, sin envoltura, con genomas de ADN lineal de cadena simple de 4,7 kilobases (kb) a 6 kb. El VAA se asigna al género *Dependovirus*, debido a que el virus fue descubierto como contaminante en poblaciones de adenovirus purificados. El ciclo de vida del VAA incluye una fase latente en la que, después de infección, los genomas de VAA son el sitio específicamente integrado en cromosomas hospedadores, y una fase infecciosa en la que, después de infección ya sea por virus del herpes simple o por adenovirus, los genomas integrados se rescatan, se replican y se empaquetan posteriormente en virus infecciosos. Las propiedades de no patogenicidad, la amplia gama de infectividad de hospedador, incluyendo las células que no se dividen, y la posible integración cromosómica específica del sitio, hacen que el VAA sea una herramienta atractiva para la transferencia de genes.

Recientes estudios sugieren que los vectores de VAA pueden ser el vehículo preferido para el suministro de genes. Hasta ahora, se han aislado 6 serotipos diferentes, y bien caracterizados, de VAA, a partir de primates no humanos (PNH) o humanos. Entre estos, el serotipo 2 humano es el primer VAA que se desarrolló como un vector de transferencia de genes; dicho serotipo se ha utilizado mucho en experimentos eficaces de transferencia de genes en diferentes tejidos y modelos animales diana. Ensayos clínicos de la aplicación experimental de los vectores basados en VAA2 en algunos modelos de enfermedad humana están avanzando, e incluyen enfermedades tales como fibrosis quística y hemofilia B.

Lo que es deseable son construcciones basadas en VAA para el suministro de genes.

## Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona nuevas secuencias de VAA, composiciones que contienen estas secuencias y usos de las mismas. Ventajosamente, estas composiciones son particularmente muy adecuadas para su uso en composiciones que requieren la readministración de VAAr para fines terapéuticos o profilácticos.

Estos y otros aspectos de la invención serán rápidamente obvios a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

## 35 Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A a 1C son las secuencias de ácido nucleico de las regiones rep y cap del VAA8 [SEQ ID NO: 1]. Las Figs. 2A a 2C son las secuencias de aminoácidos de la proteína vp1 de la cápside del VAA8 [SEQ ID NO: 2], proporcionada en alineamiento con la vp1 de las secuencias publicadas del VAA2 [SEQ ID NO: 4], VAA1 [SEQ ID NO: 5] y VAA3 [SEQ ID NO: 6], y los serotipos de VAA recientemente identificados, VAA7 [SEQ ID NO: 8] y VAA9 [SEQ ID NO: 7]. El alineamiento se realizó usando el programa Clustal W, usando el número de VAA2 como referencia. El subrayado y la negrita en la secuencia inferior del alineamiento indican casetes de identidad. Los puntos en el alineamiento indican que faltan aminoácidos en las posiciones en el alineamiento en comparación con la VP1 del VAA2. Las Figs. 3A a 3C son las secuencias de aminoácidos de las proteínas rep del VAA8 [SEQ ID NO: 3].

## Descripción detallada de la invención

La invención proporciona las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de un nuevo serotipo de VAA, el VAA8. También se proporcionan fragmentos definidos de estas secuencias de VAA. Cada uno de estos fragmentos puede utilizarse fácilmente en diversos sistemas de vectores y células hospedadoras. Entre los fragmentos de VAA8 deseables están las proteínas cap, incluyendo la vp1, vp2, vp3 y las regiones híper variables, las proteínas rep, incluyendo rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40 y las secuencias que codifican estas proteínas. Estos fragmentos pueden utilizarse fácilmente en diversos sistemas de vectores y células hospedadoras. Dichos fragmentos pueden usarse solos, en combinación con otras secuencias o fragmentos de VAA8, o en combinación con elementos de otras secuencias víricas de VAA o que no son de VAA. En una realización particularmente deseable, un vector contiene las secuencias de cap y/o rep de VAA8 de la invención.

Las secuencias de VAA8 y fragmentos definidos de las mismas, son útiles en la producción de VAAr, y también son útiles como vectores de suministro antisentido, vectores genoterapéuticos o vectores de vacunas. La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico, vectores de suministro de genes y células hospedadoras que contienen las secuencias de VAA8 de la invención.

Los alineamientos se realizan usando cualquiera de una diversidad de Programas de Alineamiento de Secuencias Múltiples disponibles pública o comercialmente, tal como el programa "Clustal W", accesible a través de Servidores

Web en internet. Como alternativa, también se utilizan los programas utilitarios de Vector NTI. También hay diversos algoritmos conocidos en la técnica que pueden utilizarse para medir la identidad de las secuencias de nucleótidos, incluyendo los contenidos en los programas descritos anteriormente. En otro ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse usando Fasta, un programa en GCG versión 6.1. Fasta proporciona alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de ácido nucleico puede determinarse usando Fasta con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación), como se proporciona en el programa GCG versión 6.1, incorporado por referencia en el presente documento. Para las secuencias de aminoácidos se dispone de programas similares, por ejemplo, el programa "Clustal X". Generalmente, en configuraciones por defecto se utiliza cualquiera de estos programas, aunque si fuera necesario un experto en la técnica puede modificar estas configuraciones. Como alternativa, un experto en la materia puede utilizar otro algoritmo o programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad o alineamiento como lo proporcionan los algoritmos y programas a los que se hace referencia.

La expresión "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se hace referencia a un ácido nucleico, o a un fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea óptimamente con inserciones o deleciones nucleotídicas apropiadas con otro ácido nucleico (o con su cadena complementaria), hay una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente de 95 a 99 % de las secuencias alineadas. Preferentemente, la homología es sobre la secuencia de longitud completa, o sobre una fase de lectura abierta de la misma, o sobre otro fragmento adecuado que tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos. En el presente documento se describen ejemplos de fragmentos adecuados.

La expresión "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se hace referencia a aminoácidos o a fragmentos de los mismos, indica que, cuando se alinea óptimamente con inserciones o deleciones aminoacídicas apropiadas con otros aminoácidos (o con su cadena complementaria), hay una identidad de secuencia de aminoácidos en al menos aproximadamente de 95 a 99 % de las secuencias alineadas. Preferentemente, la homología es sobre la secuencia de longitud completa, o sobre una proteína de la misma, por ejemplo, una proteína cap, una proteína rep, o un fragmento definido de la misma, en el presente documento se describen fragmentos específicos.

Por la expresión "altamente conservada" se entiende una identidad de al menos 80 %, preferentemente una identidad de al menos 90 %, y más preferentemente, una identidad por encima de 97 %. El experto en la materia determina fácilmente la identidad recurriendo a algoritmos y a programas informáticos conocidos por los expertos en la materia.

La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "idéntica" en el contexto de secuencias de ácido nucleico se refiere a los restos que son iguales en las dos secuencias cuando se alinean para obtener una correspondencia máxima. La longitud de la comparación de la identidad de secuencia puede ser sobre la longitud completa del genoma, la longitud completa de una secuencia génica codificante, o si se desea, sobre un fragmento de al menos aproximadamente 500 a 5000 nucleótidos. Sin embargo, también puede desearse una identidad entre fragmentos más pequeños, por ejemplo, de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, normalmente de al menos aproximadamente 20 a 24 nucleótidos, de al menos aproximadamente 28 a 32 nucleótidos, de al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos. La similitud, "porcentaje de identidad de secuencia", puede determinarse fácilmente para secuencias de aminoácidos, sobre la longitud completa de una proteína, o de un fragmento definido de la misma. En el presente documento se describen ejemplos específicos de fragmentos adecuados.

Como se describe en el presente documento, los vectores de la invención que contienen las proteínas de la cápside del VAA de la invención, son particularmente muy adecuados para su uso en aplicaciones en las que los anticuerpos neutralizantes disminuyen la efectividad de otros vectores basados en serotipos del VAA, así como de otros vectores víricos. Los vectores de VAAr de la invención son particularmente ventajosos en la readministración de VAAr y genoterapia repetida.

Estas y otras realizaciones y ventajas de la invención se describen con más detalle más adelante. Como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "que comprende" incluye otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares. Por el contrario, la expresión "que consiste" y sus variantes, excluye otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares.

## I. Secuencias de serotipo 8 de VAA

### A. Secuencias de ácido nucleico

Las secuencias de ácido nucleico de VAA8 de la invención incluyen las secuencias de ADN de la Fig. 1 [SEQ ID NO: 1], que consta de 4393 nucleótidos. Las secuencias de ácido nucleico de VAA8 de la invención abarcan adicionalmente la cadena que es complementaria a la Fig. 1 [SEQ ID NO: 1], así como las secuencias de ARN y ADNc correspondientes a la Fig. 1 [SEQ ID NO: 1] y su cadena complementaria. También se incluyen en las secuencias de ácido nucleico de la invención, variantes naturales y modificaciones diseñadas por ingeniería genética

de la Fig. 1 [SEQ ID NO: 1] y su cadena complementaria. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores que se conocen en la técnica, metilación, y sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un nucleótido degenerado.

5 Adicionalmente en la presente invención se incluyen secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad u homología mayor que aproximadamente 90 %, más preferentemente de al menos 95 %, y lo más preferentemente de al menos aproximadamente 98 a 99 % con la Fig. 1 [SEQ ID NO: 1].

10 En la invención también se incluyen fragmentos definidos de la Fig. 1 [SEQ ID NO: 1], su cadena complementaria, el ADNc y ARN complementario a estos. Los fragmentos adecuados tienen al menos 15 nucleótidos de longitud, e incluyen fragmentos funcionales, es decir, fragmentos que son de interés biológico. Dichos fragmentos incluyen las secuencias que codifican las tres proteínas variables (vp) de la cápside de VAA8 que son variantes de corte y empalme alternativas: la vp1 [nt 2121 a 4337 de la Fig. 1, SEQ ID NO: 1]; la vp2 [nt 2532 a 4337 de la Fig. 1, SEQ ID NO: 1]; y la vp 3 [nt 2730 a 4337 de la Fig. 1, SEQ ID NO: 1]. Otros fragmentos adecuados de la Fig.1 [SEQ ID NO: 1], incluyen el fragmento que contiene el codón de inicio para la proteína de cápside del VAA8 y los fragmentos que codifican las regiones híper variables de la proteína de cápside vp1, que se describen en el presente documento.

15 Otros fragmentos adicionales incluyen los que codifican las proteínas rep, incluyendo *rep* 78 [codón de iniciación localizado en el nt 227 de la Fig. 1, SEQ ID NO: 1], *rep* 68 [codón de iniciación localizado en el nt 227 de la Fig. 1, SEQ ID NO: 1], *rep* 52 [codón de iniciación localizado en el nt 905 de la Fig. 1, SEQ ID NO: 1] y *rep* 40 [codón de iniciación localizado en el nt 905 de la Fig. 1, SEQ ID NO:1]. Otros fragmentos de interés pueden incluir la repetición terminal invertida del VAA8 que puede identificarse mediante los métodos descritos en el presente documento, secuencias P 19 de VAA, secuencias P40 de VAA8, el sitio de unión a rep y el sitio de resolución terminal (SRT). Para los expertos en la materia serán fácilmente obvios otros fragmentos adecuados adicionales.

20 Además de incluir las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en las figuras y en el Listado de Secuencias, la presente invención incluye moléculas de ácido nucleico y secuencias que se diseñan para expresar las secuencias de aminoácidos, proteínas y péptidos de los serotipos de VAA de la invención. Por tanto, la invención incluye secuencias de ácido nucleico que codifican las siguientes secuencias de aminoácidos nuevas de VAA y serotipos de VAA artificiales generados usando estas secuencias y/o fragmentos únicos de las mismas.

25 Como se usa en el presente documento, los serotipos de VAA artificiales incluyen, sin limitación, VAA con una proteína de cápside de origen no natural. Dicha cápside artificial puede generarse mediante cualquier técnica adecuada, usando una secuencia de VAA nueva de la invención (por ejemplo, un fragmento de una proteína de cápside vp1) en combinación con secuencias heterólogas que pueden obtenerse a partir de otro serotipo de VAA (conocido o nuevo), de partes no contiguas del mismo serotipo de VAA, de una fuente vírica que no es de VAA, o de una fuente no vírica. Un serotipo de VAA artificial puede ser, sin limitación, una cápside de VAA quimérica, una cápside de VAA recombinante, o una cápside de VAA "humanizada".

#### 40 B. Secuencias de aminoácidos, Proteínas y Péptidos de VAA8

La invención también proporciona proteínas y fragmentos de las mismas que están codificados por los ácidos nucleicos de VAA8 de la invención, y aminoácidos de VAA8 que se generan por otros métodos. La invención incluye adicionalmente serotipos de VAA generados usando secuencias del nuevo serotipo de VAA de la invención, que se generan usando técnicas sintéticas, recombinantes u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. La invención no está limitada a nuevas secuencias de aminoácidos, péptidos y proteínas de VAA que se expresan a partir de las nuevas secuencias de ácido nucleico de VAA de la invención y abarca secuencias de aminoácidos, péptidos y proteínas que se generan mediante otros métodos conocidos en la materia, incluyendo, por ejemplo, síntesis química, mediante otras técnicas sintéticas o mediante otros métodos. Por ejemplo, las secuencias de cualquiera de pueden generarse fácilmente usando una variedad de técnicas.

Los expertos en la materia conocen bien técnicas de producción adecuadas. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY). Como alternativa, también pueden sintetizarse péptidos mediante los métodos bien conocidos de síntesis peptídica en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1962); Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969) págs. 27-62). Estos y otros métodos de producción adecuados se encuentran dentro del conocimiento del experto en la materia y no son una limitación de la presente invención.

60 Las proteínas particularmente deseables incluyen las proteínas de cápside de VAA, que están codificadas por las secuencias de nucleótidos identificadas anteriormente. La cápside de VAA está compuesta por tres proteínas, la vp1, la vp2 y la vp3, que son variantes de corte y empalme alternativas. La secuencia de longitud completa proporcionada en la figura 2 es la de la vp1. Las proteínas de cápside de VAA8 incluyen la vp1 [aa 1 a 738 de SEQ ID NO: 2], la vp2 [aa 138 a 738 de SEQ ID NO: 2] y la vp3 [aa 204 a 738 de SEQ ID NO: 2] y sus fragmentos funcionales. Otros fragmentos deseables de la proteína de cápside incluyen las regiones constantes y variables, localizadas entre regiones híper variables (HPV). Otros fragmentos deseables de la proteína de cápside incluyen las propias HPV.

Un algoritmo desarrollado para determinar áreas de divergencia de secuencia en VAA2 ha dado lugar a 12 regiones híper variables (RHV) de las cuales 5 solapan o son parte de las cuatro regiones variables previamente descritas [Chiorini *et al.*, J. Virol., 73: 1309-19 (1999); Rutledge *et al.*, J. Virol., 72: 309-319] Usando ese algoritmo y/o las técnicas de alineamiento descritas en el presente documento, se determinan las RHV de los nuevos serotipos de VAA. Por ejemplo, con respecto al número de la vp1 de VAA2 [SEQ ID NO: 4], la RHV se localiza de la siguiente manera: RHV1, aa 146-152; RHV2, aa 182-186; RHV3, aa 262-264; RHV4, aa 381-383; RHV5, aa 450-474; RHV6, aa 490-495; RHV7, aa 500-504; RHV8, aa 514-522; RHV9, aa 534-555; RHV10, aa 581-594; RHV11, aa 658-667 y RHV12, aa 705-719. Usando el alineamiento proporcionado en el presente documento realizado usando el programa Clustal X con parámetros por defecto, o usando otros programas de alineamiento comercial o públicamente disponibles con parámetros por defecto, un experto en la materia puede determinar fácilmente fragmentos correspondientes de las nueva cápsides de VAA de la invención.

Otros fragmentos deseables de la proteína de cápside de VAA8 incluyen los aminoácidos 1 a 184 de SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 199 a 259; los aminoácidos 274 a 446; los aminoácidos 603 a 659; los aminoácidos 670 a 706; los aminoácidos 724 a 736 de SEQ ID NO: 2; los aa 185 - 198; los aa 260-273; los aa 447-477; los aa 495-602; los aa 660-669 y los aa 707-723. Adicionalmente, como ejemplos de otros fragmentos adecuados de cápsides de VAA se incluyen, con respecto a la numeración de VAA2 [SEQ ID NO: 4], los aa 24 - 42, los aa 25 - 28; los aa 81 - 85; los aa 133-165; los aa 134 - 165; los aa 137-143; los aa 154-156; los aa 194-208; los aa 261-274; los aa 262-274; los aa 171-173; los aa 413-417; los aa 449-478; los aa 494-525; los aa 534-571; los aa 581-601; los aa 660-671 y los aa 709-723. Incluso otros fragmentos deseables incluyen, por ejemplo, en VAA7, los aminoácidos 1 a 184 de SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 199 a 259; los aminoácidos 274 a 446; los aminoácidos 603 a 659; los aminoácidos 670 a 706; los aminoácidos 724 a 736; los aa 185 a 198; los aa 260 a 273; los aa 447 a 477; los aa 495 a 602; los aa 660 a 669 y los aa 707 a 723. Usando el alineamiento proporcionado en el presente documento realizado usando el programa Clustal X con parámetros por defecto, o usando otros programas de alineamiento comercial o públicamente disponibles con parámetros por defecto, un experto en la materia puede determinar fácilmente fragmentos correspondientes de las nuevas cápsides de VAA de la invención.

Otras proteínas deseables de VAA8 incluyen las proteínas rep, que incluyen rep68/78 y rep40/52 [localizadas dentro del aa 1 a 625 de SEQ ID NO: 3]. Como fragmentos adecuados de las proteínas rep pueden incluirse el aa 1 a 102; aa 103 a 140; aa 141 a 173; aa 174 a 226; aa 227 a 275; aa 276 a 374; aa 375 a 383; aa 384 a 446; aa 447 a 542; aa 543 a 555; aa 556 a 625, de SEQ ID NO: 3.

Dichos fragmentos pueden producirse de una manera recombinante o mediante otros medios adecuados, por ejemplo, síntesis química.

La invención proporciona adicionalmente otras secuencias de VAA8 que se identifican usando la información de secuencias proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, dadas las secuencias de VAA8 proporcionadas en el presente documento, el VAA8 infeccioso puede aislarse usando tecnología del paseo genómico (*walking genome*) (Siebert *et al.*, 1995, Nucleic Acid Research, 23: 1087-1088, Friezner-Degen *et al.*, 1986, J. Biol. Chem. 261: 6972-6985, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). El paseo genómico es particularmente muy adecuado para identificar y aislar las secuencias adyacentes a las nuevas secuencias identificadas de acuerdo con el método de la invención. Esta técnica es también útil para el aislamiento de repeticiones terminales invertidas (RTI) del nuevo serotipo VAA8, basándose en las nuevas secuencias de cápside y rep del VAA proporcionadas en el presente documento.

Las secuencias, proteínas y fragmentos de la invención pueden producirse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la producción recombinante, la síntesis química, u otros medios sintéticos. Dichos métodos de producción se encuentran dentro del conocimiento del experto en la materia y no son una limitación de la presente invención.

#### IV. Producción de VAAr con cápsides de VAA8

La invención incluye nuevos VAA8 de tipo silvestre, cuyas secuencias carecen de ADN y/o de material celular con estos virus que están asociados en la naturaleza. En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas que utilizan las nuevas secuencias de VAA de la invención, incluyendo fragmentos de las mismas, para la producción de moléculas útiles en el suministro de un gen heterólogo u otras secuencias de ácido nucleico a una célula diana.

En otro aspecto, la presente invención proporciona moléculas que utilizan las secuencias de VAA8 de la invención, incluyendo fragmentos de las mismas, para la producción de vectores víricos útiles en el suministro de un gen heterólogo u otras secuencias de ácido nucleico a una célula diana.

Las moléculas de la invención que contienen secuencias de VAA8 incluyen cualquier elemento genético (vector) que puede suministrarse a una célula hospedadora, por ejemplo, ADN desnudo, un plásmido, fago, transposón, cósmido, episoma, una proteína en un vehículo de suministro no vírico (por ejemplo, un transportador basado en lípidos), virus, etc., que transfieren las secuencias que llevan en su interior. El vector seleccionado puede suministrarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo transfección, electroporación, suministro de liposomas, técnicas

de fusión de membrana, gránulos recubiertos a alta velocidad con ADN, infección vírica y fusión de protoplastos. Los métodos usados para construir cualquier realización de la presente invención son conocidos por expertos en la manipulación de ácido nucleico e incluyen modificación por ingeniería genética, modificación por ingeniería genética recombinante y técnicas sintéticas. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY

En una realización, los vectores de la invención contienen, como mínimo, secuencias que codifican una cápside de VAA8 o un fragmento definido de la misma. En otra realización, los vectores de la invención contienen, como mínimo, secuencias que codifican una proteína *rep* de VAA8 o un fragmento de la misma. Opcionalmente, dichos vectores pueden contener ambas proteínas *cap* y *rep* de VAA. En vectores en los que se proporcionan tanto *rep* como *cap* de VAA, ambas secuencias *cap* de VAA y *rep* de VAA pueden ser de origen VAA8. Como alternativa, la presente invención proporciona vectores en los que las secuencias *rep* son de un serotipo de VAA que difiere de los que proporcionan las secuencias *cap*. En una realización, las secuencias *rep* y *cap* se expresan a partir de fuentes distintas (por ejemplo, vectores, o una célula hospedadora y un vector distintos). En otra realización, estas secuencias *rep* se fusionan en fase con secuencias *cap* de un serotipo de VAA diferente para formar un vector de VAA quimérico. Opcionalmente, los vectores de la invención contienen adicionalmente un minigen que comprende un transgén seleccionado que está flanqueado por una RTI de VAA en 5' y una RTI de VAA en 3'.

Por tanto, en una realización, los vectores descritos en el presente documento contienen secuencias de ácido nucleico que codifican una cápside de VAA intacta que puede ser de un solo serotipo de VAA (por ejemplo, VAA8). Dicha cápside puede comprender los aminoácidos 1 a 738 de SEQ ID NO: 2. Como alternativa, estos vectores contienen secuencias que codifican una proteína de cápside que comprende una o más de las regiones de cápside de VAA28 seleccionadas de la *vp2* y/o *vp3*, o de la *vp1*, de SEQ ID NO: 2. En otro ejemplo, puede ser deseable modificar el codón de inicio de la proteína *vp3* por GTG. Como alternativa, el VAAr puede contener una o más de las regiones hiper variables de la proteína de cápside de serotipo 8 de VAA que se identifican en el presente documento, incluyendo, aa 185 - 198; aa 260-273; aa 447-477; aa 495-602; aa 660-669; y aa 707-723 de la cápside de VAA8. Véase, la SEQ ID NO: 2. Estas modificaciones pueden hacerse para aumentar la expresión, el rendimiento y/o mejorar la purificación en los sistemas de expresión seleccionados, o para otro fin deseado (por ejemplo, cambiar el tropismo o modificar epítomos de anticuerpos neutralizantes).

Los vectores descritos en el presente documento, por ejemplo, un plásmido, son útiles para diversos propósitos, pero son particularmente muy adecuados para su uso en la producción de un VAAr que contiene una cápside que comprende secuencias de VAA o un fragmento de las mismas. Estos vectores, incluyendo VAAr, sus elementos, construcción y usos se describen con detalle en el presente documento.

En un aspecto, la invención proporciona un método de generación de un virus adenoasociado (VAA) recombinante que tiene una cápside de serotipo 8 de VAA, o una parte de la misma. Dicho método implica cultivar una célula hospedadora que contenga una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína de cápside de serotipo 8 de virus adenoasociado (VAA), o fragmento del mismo, como se define en el presente documento; un gen de *rep* funcional; un minigen compuesto de, como mínimo, repeticiones terminales invertidas (RTI) de VAA y un transgén; y funciones auxiliares suficientes para permitir el empaquetado del minigen en la proteína de cápside de VAA8.

Los componentes necesarios para cultivar en la célula hospedadora para empaquetar un minigen de VAA en una cápside de VAA pueden proporcionarse a la célula hospedadora en *trans*. Como alternativa, uno cualquiera o más de los componentes necesarios (por ejemplo, minigen, secuencias *rep*, secuencias *cap* y/o funciones auxiliares) pueden proporcionarse mediante una célula hospedadora estable que se ha modificado por ingeniería genética para contener uno o más de los componentes necesarios usando métodos conocidos por los expertos en la materia. Más adecuadamente, dicha célula hospedadora estable contendrá uno o más componentes necesarios bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, el componente, o los componentes necesarios, pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo. En el presente documento se proporcionan ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados en la exposición de elementos reguladores adecuados para su uso con el transgén. En otra alternativa más, una célula hospedadora estable seleccionada puede contener uno o más componentes seleccionados bajo el control de un promotor constitutivo u otro componente, o componentes, seleccionados bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, puede generarse una célula hospedadora estable que derive de células 293 (que contenga funciones auxiliares E1 bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contiene las proteínas *rep* y/o *cap* bajo el control de promotores inducibles. Un experto en la técnica puede generar incluso otras células hospedadoras estables.

El minigen, las secuencias *rep*, las secuencias *cap*, y las funciones auxiliares necesarias para la producción del VAAr de la invención, pueden suministrarse a la célula hospedadora de empaquetado en forma de cualquier elemento genético que transfiera las secuencias que el mismo porta. El elemento genético seleccionado puede suministrarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo los descritos en el presente documento. Los expertos en manipulación de ácido nucleico conocen métodos que se utilizan para construir cualquier realización de la presente invención e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas sintéticas. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. De manera similar, los métodos de generación de viriones de VAAr son muy conocidos y la selección de un

método adecuado no constituye ninguna limitación de la presente invención. Véase, por ejemplo, K. Fisher *et al*, J. Virol., 70: 520-532 (1993) y la Patente de Estados Unidos 5.478.745.

A menos que se especifique otra cosa, las RTI de VAA, y otros componentes de VAA seleccionados descritos en el presente documento, pueden seleccionarse fácilmente a partir de cualquier serotipo de VAA, incluyendo, sin limitación, los VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA9 y el nuevo serotipo de la invención, el VAA8. Estas RTI u otros componentes de VAA pueden aislarse fácilmente usando técnicas disponibles para los expertos en la materia a partir de un serotipo de VAA. Dicho VAA puede aislarse u obtenerse de fuentes académicas, comerciales o públicas (por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA). Como alternativa, las secuencias de VAA pueden obtenerse a través de medios sintéticos o de otros medios adecuados en referencia a secuencias publicadas, tales como las disponibles en la bibliografía o en bases de datos tales como, por ejemplo, GenBank, PubMed, o similares.

#### A. El minigen

El minigén está compuesto, como mínimo, por un transgén y sus secuencias reguladoras, y por repeticiones terminales invertidas (RTI) 5' y 3' de VAA. En una realización deseable, se usan las RTI del serotipo 2 de VAA. Sin embargo, pueden seleccionarse RTI de otros serotipos adecuados. Este minigén es el que se empaqueta en una proteína de cápside y se suministra a una célula hospedadora seleccionada.

##### 1. El transgén

El transgén es una secuencia de ácido nucleico, heteróloga respecto a las secuencias de vector que flanquean el transgén que codifica un polipéptido, una proteína u otro producto de interés. La secuencia codificante de ácido nucleico está unida operativamente a componentes reguladores de una manera tal que permite la transcripción, traducción y/o expresión de transgén en una célula hospedadora.

La composición de la secuencia transgénica dependerá del uso que deba darse al vector resultante. Por ejemplo, un tipo de secuencia transgénica incluye una secuencia indicadora, que con su expresión produce una señal detectable. Dichas secuencias indicadoras incluyen, sin limitación, secuencias de ADN que codifican  $\beta$ -lactamasa,  $\beta$ -galactosidasa (LacZ), fosfatasa alcalina, timidina quinasa, proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, proteínas unidas por membrana incluyendo, por ejemplo, CD2, CD4, CD8, la proteína de hemaglutinina de la gripe y otras bien conocidas en la técnica, respecto a las que pueden existir o producirse anticuerpos de alta afinidad dirigidos a las mismas con medios convencionales, y proteínas de fusión que comprenden una proteína unida por membrana fusionada apropiadamente con un dominio de etiqueta de antígeno precedente, entre otros, de hemaglutinina o de Myc.

Estas secuencias codificantes, cuando se asocian a elementos reguladores que activan su expresión, proporcionan señales detectables por medios convencionales, incluyendo ensayos enzimáticos, radiográficos, colorimétricos, de fluorescencia u otros espectrográficos, ensayos de clasificación de célula activada por fluorescencia y ensayos inmunológicos, incluyendo el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la inmunohistoquímica. Por ejemplo, cuando la secuencia marcadora es el gen LacZ, la presencia del vector portador de la señal se detecta mediante ensayos con respecto a la actividad de la beta-galactosidasa. Cuando el transgén es la proteína verde fluorescente o la luciferasa, el vector portador de la señal puede medirse visualmente en un luminómetro mediante la producción de color o de luz.

Sin embargo, deseablemente, el transgén es una secuencia no marcadora que codifica un producto que es útil en biología y medicina, tales como proteínas, péptidos, ARN, enzimas, o ARN catalíticos. Las moléculas de ARN deseables incluyen ARNt, ARNbc, ARN ribosómico, ARN catalíticos y ARN antisentido. Un ejemplo de una secuencia de ARN útil es una secuencia que extingue la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana en el animal tratado.

El transgén puede usarse para corregir o mejorar insuficiencias génicas, que pueden incluir insuficiencias en las que los genes normales se expresan a niveles menores que los normales o insuficiencias en las que el producto génico funcional no se expresa. Un tipo preferido de secuencia transgénica codifica una proteína terapéutica o un polipéptido que se expresa en una célula hospedadora. La invención también incluye el uso de múltiples transgenes, por ejemplo, para corregir o mejorar un defecto génico causado por una proteína multi-subunidad. En determinadas situaciones, puede usarse un transgén diferente para codificar cada subunidad de una proteína, o codificar diferentes péptidos o proteínas. Esto es deseable cuando el tamaño del ADN que codifica la subunidad de la proteína es grande, por ejemplo, para una inmunoglobulina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas o una proteína de distrofina. Para que la célula produzca la proteína multi-subunidad, una célula se infecta con el virus recombinante que contiene cada una de las diferentes subunidades. Como alternativa, las diferentes subunidades de una proteína pueden codificarse con el mismo transgén. En este caso, un solo transgén incluye el ADN que codifica cada una de las subunidades, estando el ADN para cada subunidad separado mediante un sitio de entrada de ribozima interna (IRES). Esto es deseable cuando el tamaño del ADN que codifica cada una de las subunidades es pequeño, por ejemplo el tamaño total del ADN que codifica las subunidades y los IRES es menor de cinco

kilobases. Como una alternativa a un IRES, el ADN puede separarse mediante secuencias que codifican un péptido 2A, que se autoescinde en un evento postraducciona. Véase, por ejemplo, M.L. Donnelly, *et al*, J. Gen. Virol., 78(Pt 1): 13-21 (enero 1997); Furler, S., *et al*, Gene Ther., 8(11): 864-873 (junio de 2001); Klump H., *et al*, Gene Ther., 8(10): 811-817 (mayo 2001). Este péptido 2A es significativamente más pequeño que un IRES, lo que hace que sea muy adecuado para su uso cuando el espacio es un factor limitante. Sin embargo, el transgén seleccionado puede codificar cualquier producto biológicamente activo, u otro producto, por ejemplo, un producto deseable para su estudio.

Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente transgenes adecuados. La selección del transgén no se considera una limitación de la presente invención.

## 2. Elementos reguladores

Adicionalmente a los elementos principales identificados anteriormente para el minigén, el vector incluye también elementos de control convencionales que están unidos operativamente al transgén de una manera que permiten su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con el vector de plásmido o infectada con el virus producido por la invención. Según se utiliza en la presente memoria, secuencias "unidas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de interés como secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés.

Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de transcripción, iniciación, promotoras y potenciadoras apropiadas; señales de procesamiento eficiente de ARN tal como señales de corte y empalme y poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, secuencias consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. En la técnica se conoce y puede utilizarse un gran número de secuencias de control de expresión, incluyendo las promotoras que son naturales, constitutivas, inducibles y/o específicas del tejido.

Como ejemplos de promotores constitutivos se incluyen, sin limitación, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador de RSV), el promotor de citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador de CMV) [véase, por ejemplo, Boshart *et al.*, Célula, 41: 521-530 (1985)], el promotor SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de  $\beta$ -actina, el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK), y el promotor de EF1 [Invitrogen]. Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden regularse mediante compuestos suministrados exógenamente, mediante factores ambientales tales como la temperatura, o por la presencia de un estado fisiológico específico, como por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o en células replicantes solamente. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles a partir de una diversidad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas y un experto en la materia puede seleccionarlos fácilmente. Como ejemplos de promotores inducibles regulados por compuestos suministrados exógenamente se incluyen el promotor de metalotioneína (MT) de oveja inducible por zinc, el promotor del virus de tumor de mama de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de polimerasa T7 [publicación de Patente Internacional núm. WO 98/10088]; el promotor de insecto de ecdisoma [No *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351 (1996)], el sistema reprimible por tetraciclina [Gossen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)], el sistema inducible por tetraciclina [Gossen *et al.*, Ciencia, 268: 1766-1769 (1995), véase también Harvey *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 512-518 (1998)], el sistema inducible por RU486 [Wang *et al.*, Nat. Biotech., 15: 239243 (1997) y Wang *et al.*, Gene Ther., 4: 432-441 (1997)] y el sistema inducible por rapamicina [Magari *et al.*, J. Clin. Invest., 100: 2865-2872 (1997)]. Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que se regulan mediante un estado fisiológico específico, por ejemplo, la temperatura, una fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o en células replicantes solamente.

En otra realización, se utilizará el promotor natural para el transgén. El promotor natural puede ser el preferido cuando se desea que la expresión del transgén mimetice la expresión natural. El promotor natural puede usarse cuando la expresión del transgén debe regularse temporalmente o durante el desarrollo, o de una manera específica del tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una realización adicional, se pueden usar también otros elementos naturales de control de expresión, tal como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak, para mimetizar la expresión natural.

Otra realización del transgén incluye un gen unido operativamente a un promotor específico del tejido. Por ejemplo, si se desea expresión en el músculo esquelético, se deberá usar un promotor activo en el músculo. Esto incluye los promotores procedentes de genes que codifican la  $\beta$ -actina esquelética, la cadena ligera 2A de miosina, la distrofina, la creatina quinasa de músculo, así como promotores de músculo sintéticos con actividades más altas que las de los promotores que se producen de forma natural (véase Li *et al.*, Nat. Biotech. 17: 241-245 (1999)). Ejemplos de promotores que son específicos del tejido son conocidos para el hígado (albúmina, Miyatake *et al.*, J. Virol., 71: 5124-32 (1997); promotor de núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig *et al.*, Gene Ther., 3: 1002-9 (1996); alfafetoproteína (AFP), Arbunthnot *et al.*, Hum. Gene Ther., 7: 1503-14 (1996)), osteocalcina ósea (Stein *et al.*, Mol. Biol. Rep., 24: 185-96 (1997)); sialoproteína ósea (Chen *et al.*, J. Bone Miner. Res., 11: 654-64 (1996)), linfocitos

(CD2, Hansal et al., J. Immunol., 161: 1063-8 (1998); cadena pesada de inmunoglobulina; cadena receptora de célula T), promotor neuronal tal como promotor de enolasa específica de neurona (NSE) (Andersen et al., Cell Mol. Neurobiol., 13: 503-15 (1993)), gen de cadena ligera de neurofilamento (Piccoli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 5611-5 (1991)), y el gen *vgf* específico de neurona (Piccoli et al., Neuron, 15: 373-84 (1995)), entre otros.

Opcionalmente, los plásmidos portadores de transgenes terapéuticamente útiles pueden incluir también genes marcadores o indicadores seleccionables que pueden incluir secuencias que codifican resistencia a geneticina, higromicina o puromicina, entre otros. Dichos genes marcadores o indicadores seleccionables (situados preferentemente fuera del genoma vírico que va a rescatarse mediante el método de la invención) pueden usarse para indicar la presencia de los plásmidos en las células bacterianas, tal como por resistencia a la ampicilina. Otros componentes del plásmido pueden incluir un origen de replicación. La selección de estos y otros promotores y elementos de vector, se hace de manera convencional y muchas de esas secuencias están disponibles [véase, por ejemplo, Sambrook et al., y las referencias citadas en la misma].

La combinación del transgén, de promotor/potenciador, y de las RTI 3' y 5', se menciona como "minigén" por facilidad de referencia en la presente memoria. Siempre según las enseñanzas de esta invención, el diseño de tal minigén puede hacerse recurriendo a técnicas convencionales.

### 3. Suministro del minigén a una célula hospedadora de empaquetado

El minigén puede ser portado sobre cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, que se suministre a una célula hospedadora. Los plásmidos útiles en la presente invención pueden estar diseñados de tal modo que sean adecuados para replicación y, opcionalmente, para la integración en células procariotas, en células de mamíferos, o en ambas. Estos plásmidos (u otros vectores portadores de la RTI 5' de VAA – molécula heteróloga – RTI 3' de VAA) contienen secuencias que permiten la replicación del minigén en marcadores eucariotas y/o procariotas y de selección para esos sistemas. Los genes marcadores o indicadores seleccionables pueden incluir secuencias que codifican la resistencia a la geneticina, a la higromicina o a la puromicina, entre otras. Los plásmidos pueden contener también ciertos genes indicadores o marcadores seleccionables que pueden usarse para indicar la presencia del vector en células bacterianas, tal como por resistencia a ampicilina. Otros componentes del plásmido pueden incluir un origen de replicación y un amplicón, tal como el sistema de amplicón que emplea el antígeno nuclear del virus de Epstein Barr. Este sistema de amplicón, u otros componentes de amplicón similares, permiten una replicación episómica de alta copia en las células. Preferentemente, la molécula que porta el minigén se transfecta en la célula, donde puede existir de manera transitoria. Como alternativa, el minigén (que porta la RTI 5' de VAA – molécula heteróloga – RTI 3' de VAA), puede estar integrado de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, ya sea cromosómicamente o como un episoma. En algunas realizaciones, el minigén puede estar presente en múltiples copias, opcionalmente en concatámeros de cabeza con cabeza, cabeza con cola, o cola con cola. Las técnicas de transfección adecuadas son conocidas y pueden utilizarse fácilmente para suministrar el minigén a la célula hospedadora.

En general, cuando el vector que comprende el minigén se suministra por transfección, el vector se suministra en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg de ADN, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg de ADN, en aproximadamente  $1 \times 10^4$  células a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  células, o en aproximadamente  $1 \times 10^5$  células. Sin embargo, las cantidades relativas de ADN de vector en células hospedadoras puede ajustarse a un experto en la materia, teniendo en cuenta factores tales como el vector seleccionado, el método de suministro y las células hospedadoras seleccionadas.

#### B. Secuencias rep y cap

Además del minigén, la célula hospedadora contiene las secuencias que activan la expresión de la proteína de cápside de VAA8 (o una proteína de cápside que comprende un fragmento de la cápside de VAA8) en la célula hospedadora y secuencias rep del mismo serotipo que el serotipo de las RTI de VAA encontradas en el minigén, o de un serotipo de complementación cruzada. Las secuencias cap y rep de VAA pueden obtenerse, de forma independiente, a partir de una fuente de VAA según se ha descrito anteriormente, y pueden introducirse en la célula hospedadora de cualquier manera conocida por un experto en la materia, según se ha descrito anteriormente. Adicionalmente, cuando se seudotipifica un vector de VAA en una cápside de VAA9, las secuencias que codifican cada una de las proteínas rep esenciales pueden suministrarse mediante VAA 8, o las secuencias que codifican las proteínas rep pueden suministrarse por diferentes serotipos de VAA, por ejemplo, VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9). Por ejemplo, las secuencias rep78/68 pueden proceder del VAA2, mientras que las secuencias rep52/40 pueden proceder del VAA8.

En una realización, la célula hospedadora contiene de forma estable la proteína de cápside bajo el control de un promotor adecuado, tal como los que se han descrito con anterioridad. Más deseablemente, en esta realización, la proteína de cápside se expresa bajo el control de un promotor inducible. En otra realización, la proteína de cápside se suministra a la célula hospedadora en *trans*. Cuando se suministra a la célula hospedadora en *trans*, la proteína de cápside puede suministrarse por medio de un plásmido que contiene las secuencias necesarias para dirigir la expresión de la proteína de cápside seleccionada en la célula hospedadora. Más deseablemente, cuando se

suministra a la célula hospedadora en *trans*, el plásmido que porta la proteína de cápside porta también otras secuencias necesarias para empaquetar el VAAr, por ejemplo, las secuencias *rep*.

En otra realización, la célula hospedadora contiene de forma estable las secuencias *rep* bajo el control de un promotor adecuado, tal como los que se han descrito anteriormente. De manera más deseable, en esta realización, las proteínas *rep* esenciales se expresan bajo el control de un promotor inducible. En otra realización, las proteínas *rep* se suministran a la célula hospedadora en *trans*. Cuando se suministran a la célula hospedadora en *trans*, las proteínas *rep* pueden suministrarse por medio de un plásmido que contiene las secuencias necesarias para dirigir la expresión de las proteínas *rep* seleccionadas en la célula hospedadora. Más deseablemente, cuando se suministran a la célula hospedadora en *trans*, el plásmido que porta la proteína de cápside porta también otras secuencias necesarias para empaquetar el VAAr, por ejemplo, las secuencias *rep* y *cap*.

Por tanto, en una realización, las secuencias *rep* y *cap* pueden transfectarse en la célula hospedadora en una sola molécula de ácido nucleico y existir de manera estable en las células como un episoma. En otra realización, las secuencias *rep* y *cap* están integradas de manera estable en el cromosoma de la célula. Otra realización tiene las secuencias *rep* y *cap* expresadas de manera transitoria en la célula hospedadora. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico útil para dicha transfección comprende, desde el extremo 5' al extremo 3', un promotor, un espaciador opcional intercalado entre el promotor y el sitio de inicio de la secuencia del gen *rep*, una secuencia del gen *rep* de VAA, y una secuencia del gen *cap* de VAA.

Opcionalmente, las secuencias *rep* y/o *cap* pueden suministrarse en un vector que contiene otras secuencias de ADN que van a introducirse en las células hospedadoras. Por ejemplo, el vector puede contener la construcción de VAAr que comprende el minigén. El vector puede comprender uno o más de los genes que codifican las funciones auxiliares, por ejemplo, las proteínas adenovíricas E1, E2a y E4 ORF6, y el gen para ARN de VAI.

Con preferencia, el promotor utilizado en esta construcción puede ser cualquiera de los promotores constitutivos, inducibles o naturales conocidos por el experto en la materia o según se ha expuesto anteriormente. En una realización, se emplea una secuencia de promotor P5 de VAA. La selección del VAA para proporcionar cualquiera de esas secuencias no constituye una limitación de la invención.

En otra realización preferida, el promotor para *rep* es un promotor inducible, tal como los que se han expuesto anteriormente en relación con los elementos reguladores de transgén. Un promotor preferido para expresión de *rep* es el promotor de T7. El vector que comprende el gen *rep* regulado por el promotor de T7 y el gen *cap*, se transfecta o transforma en una célula que expresa, ya sea de manera constitutiva o ya sea de manera inducible, la polimerasa de T7. Véase el documento WO 98/10099, publicado el 12 de Marzo de 1998.

El espaciador es un elemento opcional en el diseño del vector. El espaciador es una secuencia de ADN intercalada entre el promotor y el sitio de inicio ATG de gen *rep*. El espaciador puede tener cualquier diseño deseado; es decir, puede ser una secuencia aleatoria de nucleótidos, o como alternativa, puede codificar un producto de gen, tal como un gen marcador. El espaciador puede contener genes que incorporen típicamente sitios de inicio/terminación y poliA. El espaciador puede ser una secuencia de ADN no codificante, procedente de una procarionota o eucariota, una secuencia no codificante repetitiva, una secuencia codificante sin controles transcripcionales, o una secuencia codificante con controles transcripcionales. Dos ejemplos de fuentes de secuencias espaciadoras son las secuencias escalera de fago o las secuencias escalera de levadura, que están disponibles en el comercio, por ejemplo, en Gibco o Invitrogen, entre otros. El espaciador puede tener un tamaño cualquiera suficiente para reducir la expresión de los productos génicos *rep78* y *rep68*, dejando los productos génicos *rep52*, *rep40* y *cap* expresados a niveles normales. La longitud del espaciador puede variar, por lo tanto, de aproximadamente 10 pb a aproximadamente 10,0 kpb, con preferencia en el intervalo de aproximadamente 100 pb a aproximadamente 8,0 kbp. Para reducir la posibilidad de recombinación, el espaciador tiene preferentemente una longitud menor de 2 kbp; sin embargo, la invención no está limitada por ello.

Aunque la(s) molécula(s) que proporciona(n) *rep* y *cap* pueden existir en la célula hospedadora de manera transitoria (es decir, mediante transfección), se prefiere que una o ambas proteínas *rep* y *cap* y el (los) promotor(es) que controla(n) su expresión esté(n) expresado(s) de forma estable en la célula hospedadora, por ejemplo, como un episoma o mediante integración en el cromosoma de la célula hospedadora. Los métodos empleados para construir las realizaciones de esta invención son técnicas convencionales de ingeniería genética o de ingeniería recombinante tales como las descritas en las referencias anteriores. Mientras que esta memoria descriptiva proporciona ejemplos ilustrativos de construcciones específicas, usando la información proporcionada en la presente memoria, un experto en la materia puede seleccionar y diseñar otras construcciones adecuadas, usando una elección de espaciadores, promotores P5 y otros elementos, incluyendo al menos una señal de inicio y terminación de la traducción, y la adición opcional de sitios de poliadenilación.

En otra realización de la presente invención, una célula hospedadora puede proporcionar la proteína *rep* o *cap* de forma estable.

C. Las funciones auxiliares

La célula hospedadora de empaquetado también necesita funciones auxiliares para empaquetar el VAAr de la invención. Opcionalmente, esas funciones puede suministrarlas un herpesvirus. Más deseablemente, las funciones auxiliares necesarias se proporcionan, cada una de ellas, a partir de una fuente de adenovirus de primate humano o no humano, tal como las que se han descrito con anterioridad y/o están disponibles a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo la colección americana de cultivos tipo (ATCC), Manassas, VA (US). En una realización normalmente preferida, la célula hospedadora se ha dotado de, y/o contiene, un producto de gen E1a, un producto de gen E1b, un producto de gen E2a, y/o un producto de gen E4 ORF6. La célula hospedadora puede contener otros genes adenovíricos tal como ARN de VAI, pero esos genes no se necesitan. En una realización preferida, no hay ningún otro gen de adenovirus o funciones de gen presentes en la célula hospedadora.

Por "ADN adenovírico que expresa el producto de gen E1a", se entiende cualquier secuencia de adenovirus que codifique E1a o cualquier porción de E1a funcional. El ADN adenovírico que expresa el producto de gen E2a y el ADN adenovírico que expresa los productos génicos E4 ORF6 se definen de forma similar. También se incluye cualquiera de los alelos u otras modificaciones del gen adenovírico o de la porción funcional del mismo. Tales modificaciones pueden introducirse deliberadamente recurriendo a técnicas mutagénicas o de ingeniería genética convencionales para potenciar la función adenovírica de alguna manera, así como las variantes alélicas de las mismas que se producen de forma natural. Los expertos en la materia conocen dichas modificaciones y métodos para manipular ADN para conseguir esas funciones de gen de adenovirus.

Los productos génicos E1a, E1b, E2a y/o E4ORF6 de adenovirus, así como cualquiera de otras funciones auxiliares deseadas, pueden proporcionarse usando cualesquier medio que permita su expresión en una célula. Cada una de las secuencias que codifican esos productos puede estar en un vector distinto, o uno o más genes pueden estar en el mismo vector. El vector puede ser cualquier vector conocido en la técnica o desvelado anteriormente, incluyendo los plásmidos, cósmidos y virus. La introducción del vector en la célula hospedadora puede realizarse con cualquier medio conocido en la técnica o desvelado anteriormente, incluyendo transfección, infección, electroporación, suministro de liposoma, técnicas de fusión de membrana, gránulos recubiertos de ADN a alta velocidad, infección vírica y fusión de protoplasto, entre otros. Uno o más de los genes adenovíricos pueden estar integrados de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, expresados de forma estable como episomas, o expresados de forma transitoria. Todos los productos génicos pueden estar expresados de forma transitoria, en un episoma o integrados de forma estable, o algunos de los productos génicos pueden estar expresados de forma estable mientras otros están expresados de forma transitoria. Además, el promotor para cada uno de los genes adenovíricos puede seleccionarse independientemente a partir de un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor adenovírico natural. Los promotores pueden estar regulados por un estado fisiológico específico del organismo o de la célula (es decir, por el estado de diferenciación o en células replicantes o quiescentes) o por factores añadidos exógenamente, por ejemplo.

D. Células hospedadoras y líneas de células de empaquetado

La propia célula hospedadora puede seleccionarse a partir de cualquier organismo biológico, incluyendo las células procariontas (por ejemplo, bacterianas) y células eucariotas, incluyendo células de insecto, células de levadura y células de mamífero. Las células hospedadoras particularmente deseables se seleccionan de entre cualquier especie de mamífero, incluyendo, sin limitación células tales como A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, BHK, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, WI38, HeLa, células 293 (que expresan E1 adenovírico funcional), Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2, y fibroblasto primario, hepatocito y células de mioblastos derivadas de mamíferos incluyendo el ser humano, el mono, el ratón, la rata, el conejo y el hámster. La selección de la especie de mamífero que proporcionan las células no es una limitación de la presente invención, ni lo es el tipo de célula de mamífero, es decir, fibroblasto, hepatocito, célula de tumor, etc. Los requisitos para la célula utilizada son que no porte ningún gen de adenovirus distinto de E1, E2a y/o E4 ORF6; que no contenga ningún otro gen de virus que pudiera dar como resultado la recombinación homóloga de un virus contaminante durante la producción de VAAr; y que sea capaz de infección o transfección de ADN y de expresión del ADN transfectado. En una realización preferida, la célula hospedadora es una que tiene *rep* y *cap* transfectadas de manera estable en la célula.

Una célula hospedadora útil en la presente invención es una célula hospedadora transformada de manera estable con las secuencias que codifican *rep* y *cap*, y que se transfecta con el ADN de E1, E2a, E4 ORF6 de adenovirus y una construcción portadora del minigén como se ha descrito anteriormente. Las líneas de células de expresión de *rep* y/o *cap* estables, tal como la B-50 (PCT/CTS98/19463), o las descritas en la Patente US núm. 5.658.785, también pueden emplearse de forma similar. Otra célula hospedadora deseable contiene el mínimo ADN adenovírico que sea suficiente para expresar E4 ORF6. Incluso pueden construirse otras líneas celulares usando las secuencias *rep* de VAA y/o *cap* de VAA de la invención.

La preparación de una célula hospedadora según la presente invención implica técnicas tales como el ensamblaje de secuencias de ADN seleccionadas. Este ensamblaje puede llevarse a cabo utilizando técnicas convencionales. Tales técnicas incluyen clonación genómica y de ADNc, muy conocidas y descritas en Sambrook et al., mencionado anteriormente, el uso de secuencias oligonucleotídicas solapantes de los genomas de adenovirus y de VAA,

combinado con reacción en cadena de la polimerasa, métodos sintéticos, y cualesquier otro método adecuado que proporcione la secuencia nucleotídica deseada.

La introducción de las moléculas (como plásmidos o virus) en la célula hospedadora también puede llevarse a cabo usando técnicas conocidas por los expertos en la materia y comentadas a lo largo de la memoria descriptiva. En la realización preferida, se usan técnicas de transfección convencionales, por ejemplo, transfección con CaPO<sub>4</sub> o electroporación y/o infección por vectores híbridos de adenovirus/VAA en líneas celulares tales como la línea celular de riñón embrionario humano HEK 293 (una línea celular de riñón humano que contiene genes E1 de adenovirus funcional, que proporciona proteínas E1 que actúan en *trans*).

Los vectores basados en VAA8 generados por un experto en la materia son beneficiosos para el suministro de genes a células hospedadoras seleccionadas y a pacientes con genoterapia ya que no se han encontrado anticuerpos neutralizantes contra VAA8 en la población humana. Un experto en la materia puede preparar fácilmente otros vectores víricos de VAAr que contengan las proteínas de cápside de VAA8 proporcionadas en el presente documento usando diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Se puede preparar de manera similar otros vectores víricos de VAAr que contengan la secuencia de VAA8 y cápsides de VAA de otro serotipo

Un experto en la materia comprenderá fácilmente que las secuencias de VAA de la invención pueden adaptarse fácilmente para su uso en estos y otros sistemas de vector vírico para suministro génico *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. De forma similar, un experto en la materia puede seleccionar otros fragmentos del genoma de VAA de la invención para su uso en una diversidad de sistemas de vector de VAAr y no VAAr. Tales sistemas de vector pueden incluir, por ejemplo, lentivirus, retrovirus, poxvirus, virus de la vacuna, y sistemas adenovíricos, entre otros. La selección de estos sistemas de vector no es una limitación de la presente invención.

Por tanto, la invención proporciona además vectores generados usando las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos del nuevo VAA de la invención. Tales vectores son útiles para una diversidad de fines, incluyendo el suministro de moléculas terapéuticas y el uso en regímenes de vacuna. Particularmente deseables para el suministro de moléculas terapéuticas son los VAA recombinantes que contienen cápsides del nuevo VAA de la invención. Estas, u otras construcciones de vector, que contienen nuevas secuencias de VAA de la invención, pueden usarse en regímenes de vacuna, por ejemplo para el suministro conjunto de una citocina, o para el suministro del propio inmunógeno.

#### IV. Virus recombinantes y usos de los mismos

Usando las técnicas descritas en el presente documento, un experto en la materia puede generar un VAAr que tenga una cápside de un serotipo 8 de la invención, o que tenga una cápside que contenga uno o más fragmentos de VAA8. En una realización, se puede utilizar una cápside de longitud completa a partir de un solo serotipo, por ejemplo, VAA8 [SEQ ID NO: 2]. En otra realización, puede generarse una cápside de longitud completa que contenga uno o más fragmentos de VAA8 fusionados en fase con secuencias de otro serotipo de VAA seleccionado, o de partes heterólogas de VAA8. Por ejemplo, un VAAr puede contener una o más de las nuevas secuencias de regiones híper variables de VAA8. Como alternativa, las secuencias de VAA8 exclusivas de la invención pueden usarse en construcciones que contengan otras secuencias víricas y no víricas. Opcionalmente, un virus recombinante puede portar secuencias rep de VAA8 que codifiquen una o más de las proteínas rep de VAA8.

#### A. Suministro de virus

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el suministro de un gen a un hospedador que implica transfectar o infectar una célula hospedadora seleccionada con un vector vírico recombinante generado con las secuencias de VAA8 (o fragmentos funcionales del mismo) de la invención. Los métodos de suministro son muy conocidos por los expertos en la materia y no constituyen una limitación de la presente invención.

En una realización deseable, la invención proporciona un método para el suministro mediado por VAA8 de un transgén a un hospedador. Este método implica transfectar o infectar una célula hospedadora seleccionada con un vector vírico recombinante que contiene un transgén seleccionado bajo el control de secuencias que dirigen la expresión del mismo y proteínas de cápside de VAA8.

Opcionalmente, en primer lugar, una muestra del hospedador puede someterse a ensayo en cuanto a la presencia de anticuerpos contra un serotipo de VAA seleccionado. Los expertos en la materia conocen una diversidad de formatos de ensayo para detectar anticuerpos neutralizantes. La selección de un ensayo de ese tipo no es una limitación de la presente invención. Véase, por ejemplo, Fisher et al., *Nature Med.*, 3(3): 306-312 (marzo de 1997), y W.C. Manning et al., *Terapia de Gen Humano*, 9: 477-485 (1 de Marzo de 1998). Los resultados de este ensayo pueden usarse para determinar qué vector de VAA que contiene proteínas de cápside de un serotipo particular, es el preferido para el suministro, por ejemplo, mediante la ausencia de anticuerpos neutralizantes específicos para ese serotipo de cápside.

En un aspecto de este método, el suministro del vector con proteínas de cápside de VAA8 de la invención puede preceder o seguir al suministro de un gen por medio de un vector con una proteína de cápside de VAA de diferente serotipo. Por tanto, el suministro génico a través de vectores de VAAr puede usarse para repetir el suministro génico a una célula hospedadora seleccionada. Deseablemente, los vectores de VAAr administrados posteriormente portan el mismo transgén que el primer vector de VAAr, pero los vectores administrados posteriormente contienen proteínas de cápside de serotipos que difieren del primer vector. Por ejemplo, si un primer vector tiene proteínas de cápside de VAA8, los vectores administrados posteriormente pueden tener proteínas de cápside seleccionadas de entre otros serotipos.

Los vectores recombinantes descritos anteriormente pueden suministrarse a células hospedadoras de acuerdo con métodos publicados. El VAAr, suspendido preferentemente en un transportador fisiológicamente compatible, puede administrarse a un paciente mamífero humano o no humano. Los transportadores adecuados pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia en vista de la indicación para la que se dirija el virus de transferencia. Por ejemplo, un transportador adecuado incluye solución salina, que puede formularse con una diversidad de soluciones tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Otros transportadores ejemplares incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuate, aceite de sésamo y agua. La selección del transportador no es una limitación de la presente invención.

Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además del VAAr y de uno o más transportadores, otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tal como conservantes o estabilizadores químicos. Ejemplos adecuados de conservantes incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, propil galato, parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol, y paraclorofenol. Los estabilizadores químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

Los vectores se administran en cantidades suficientes para transfectar las células y para proporcionar niveles suficientes de transferencia y expresión génica para proporcionar un beneficio terapéutico sin efectos adversos indebidos, o con efectos fisiológicos médicamente aceptables, que pueden ser determinados por los expertos en las artes médicas. Las vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, suministro directo a un órgano (por ejemplo, el hígado o el pulmón), administración oral, por inhalación, intratraqueal, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, y otras vías de administración parentales. Si se desea, las vías de administración pueden combinarse.

Las dosificaciones de vector vírico dependerán principalmente de factores tales como la afección que vaya a tratarse, el peso y el estado de salud del paciente, y por lo tanto pueden variar entre los pacientes. Por ejemplo, una dosificación humana terapéuticamente eficaz de vector vírico está, por lo general, comprendida en el intervalo de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 100 ml de solución que contiene concentraciones de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{16}$  genomas de vector vírico. Una dosis humana preferida puede ser de aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  a  $1 \times 10^{16}$  genomas de VAA. Las dosis se ajustarán para equilibrar el beneficio terapéutico frente a cualquier efecto secundario, y dichas dosis pueden variar dependiendo de la aplicación terapéutica para la que se emplee el vector recombinante. Los niveles de expresión del transgén pueden monitorizarse para determinar la frecuencia de dosificación resultante en vectores víricos, con preferencia vectores de VAA que contienen el minigén. Opcionalmente, se pueden utilizar regímenes de dosificación similares a los descritos con fines terapéuticos, para inmunización, usando las composiciones de la invención.

A continuación se proporcionan ejemplos de productos terapéuticos e inmunogénicos para su suministro mediante los vectores de la invención que contienen VAA8. Estos vectores pueden usarse para una diversidad de regímenes terapéuticos y de vacuna, según se describe en la presente memoria. Adicionalmente, estos vectores pueden suministrarse en combinación con uno o más de otros vectores o ingredientes activos en un régimen terapéutico y/o de vacuna deseado.

#### B. Transgenes terapéuticos

Los productos terapéuticos útiles codificados por el transgén incluyen hormonas y factores de crecimiento y de diferenciación incluyendo, aunque sin limitación, insulina, glucagón, hormona del crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor de liberación de hormona de crecimiento (GRF), hormona de estimulación de folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina, angiostatina, factor de estimulación de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblasto ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores I y II de crecimiento de insulina (IGF-I e IGF.II), uno cualquiera de la superfamilia  $\alpha$  de factor de crecimiento de transformación, incluyendo TGF $\alpha$ , activinas, inhibinas, o cualquiera de las proteínas morfogénicas óseas (BMP), las BMP 1-15, uno cualquiera de la familia de factores de crecimiento de herregulina/neuregulina/ARIA/factor de diferenciación neu (NDF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF), neurturina, agrina, uno cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocito (HGF), efrina, nogina, erizo sónico

y tirosina hidroxilasa.

5 Otros productos de transgén útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario incluyendo, sin limitación, citocinas y linfocinas, tal como la trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL), IL-1 a IL-18, proteína quimioatrayente de monocito, factor inhibidor de leucemia, factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral, interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factor de células madre, ligando flk-2/flt3. Los productos  
10 génicos producidos por el sistema inmunitario son también útiles en la invención. Éstos incluyen, sin limitación, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena simple, receptores de célula T, receptores de célula T quiméricos, receptores de célula T de cadena simple, moléculas de MHC de clase I y de clase II, así como inmunoglobulinas de diseño y moléculas de MHC. Los productos génicos útiles incluyen también proteínas reguladoras de complemento tales como proteínas reguladoras de complemento, proteína de cofactor de membrana (MCP), factor acelerador de putrefacción (DAF), CR1, CF2 y CD59.

15 Otros productos génicos útiles adicionales incluyen uno cualquiera de los receptores para hormonas, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. La invención abarca receptores para la regulación del colesterol, incluyendo el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL), el receptor de lipoproteína de alta densidad (HDL), el receptor de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), y el receptor de necrófago. La invención también abarca productos génicos tales como miembros de la superfamilia del receptor de hormona esteroidea, incluyendo los receptores de glucocorticoides y los receptores de estrógeno, receptores de vitamina D y otros receptores nucleares. Adicionalmente, los productos génicos útiles incluyen factores de transcripción tales como jun, fos, max, mad, factor de respuesta de suero (SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD y miogenina, proteínas que contienen caja ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, AF5, NFAT, CREB, HNF-4, c/EBP, SP1, proteínas de unión a caja CCAAT, factor de regulación de interferón (IRF-1), proteína de tumor de Wilms, por ejemplo, proteína de unión a ETS, STAT, proteínas de unión a caja GATA, por ejemplo, GATA-3, y la familia forkhead de proteínas de hélice alada.

20  
25

30 Otros productos génicos útiles incluyen carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor VIII, factor IX, cistationa beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, pripionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvirato carboxilato, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, una secuencia reguladora de transmembrana de fibrosis cística (CFTR), y una secuencia de ADNc de distrofina. Incluso otros productos génicos adicionales incluyen enzimas tales que puedan ser útiles en terapia de reemplazo enzimático, que es útil en una diversidad de afecciones que se producen por una actividad enzimática insuficiente. Por ejemplo, las enzimas que contienen manosa-6-fosfato pueden utilizarse en terapias para enfermedades de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, un gen adecuado incluye el que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB)).

35  
40

40 Otros productos génicos útiles incluyen los polipéptidos de origen no natural, tal como los polipéptidos quiméricos o híbridos que tienen una secuencia de aminoácidos de origen no natural que contiene inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácido. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de diseño de cadena simple, podrían ser útiles en determinados pacientes inmunocomprometidos. Otros tipos de secuencias génicas de origen no natural, incluyen moléculas antisentido y ácidos nucleicos catalíticos, tal como ribozimas, que podrían usarse para reducir la sobreexpresión de una diana.

45

50 La reducción y/o la modulación de la expresión de un gen es particularmente deseable para el tratamiento de afecciones hiperproliferativas caracterizadas por células hiperproliferativas, como son los cánceres y la psoriasis. Los polipéptidos diana incluyen los polipéptidos que se producen exclusivamente, o a niveles más altos, en células hiperproliferativas en comparación con células normales. Los antígenos diana incluyen polipéptidos codificados por oncogenes tales como myb, myc, fyn, y el gen de translocación bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk y EGRF. Adicionalmente a los productos de oncogén como antígenos diana, los polipéptidos diana para tratamientos contra el cáncer y regímenes protectores incluyen regiones variables de anticuerpos formados por linfomas de célula B y regiones variables de receptores de célula T de linfomas de célula T que, en algunas realizaciones, se usan también como antígenos diana para enfermedad autoinmunitaria. Otros polipéptidos asociados a tumor pueden usarse como polipéptidos diana tal como los polipéptidos que se encuentran a niveles más altos en células tumorales incluyendo el polipéptido reconocido por el anticuerpo monoclonal 17-1A y los polipéptidos de unión a folato.

55

60 Otros polipéptidos y proteínas terapéuticos adecuados incluyen los que pueden ser útiles para el tratamiento de individuos que padecen enfermedades y trastornos autoinmunitarios, que confieren una amplia respuesta inmunoprotectora frente a dianas que están asociadas a autoinmunidad incluyendo los receptores celulares y las células que producen anticuerpos "auto-dirigidos". Las enfermedades autoinmunitarias mediadas por células T incluyen la artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), síndrome de Sjögren, sarcoidosis, diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), tiroiditis autoinmunitaria, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Cada una de esas enfermedades se caracteriza por receptores de célula T (TCR) que se unen a antígenos

65

endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada a enfermedades autoinmunitarias.

C. Transgenes inmunogénicos

5 Como alternativa, o adicionalmente, los vectores de la invención pueden contener secuencias de VAA de la invención y un transgén que codifique un péptido, polipéptido o proteína que induzca una respuesta inmunitaria  
 10 contra un inmunógeno seleccionado. Por ejemplo, pueden seleccionarse inmunógenos de una diversidad de familias de virus. Como ejemplos de familias de virus deseables frente a las que podría ser deseable una respuesta  
 15 inmunitaria se incluyen, la familia *picornavirus*, que incluye los géneros rinovirus, que son responsables de alrededor de un 50% de los casos de resfriado común; los géneros enterovirus, que incluyen los poliovirus, coxsackievirus,  
 20 ecovirus, y enterovirus humanos tal como el virus de la hepatitis A; y los géneros aftovirus, que son responsables de las enfermedades de pie y boca, principalmente en animales no humanos. Dentro de la familia de virus de los  
 25 picomavirus, los antígenos diana incluyen las VP1, VP2, VP3, VP4 y VP5. Otras familias de virus incluyen la familia de los calcivirus que abarca el grupo de virus de Norwalk, que son un importante agente causante de gastroenteritis  
 epidémica. Otra familia deseable más para su uso en antígenos de direccionamiento para inducir respuestas  
 30 inmunitarias en animales humanos y no humanos, es la familia togavirus, que incluye los géneros alfavirus, que incluyen el virus de Sindbis, el virus del río Ross, y la encefalitis equina Venezolana, oriental y occidental, y los rubivirus, incluyendo el virus de la rubeola. La familia flaviviridae incluye el dengue, la fiebre amarilla, la encefalitis  
 japonesa, la encefalitis de St. Louis, y los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. Otros antígenos diana  
 35 pueden generarse a partir del virus de la hepatitis C o de la familia coronavirus, que incluye un número de virus no humanos tal como el virus de la bronquitis infecciosa (aves de corral), el virus gastroentérico transmisible porcino  
 (cerdo), el virus de la encefalomielitis de hemaglutinante porcina (cerdo), el virus de la peritonitis infecciosa felina (gato), el coronavirus entérico felino (gato), el coronavirus canino (perro), y los coronavirus respiratorios humanos,  
 40 que pueden causar el resfriado común y/o la hepatitis no A, B o C. Dentro de la familia de coronavirus, los antígenos diana incluyen el E1 (también denominado M o proteína de matriz), E2 (también denominado S o proteína Spike), E3  
 (también denominado HE o hemaglutina-elterosa), glicoproteína (no presente en todos los coronavirus), o N (nucleocápside). Incluso otros antígenos pueden estar dirigidos contra la familia rhabdovirus, que incluye los géneros  
 45 vesiculovirus (por ejemplo, el virus de la estomatitis vesicular), y los géneros lisavirus (por ejemplo, rabias). Dentro de la familia rhabdovirus se pueden obtener antígenos adecuados a partir de la proteína G o de la proteína N. La  
 familia filoviridae, que incluye virus de fiebre hemorrágica tal como los virus de Marburg y de Ébola, puede ser una  
 50 fuente adecuada de antígenos. La familia paramixovirus incluye el virus paragripal de tipo 1, el virus de paragripal de tipo 3, el virus de paragripal bovino de tipo 3, el rubulavirus (virus de las paperas, virus paragripal de tipo 2, virus  
 paragripal de tipo 4, virus de la enfermedad de Newcastle (pollos), peste bovina, morbilivirus, que incluye el  
 55 sarampión y el moquillo canino, y neumovirus, que incluye el virus sincitial respiratorio. El virus de la gripe se clasifica dentro de la familia ortomixovirus y es una fuente adecuada de antígeno (por ejemplo, la proteína HA, la  
 proteína N1). La familia bunyavirus incluye los géneros bunyavirus (encefalitis de California, La Crosse), flebovirus  
 (fiebre del Valle de Rift), hantavirus (el puremala es un virus de la fiebre hemahagin), nairovirus (enfermedad de la  
 60 oveja de Nairobi), y varios bungavirus no asignados. La familia arenavirus proporciona una fuente de antígenos frente a LCM y al virus de la fiebre de Lassa. La familia reovirus incluye los géneros reovirus, rotavirus (que causa  
 gastroenteritis aguda en niños), orbivirus, y cultivirus (fiebre de la garrapata de Colorado, Leombo (humanos),  
 65 encefalitis equina, lengua azul). La familia retrovirus incluye la subfamilia oncorivirinal que abarca enfermedades humanas y veterinarias tales como el virus de la leucemia felina, HTLV I y HTLV II, lentivirinal (que incluye el VIH,  
 el virus de la inmunodeficiencia del simio, el virus de la inmunodeficiencia felina, el virus de la anemia infecciosa  
 equina, y espumavirinal). La familia papovavirus incluye la subfamilia polioma (virus BKU y JCU) y la subfamilia  
 70 papilomavirus (asociados a cánceres o progresión maligna de papiloma). La familia adenovirus incluye virus (EX,  
 AD7, ARD, O.B.) que causan enfermedad respiratoria y/o enteritis. La familia parvovirus incluye el parvovirus felino  
 (enteritis felina), panleucopeniavirus felino, parvovirus canino y parvovirus porcino. La familia herpesvirus incluye la  
 subfamilia alfaherpesvirinae, que abarca los géneros simplexvirus (HSV I, HSV II), varicellovirus (pseudorrubias,  
 75 varicela zóster) y la subfamilia beta herpesvirinae, la cual incluye los géneros citomegalovirus (HCMV,  
 muromegalovirus) y la subfamilia gamma herpesvirinae, que incluye los géneros citomegalovirus (HCMV,  
 muromegalovirus) y la subfamilia gamma herpesvirinae, que incluye los géneros linfocriptovirus, EBV (linfoma de  
 Burkitts), herpesvirus humano 6A, 6B y 7, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi y herpesvirus cercopitecino  
 (virus B), rinotraqueitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek y radinivirus. La familia poxvirus incluye la  
 subfamilia cordopoxvirinae, que abarca los géneros ortopoxvirus (Viruela mayor (Viruela) y Vaccinia (Viruela  
 80 vacuna)), parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, y la subfamilia entomopoxvirinae. La familia hepadnavirus incluye el virus de la hepatitis B. Un virus no clasificado que puede ser una fuente adecuada de  
 antígeno es el virus de la hepatitis delta. Otro virus que es una fuente de antígeno es el virus Nipán. Otras fuentes de  
 virus más pueden incluir el virus de la enfermedad bursal infecciosa aviar y el virus del síndrome respiratorio y  
 reproductivo porcino. La familia alfavirus incluye el virus de arteritis equina y varios virus de encefalitis.

La presente invención puede abarcar también inmunógenos que son útiles para inmunizar un animal humano o no humano frente a otros patógenos que incluyen bacterias, hongos, microorganismos parásitos o parásitos multicelulares que infectan vertebrados humanos y no humanos, o procedentes de células cancerígenas o de células tumorales. Ejemplos de patógenos bacterianos incluyen los cocos patógenos grampositivos incluyendo los neumococos; estafilococos (y las toxinas producidas por los mismos, por ejemplo, la enterotoxina B); y, estreptococos. Los cocos patógenos gramnegativos incluyen los meningococos; gonococos. Los bacilos entéricos

patógenos gramnegativos incluyen enterobacteriáceas; seudomonas, acinetobacterias y eikenella; melioidosis; salmonella; shigella; hemófilos; moraxella; *H. ducreyi* (que causa el chancro); especies de *Brucella* (brucelosis); *Francisella tularensis* (que causa la tularemia); *Yersinia pestis* (plaga), y otra yersinia (*pasteurella*); *Streptobacillus moniliformis* y *spirillum*; bacilos grampositivos que incluyen *Listeria monocytogenes*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Corynebacterium diptheria* (difteria); cólera; *B. anthracis* (ántrax); donovanosis (granuloma inguinal); y, bartonelosis. Las enfermedades causadas por bacterias anaerobias patógenas incluyen el tétano; botulismo (*Clostridium botulinum* y su toxina); *Clostridium perfringens* y su toxina épsilon; otras clostridias; tuberculosis; lepra, y otras micobacterias. Las enfermedades espiroquetales patógenas incluyen la sífilis; trepanomatosos; sífilis pián, pinta y endémica; y, leptoespirosis. Otras infecciones causadas por bacterias patógenas y por hongos patógenos superiores incluyen muermo (*Burkholderia mallei*); actinomycosis; nocardiosis; criptococosis, blastomycosis, histoplasmosis y coccidiyodomicosis; candidiasis, aspergilosis, y mucomicosis; esporotricosis; paracoccidiyodomicosis, petriellidiosis, toruloposis, micetoma y cromomicosis; y dermatofitosis. Las infecciones rickettsianas incluyen la fiebre del tifus, la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, la fiebre Q (*Coxiella burnetti*) y Rickettsialpox. Ejemplos de micoplasma e infecciones clamidiales incluyen: infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*; linfogranuloma venéreo; psitacosis; e infecciones clamidiales perinatales. Los eucariotas patógenos abarcan protozoos y helmintos patógenos y las infecciones producidas por los mismos incluyen: amebiasis; malaria; leishmaniosis; tripanosomiasis; toxoplasmosis; infecciones por *Pneumocystis carinii*; *Trichans*; *Toxoplasma gondii*; babesiosis; giardiasis; triquinosis; filariasis; esquistosomiasis; nematodos, trematodos o fasciolas; e infecciones por cestodos (tenia).

Muchos de esos organismos y/o de las toxinas producidas por los mismos han sido identificados en los Centros de Control de Enfermedades [(CDCE), Departamento de Salud y de Servicios Humanos, USA], como agentes que tienen un posible uso en ataques biológicos. Por ejemplo, algunos de esos agentes biológicos incluyen el *Bacillus anthracis* (ántrax), el *Clostridium botulinum* y su toxina (botulismo), *Yersinia pestis* (plaga), *Variola major* (viruela), *Francisella tularensis* (tularemia), y las fiebres hemorrágicas víricas [filovirus (por ejemplo Ébola, Marburg] y arenavirus [por ejemplo, Lassa, Machupo], todos ellos actualmente clasificados como Agentes de Categoría A; *Coxiella burnetti* (fiebre Q); especies de *Brucella* (brucelosis), *Burkholderia mallit* (muermo), *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis), *Ricinus communis* y su toxina (toxina ricina), *Clostridium perfringens* y su toxina (toxina épsilon), especies de estafilococos y sus toxinas (enterotoxina B), *Chlamydia psittaci* (psitacosis), ataques a la seguridad del agua (por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*), fiebre del tifus (*Rickettsia powazekii*) y encefalitis vírica (alfavirus, por ejemplo, encefalitis equina Venezolana; encefalitis equina oriental; encefalitis equina occidental), todos ellos actualmente clasificados como agentes de Categoría B; y virus Nipán y hantavirus, que están actualmente clasificados como agentes de Categoría C. Adicionalmente, otros organismos, que están clasificados de ese modo o clasificados de forma diferente, pueden identificarse y/o usados para tal propósito en el futuro. Se comprenderá fácilmente que los vectores víricos y otras construcciones descritas en la presente memoria son útiles para el suministro de antígenos a partir de esos organismos, virus, sus toxinas u otros subproductos, que impedirán y/o tratarán la infección u otras reacciones adversas con esos agentes biológicos.

La administración de los vectores de la invención para suministrar inmunógenos frente a la región variable de las células T provoca una respuesta inmunitaria que incluye CTL para eliminar esas células T. En artritis reumatoide (RA), se han caracterizado varias regiones variables específicas de TCR que están involucradas en la enfermedad. Estas TCR incluyen V-3, V-14, V-17 y V-17. De ese modo, el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifique al menos uno de esos polipéptidos provocará una respuesta inmunitaria que se dirigirá a las células T involucradas en la RA. En la esclerosis múltiple (MS), se han caracterizado varias regiones variables específicas de TCR que están involucradas en la enfermedad. Estas TCR incluyen V-7 y V-10. De este modo, el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno de esos polipéptidos provocará una respuesta inmunitaria que se dirigirá a células T involucradas en la MS. En la escleroderma, se han caracterizado varias regiones variables específicas de TCR que están involucradas en la enfermedad. Estas TCR incluyen V-6, V-8, V-14 y V-16, V-3C, V7, V-14, V-15, V-16, V-28 y V-12. De ese modo, el suministro de una molécula de ácido nucleico que codifica al menos uno de esos polipéptidos proporcionará una respuesta inmunitaria que se dirigirá a células T involucradas en escleroderma.

Por tanto, un vector vírico recombinante derivado de VAAr de la invención proporciona un vehículo eficaz de transferencia génica que puede suministrar *in vivo* o *ex vivo* un transgén seleccionado a una célula hospedadora seleccionada, incluso cuando el organismo tiene anticuerpos neutralizantes respecto a uno o más serotipos de VAA. En una realización, el VAAr y las células se mezclan *ex vivo*; las células infectadas se cultivan usando metodologías convencionales; y las células transducidas se re-infunden en el paciente.

Estas composiciones son particularmente muy adecuadas para el suministro de genes a efectos terapéuticos y para inmunización, incluyendo la inducción de inmunidad protectora. Adicionalmente, las composiciones de la invención también pueden usarse para la producción de un producto génico deseado *in vitro*. Para la producción *in vitro*, un producto deseado (por ejemplo, una proteína) puede obtenerse a partir de un cultivo deseado tras la transfección de células hospedadoras con un VAAr que contenga la molécula que codifique el producto deseado y cultivando el cultivo celular en condiciones que permitan la expresión. El producto expresado puede purificarse y aislarse después, según se desee. Las técnicas adecuadas de transfección, cultivo celular, purificación y aislamiento, son muy conocidas por los expertos en la materia.

Los siguientes ejemplos ilustran diversos aspectos y realizaciones de la invención.

## Ejemplos

### 5 Ejemplo 1: Producción de genomas víricos de VAA8 recombinante dotados con RTI de VAA2

Se generaron construcciones de empaquetado quimérico fusionando secuencias rep de VAA2 con secuencias cap de nuevos serotipos de VAA. Estas construcciones de empaquetado quimérico se usan, inicialmente, para el pseudotipificado de genomas de VAA recombinante que son portadores de las RTI de VAA2 por transfección triple de células 293 usando el plásmido auxiliar Ad5. Estos vectores pseudotipificados se usan para evaluar el comportamiento en estudios serológicos basados en transducción y para evaluar la eficacia de la transferencia génica de nuevos serotipos de VAA en diferentes modelos animales, incluyendo PNH y roedores, antes de que los virus intactos e infecciosos de estos nuevos serotipos se aislen.

#### 15 A. pAA V2GFP

El plásmido de VAA2 que contiene las RTI de VAA2 y la proteína fluorescente verde se expresó bajo el control de un promotor constitutivo. Este plásmido contiene los siguientes elementos: las RTI de VAA2, un promotor de CMV y las secuencias codificantes de la proteína fluorescente verde (GFP, por las siglas en inglés de *green fluorescent protein*).

#### 20 B. Clonación del plásmido en *trans*

Para construir el plásmido quimérico en *trans* para la producción de vectores de VAA8 pseudotipificados recombinantes, el plásmido p5E18 (Xiao *et al.* 1999, J. Virol 73: 3994-4003) se dirigió parcialmente con Xho I para linealizar el plásmido en el sitio Xho I en la posición de 3169 pb solamente. Los extremos cortan Xho I donde después se cargan y vuelven a ligarse. Este plásmido p5E18 modificado se restringió con Xba I y Xho I en una digestión completa para retirar la secuencia génica cap de VAA2 y se reemplazó con un fragmento Spe I/Xho I de 2267 pb que contenía el gen cap de VAA8 que se aisló del plásmido pCRVAA8 6-5+15-4.

El plásmido resultante contiene las secuencias rep de VAA2 para Rep78/68 bajo el control del promotor P5 de VAA2 y las secuencias rep de VAA2 para Rep52/40 bajo el control del promotor P 19 de VAA2. Las secuencias de la cápside de VAA9 están bajo el control del promotor P40 de VAA2, que se localiza dentro de las secuencias Rep. Este plásmido contiene adicionalmente un espaciador en dirección 5' de la fase de lectura abierta, ORF, de rep.

Como alternativa, puede construirse un plásmido similar que utiliza las secuencias rep de VAA8 y las secuencias promotoras de VAA8 natural. Este plásmido se usó después para la producción de VAA8, como se describe en el presente documento.

#### 40 C. Producción de VAAr pseudotipificado

Las partículas de VAAr (vector de VAA2 en la cápside de VAA8) se generan usando un método sin adenovirus. En resumen, el plásmido en *cis* (plásmido pVAA2.1 lacZ que contiene las RTI de VAA2) y el plásmido en *trans* pCRVAA8 6-5+15-4 (que contiene rep de VAA2 y cap de VAA8) y el plásmido auxiliar, respectivamente, se co-transfectaron simultáneamente en células 293 en una proporción de 1:1:2 mediante precipitación con fosfato de calcio.

Para la construcción de los plásmidos auxiliares pAd, el plásmido pBG10 se adquirió en Microbix (Canadá). Un fragmento RsrII que contenía L2 y L3 se suprimió de pBG10, dando como resultado el primer plásmido auxiliar, pAdΔF13. El plásmido AdF1 se construyó clonando al fragmento Asp700/Sall con la supresión PmeI/SgfI, aislando de pBG10, en Bluescript. MLP, L2, L2 y L3 se suprimieron en el plásmido pAdΔF1. Supresiones adicionales de un fragmento Nrul de 2,3 kb y posteriormente, un fragmento RsrII/Nrul de 0,5 kb generó los plásmidos auxiliares pAdΔF5 y pAdΔF6, respectivamente. El plásmido auxiliar, denominado pΔF6, proporciona las funciones auxiliares esenciales de la ORF6 de E2 y E4 no proporcionadas por la célula auxiliar que expresa E1, pero se suprime de las proteínas de la cápside adenovírica y regiones E1 funcionales).

Típicamente, se transfectaron 50 μg de ADN (*cis:trans:auxiliar*) sobre una placa de cultivo tisular de 150 mm. Las células 293 se recogieron 72 horas después de la transfección, se sometieron a ultrasonido y se trataron con desoxicolato sódico al 0,5% (37 °C durante 10 min). Después, los lisados celulares se sometieron a dos rondas de gradiente con CsCl. Se recogieron las fracciones pico que contenían el vector VAAr, se agruparon y se dializaron frente a PBS.

#### Ejemplo 2 – Evaluación de vectores con cápsides de VAA8

65 Los vectores basados en VAA1 (2/1), VAA5 (2/5) y VAA2 (2/2) se desarrollaron esencialmente como describe para VAA8 en el Ejemplo 1. Se determinaron títulos de copias de genoma (CG) de vectores de VAA por análisis TaqMan

usando sondas y cebadores que se dirigen a la región poli A del SV40 como se describe previamente [Gao, G., *et al.*, (2000) Hum Gene Ther 11, 2079-91]. Se recuperaron viriones recombinantes por sedimentación con CsCl<sub>2</sub> en todos los casos excepto en el VAA2/2, que se purificó mediante cromatografía con heparina.

5 Los vectores se construyeron para cada serotipo para diversos estudios *in vitro* e *in vivo*. Se incorporaron ocho casetes transgénicos diferentes en los vectores y se produjeron viriones recombinantes para cada serotipo. La recuperación de virus, basándose en copias de genoma, se resume en la Tabla 1. Los resultados de los vectores fueron altos para cada serotipo sin diferencias notables entre los serotipos. Los datos presentados en la tabla son resultados promedio de copias de genoma con una desviación típica x 10<sup>13</sup> de lotes de producción múltiples de 50  
10 transfecciones por placa (150 mm).

Tabla 1. Producción de vectores recombinantes

	VAA2/1	VAA2/2	VAA2/5	VAA2/8
CMV	7,30 ± 4,33	4,49 ± 2,89	5,19 ± 5,190	0,87
LacZ	(n=9)	(n=6)	(n=8)	(n=1)
CMV	6,43 ± 2,42	3,39 ± 2,42	5,55 ± 6,49	3,74 ± 3,88
EGFP	(n=2)	(n=2)	(n=4)	(n=2)
TBG LacZ	4,18	0,23	0,704 ± 0,43	0,532
	(n=1)	(n=1)	(n=2)	(n=1)
Alb A1AT	4,67 ± 0,75	4,77	4,09	2,02
	(n=2)	(n=1)	(n=1)	(n=1)
CB A1AT	0,567	0,438	2,82	0,816 ± 0,679
	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=2)
CMV	8,78 ± 2,37	1,43 ± 1,18	1,63 ± 1,15	1,32 ± 0,87
rhCG	(n=7)	(n=2)	(n=3)	(n=3)
TBG	8,51 ± 6,65	3,47 ± 2,09	5,26 ± 3,85	1,83 ± 0,98
rhCG	(n=6)	(n=5)	(n=4)	(n=5)
TBG cFIX	1,24 ± 1,29	0,63 ± 0,394	3,74 ± 2,48	15,8 ± 15,0
	(n=3)	(n=6)	(n=7)	(n=5)

Ejemplo 3 – Análisis serológico de vectores pseudotipificados

15 Ratones C57BL/6 recibieron una inyección de vectores de diferentes serotipos de vectores VAACBA1AT por vía intramuscular (5 x 10<sup>11</sup> CG) y se recogieron muestras de suero 34 días después. Para analizar la actividad neutralizante y neutralizante en cruzado de los sueros de cada serotipo de VAA, los sueros se analizaron en un ensayo de anticuerpos neutralizantes basado en transducción [Gao, G. P., *et al.*, (1996) J Virol 70, 8934-43]. Más  
20 específicamente, la presencia de anticuerpos neutralizantes se determinó evaluando la capacidad del suero para inhibir la transducción de células 84-31 por virus indicadores (VAACMVEGFP) de diferentes serotipos. Específicamente, el virus indicador VAACMVEGFP de cada serotipo [a una multiplicidad de infección (MOI) que conduce a una transducción de 90 % de células indicadoras] se preincubó con suero termoinactivado de animales que recibieron diferentes serotipos de VAA o de ratones sin tratamiento previo. Después de 1 hora de incubación a  
25 37 °C, se añadieron los virus a células 84-31 en placas de 96 pocillos durante 48 o 72 horas, dependiendo del serotipo del virus. La expresión de la GFP se midió con Fluorolmagin (Molecular Dynamics) y se cuantificó con el programa informático Image Quant. Los títulos de los anticuerpos neutralizantes se mostraron como la dilución en suero más alta que inhibía la transducción a menos de 50 %.

30 La capacidad de los vectores que expresaban la GFP simplificó el desarrollo de un ensayo para anticuerpos neutralizantes que se basó en la inhibición de la transducción en una línea celular permisiva (es decir, células 293 que expresan de manera estable E4 de Ad5). Se generaron sueros para seleccionar serotipos de VAA por inyección intramuscular de los virus recombinantes. Se evaluó la neutralización de la transducción de VAA con diluciones de 1:20 y 1:80 de los antisueros (Tabla 2). Los antisueros contra VAA1, VAA2, VAA5 y VAA8 neutralizaron la transducción del serotipo contra el cual se generó el antisuero (VAA5 y AVV8 a un menor grado que VAA1 y VAA2)  
35 pero no la del otro serotipo (es decir, no hubo pruebas de neutralización en cruzado, lo que sugiere que VAA8 es un serotipo verdaderamente único).

Tabla 2: Análisis serológico de nuevos serotipos de VAA

Sueros:	Vector de inmunización	Dilución de suero:							
		1/20	1/80	1/20	1/80	1/20	1/80	1/20	1/80
Grupo 1	VAA2/1	0	0	100	100	100	100	100	100
Grupo 2	VAA2/2	100	100	0	0	100	100	100	100
Grupo 3	VAA2/5	100	100	100	100	16,5	16,5	100	100
Grupo 4	VAA2/8	100	100	100	100	100	100	26,3	60

Los sueros humanos de 52 sujetos normales se exploraron con respecto a la neutralización contra serotipos seleccionados. Se descubrió que ninguna muestra de suero neutralizaba al vector VAA2/8 mientras que los vectores VAA2/2 y VAA2/1 se neutralizaron en el 20 % y 10 % de los sueros, respectivamente. Una fracción de IgG agrupada humana, que representaba un conjunto de 60.000 muestras individuales, no neutralizó al vector VAA2/8, mientras que los vectores VAA2/2 y VAA2/1 se neutralizaron a títulos de suero iguales a 1/1280 y 1/640, respectivamente.

Ejemplo 4 – Evaluación *in vivo* de diferentes serotipos de vectores de VAA

En este estudio, 7 genomas de VAA recombinante, VAA2CBhA1AT, VAA2AlbA1AT, VAA2CMVrhCG, VAA2TBGrhCG, VAA2TBGcFIX, VAA2CMVLacZ y VAA2TBGLacZ se empaquetaron con proteínas de cápside de diferentes serotipos. En las 7 construcciones, los casetes de minigén se flanquearon con las RTI de VAA2. Como genes indicadores se usaron los ADNc de la  $\alpha$ -antitripsina humana (A1AT), [Xiao, W., *et al.*, (1999) *J Virol* 73, 3994-4003] las subunidades beta de la hormona coriagonadotrópica (GC) de mono rhesus Zoltick, P. W. y Wilson, J. M. (2000) *Mol Ther* 2,657-9] el factor IX canino [Wang, L., *et al.*, (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 11563-6] y genes de la  $\beta$ -galactosidasa bacteriana (es decir, Lac Z). Para la transferencia de genes dirigida al hígado, se usó bien el promotor del gen de la albúmina (Alb) de ratón [Xiao, W. (1999), citado anteriormente] o el promotor humano del gen la globulina que se une a la hormona tiroidea (TBG) [Wang (1997), citado anteriormente] para conducir la expresión específica de hígado de genes indicadores. En los experimentos de transferencia génica dirigida al músculo, se empleó bien el promotor temprano de citomegalovirus (CMV) o el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo con potenciador de CMV (CB) para dirigir la expresión de los indicadores.

Para la transferencia génica dirigida al músculo, se inyectaron vectores en la tibia derecha anterior de ratones desnudos NCR o C57BL/6 de 4-6 semanas de vida (Taconic, Germantown, NY) a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  copias de genoma (CG) por animal. En los estudios de transferencia génica dirigida a hígado, los vectores se infundieron por vía intraportal en ratones desnudos NCR o C57BL/6 de 7-9 semanas de vida (Taconic, Germantown, NY), también a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  copias de genoma (CG) por animal. Se recogieron muestras de suero por vía intraorbital a diferentes momentos después de la administración del vector. Los tejidos de músculo e hígado se recogieron en diferentes momentos para la criosección y tinción histoquímica con Xgal de animales que recibieron los vectores lacZ. Para el experimento de re-administración, ratones C56BL/6 recibieron inicialmente los vectores VAA2/1, 2/2, 2/5, 2/7 y 2/8CBA1AT por vía intramuscular y seguido de expresión del gen A1A7 durante 7 semanas. Después los animales se trataron con VAA2/BTBGcFIX por vía intraportal y se estudiaron para determinar la expresión del gen **cFIX**.

Para cuantificar los niveles en suero de las proteínas hA1At, rhCG y cFIX, se realizaron ensayos basados en ELISA como se describe anteriormente [Gao, G. P., *et al.*, (1996) *J Virol* 70, 8934-43; Zoltick, P. W. y Wilson, J. M. (2000) *Mol Ther* 2, 657-9; Wang, L., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 11563-6]. Estos experimentos finalizaron cuando los animales se sacrificaron para extraer tejidos de músculo e hígado para la extracción de ADN y para realizar análisis cuantitativos de copias genoma de vectores presentes en tejidos diana, por TaqMan, usando el mismo conjunto de cebadores y sonda que en la titulación de las preparaciones del vector [Zhang, Y., *et al.*, (2001) *Mol Ther* 3, 697-707].

El comportamiento de los vectores basado en los nuevos serotipos se evaluó en modelos murinos de transferencia génica dirigida a músculo e hígado y se comparó con los vectores basados en los serotipos conocidos VAA1, VAA2 y VAA5. Los vectores que expresaban proteínas secretadas (A1AT y CG Tabla 3) se usaron para cuantificar eficacias de transducción relativas entre diferentes serotipos a través de análisis ELISA de sueros. La distribución celular de la transducción dentro del órgano diana se evaluó usando vectores que expresaban lacZ e histoquímica con X-gal.

El comportamiento de los vectores de VAA en el músculo esquelético se analizó después de inyección directa en los músculos anteriores de la tibia. Los vectores que contenían el mismo genoma basado en VAA2 con el gen temprano inmediato de CMV o un promotor de  $\beta$ -actina potenciado del CMV conducían la expresión del transgén. Estudios previos indican que los ratones C57BL/6 inmunocompetentes suscitaron respuestas humorales limitadas contra la proteína A1AT humana cuando se expresaba a partir de vectores de VAA [Xiao, W., *et al.*, (1999) *J Virol* 73, 3994-4003].

En cada cepa, el vector VAA2/1 produjo los niveles más altos de A1AT y el vector VAA2/2 los más bajos, siendo los vectores VAA2/8 los que mostraban niveles de expresión intermedios. Los niveles pico de CG 28 días después de inyección de ratones NCR nu/nu mostraron los niveles más altos de VAA2/7 y los más bajos de VAA2/2 con VAA2/8 y VAA2/1 entre ellos. La inyección de vectores lacZ VAA2/1 produjo una expresión génica en los sitios de inyección en todas las fibras musculares, observándose sustancialmente menos fibras positivas lacZ con los vectores VAA2/2 y VAA 2/8.

Se usaron modelos murinos similares para evaluar la transferencia génica dirigida a hígado. Dosis idénticas de vector basadas en copias de genoma se infundieron en las venas porta de ratones que se analizaron posteriormente para determinar la expresión del transgén. Cada vector contenía un genoma basado en VAA2 usando los promotores específicos de hígado descritos anteriormente (es decir, albúmina o globulina de unión a la hormona tiroidea) para conducir la expresión del transgén. Más particularmente, los casetes del minigén CMVCG y TBGCG se usaron para la transferencia génica dirigida a músculo e hígado respectivamente. Los niveles de rhCG se definieron como unidades relativas ( $Ur \times 10^3$ ). Los datos eran del ensayo de muestras de suero recogidas el día 28, después de la administración del vector (4 animales por grupo). Como se muestra en la Tabla 4, el impacto de las proteínas de cápside sobre la eficacia de la transducción de los vectores A1AT en ratones nu/nu y C57BL/6 y de vectores CG en ratones C57BL/6 era notable, es decir, VAA2/8 es el más eficaz para el pseudotipo para la transferencia génica dirigida a hígado.

Tabla 3. Expresión de la unidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica de mono rhesus (rhCG) en músculo e hígado de ratón.

Vector	Músculo	Hígado
VAA2/1	4,5 $\pm$ 2,1	1,6 $\pm$ 1,0
VAA2	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,3
VAA2/5	ND*	4,8 $\pm$ 0,8
VAA2/8	4,0 $\pm$ 0,7	76,0 $\pm$ 22,8

\* No determinado en este experimento

En todos los casos, los vectores VAA2/8 produjeron los niveles más altos de expresión de transgén que variaban de 16 a 110 más de lo que se obtuvo con los vectores VAA2/2; la expresión de VAA2/5 fue intermedia. El análisis de secciones de hígado teñidas con X-Gal de animales que recibieron los vectores lacZ correspondientes mostró una correlación entre el número de células transducidas y los niveles totales de la expresión del transgén. Los ADN extraídos de hígados de ratones C57BL/6 que recibieron los vectores A1 AT se analizaron con respecto a la abundancia del ADN del vector usando tecnología de PCR en tiempo real.

La cantidad de ADN vector encontrada en el hígado 56 días después de la inyección se correlacionaba con los niveles de expresión de transgén (Tabla 4). Para este experimento, se usó un conjunto de sonda y cebadores que se dirigía a la región poliA del SV40 del genoma del vector para PCR TaqMan. Los valores que se muestran son medias de tres animales individuales con desviaciones típicas. Los animales se sacrificaron el día 56 para extraer los tejidos de hígado para extracción de ADN. Estos estudios indican que VAA8 es el vector más eficaz para la transferencia génica dirigida a hígado debido a un mayor número de hepatocitos transducidos.

Tabla 4. Análisis de PCR en tiempo real para determinar la abundancia de vectores VAA en hígado de ratones nu/nu después de inyección de  $1 \times 10^{11}$  copias de genoma de vector

Vectores VAA/Dosis	Copias de genoma por célula
VAA2/1A1bA1AT	0,6 $\pm$ 0,36
VAA2A1bA1AT	0,003 $\pm$ 0,001
VAA2/5A1bA1AT	0,83 $\pm$ 0,64
VAA2/8A1bA1AT	18 $\pm$ 11

Los datos serológicos descritos anteriormente sugieren que el vector VAA2/8 no debe neutralizarse *in vivo* después de inmunización con los otros serotipos. Los ratones C57BL/6 recibieron inyecciones intraportales de vector VAA2/8 que expresaba el factor IX canino ( $10^{11}$  copias de genoma) 56 días después de que recibieran inyecciones intramusculares de vectores A1AT de diferentes serotipos. Se obtuvieron niveles de expresión del factor IX altos 14 días después de la infusión de VAA2/8 en animales sin tratar ( $17 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ , N=4) que no eran significativamente diferentes a los observados en animales inmunizados con VAA2/1 ( $31 \pm 23 \mu\text{g/ml}$ , N=4) y VAA2/2 ( $16 \mu\text{g/ml}$ , N=2). Esto contrasta con lo observado en animales inmunizados con VAA2/8 que se infundieron con el vector VAA2/8 que expresaba el factor IX en los que no se observó factor IX detectable ( $< 0,1 \mu\text{g/ml}$ , N=4).

Oligonucleótidos en regiones conservadas del gen cap amplificaron secuencias de monos rhesus que representaron VAA únicos. Se descubrieron secuencias de firma cap idénticas en tejidos múltiples de monos rhesus procedentes de al menos dos colonias diferentes. Se aislaron fases de lectura abierta rep y cap de longitud completa y se secuenciaron de fuentes sencillas. Solamente las fases de lectura abierta de cap de los nuevos VAA eran necesarias evaluar su potencial como vectores porque los vectores con las cápsides de VAA8 se generaron usando

las RTI y rep de VAA2. Esto también simplificó la comparación de diferentes vectores dado que el genoma del vector real es idéntico entre diferentes serotipos vector. De hecho, los rendimientos de vectores recombinantes generados usando esta estrategia no difiere entre serotipos.

5 Los vectores basados en VAA8 parecen ser inmunológicamente distintos (es decir, no se neutralizan por anticuerpos generados contra otros serotipos). Adicionalmente, los sueros de seres humanos no neutralizan la transducción de vectores VAA8, que es una ventaja sustancial sobre los VAA procedentes de ser humano actualmente en desarrollo para los cuales una proporción significativa de la población humana tiene inmunidad preexistente que es neutralizante [Chirmule, N., *et al.*, (1999) Gene Ther 6, 1574-83].

10 El tropismo del nuevo vector es favorable para aplicaciones *in vivo*. Cabe destacar que el VAA2/8 proporciona una ventaja sustancial sobre los otros serotipos en cuanto a eficacia de transferencia génica a hígado que hasta ahora había sido relativamente decepcionante en términos de los números de hepatocitos transducidos de manera estable. VAA2/8 consiguió consecuentemente una mejora multiplicada por de 10 a 100 veces en la eficacia de la transferencia génica en comparación con los otros vectores. La base de la eficacia mejorada de VAA2/8 es ambigua, aunque se supone que se debe a la captación mediante un receptor diferente que es más activo en la superficie basolateral de los hepatocitos. Esta eficacia mejorada será bastante útil en el desarrollo de transferencia génica dirigida a hígado cuando el número de células transducidas es crítico, tal como en trastornos del ciclo de la urea e hipercolesterolemia familiar.

20 Por tanto, la ausencia de inmunidad preexistente contra VAA8 y el tropismo favorable de los vectores para el hígado indican que los vectores con proteínas de cápside VAA8 son adecuados para su uso como vectores en genoterapia humana y en otras aplicaciones *in vivo*.

25 Ejemplo 5 – Estudios de tropismo tisular

En el diseño de un esquema de exploración funcional de alto rendimiento para nuevas construcciones de VAA, se seleccionó un promotor muy activo y no específico de tejido, el promotor CB (promotor de  $\beta$ -actina de pollo potenciado por CMV) para conducir un gen indicador fácilmente detectable y cuantificable, el gen de la  $\alpha$ -antitripsina humana. Por tanto únicamente se necesita preparar un vector para cada nuevo clon de VAA para estudios de transferencia génica que se dirigen a 3 tejidos diferentes, hígado, pulmón y músculo para explorar el tropismo tisular de una construcción de VAA particular. La siguiente tabla resume datos generados de nuevos vectores de VAA en estudios de tropismo tisular (VAACBA1AT). La Tabla 5 indica datos obtenidos (en  $\mu\text{g}$  A1AT/ml de suero) el día 14 del estudio.

35

Tabla 5

Vector	Tejido diana		
	Pulmón	Hígado	Músculo
VAA2/1	ND	ND	45 $\pm$ 11
VAA2/5	0,6 $\pm$ 0,2	ND	ND
VAA2/8	ND	84 $\pm$ 30	ND

40 Se proporcionaron vectores de VAA que portaban el minigén CC10hA1AT para la expresión específica en pulmón que se pseudotipificaron con cápsides de nuevos VAA a animales inmunodeficientes (desnudos NCR) en igual volumen (cada una de las preps originales sin dilución de 50  $\mu\text{l}$ ) mediante inyecciones intratraqueales como se proporciona en la siguiente tabla. Los vectores también se administraron a animales inmunocompetentes (C57BL/6) en iguales copias de genoma ( $1 \times 10^{11}$  CG) como se muestra en la Tabla 6. ( $1 \times 10^{11}$  CG por animal, C57BL/6, día 14, límite de detección  $\geq 0,033$   $\mu\text{g/ml}$ ). Como se muestra, VAA8 es el mejor transductor en hígado.

45

Tabla 6

Vector VAA	$\mu\text{g}$ de A1AT/ml con $1 \times 10^{11}$ vector
2/1	0,076 $\pm$ 0,031
2/2	0,1 $\pm$ 0,09
2/5	0,0840,033
2/8	1,92 $\pm$ 1,3

Ejemplo 6 – Modelo de hipercolesterolemia

50 Para evaluar adicionalmente el efecto de la expresión transgénica mediada por VAAr por las construcciones VAA2/8 de la invención, se realizó un estudio adicional.

#### A. Construcción del vector

Se construyeron vectores de VAA empaquetados con proteínas de cápside de VAA8 usando una estrategia de pseudotipificado [Hildinger M, *et al.*, J. Virol 2001; 75: 6199-6203]. Genomas de VAA recombinante con repeticiones terminales invertidas (RTI) de VAA2 se empaquetaron por transfección triple de células 293 con el plásmido en *cis*, el plásmido auxiliar de adenovirus y una construcción de empaquetado quimérica, una fusión de las cápsides de los nuevos serotipos de VAA con el gen rep de VAA2. El plásmido de empaquetado quimérico se construyó como se ha descrito anteriormente [Hildinger *et al.*, citado anteriormente]. Los vectores recombinantes se purificaron mediante el método de sedimentación convencional con CsCl<sub>2</sub>. Para determinar el rendimiento se realizó análisis TaqMan (Applied Biosystems) usando sondas y cebadores que se dirigían a la región poli(A) del SV40 de los vectores [Gao GP, *et al.*, Hum Gene Ther. 10 de octubre de 2000; 11(15):2 079-91]. Los vectores resultantes expresan el transgén bajo el control del promotor del gen de la globulina que se une a la hormona tiroidea (TBG) humana.

#### B. Animales

Se adquirieron ratones deficientes en cuanto al receptor de LDL con fondo C57B1/6 procedentes del laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, EEUU) y se mantuvieron como una colonia en reproducción. Los ratones tuvieron acceso ilimitado a agua y obtuvieron una dieta Western rica en grasa (alto % de colesterol) comenzando tres semanas antes de la inyección del vector. El día -7, así como como el día 0, se obtuvo sangre mediante extracciones retroorbitales y se evaluó el perfil lipídico. Los ratones se dividieron al azar en siete grupos. El vector se inyectó mediante una inyección intraportal como se ha descrito previamente ([Chen SJ *et al.*, Mol Therapy 2000; 2(3), 256-261]. Resumiendo, los ratones se anestesiaron con quetamina y xilazina. Se realizó una laparotomía y se expuso la vena porta. Usando una aguja de calibre 30 la dosis apropiada de vector diluida en 100  $\mu$ l de PBS se inyectó directamente en la vena porta. Se aplicó presión al sitio de inyección para garantizar que se detenía el sangrado. La herida de la piel se cerró y se cubrió y los ratones se monitorizaron detenidamente al día siguiente. Se realizaron extracciones semanales comenzando el día 14 después de la transferencia génica dirigida al hígado para medir los lípidos en sangre. Se sacrificaron dos animales de cada grupo en momentos de la semana 6 y semana 12 después de la inyección del vector para examinar el tamaño de la placa aterosclerótica así como la expresión del receptor. Los restantes ratones se sacrificaron a la semana 20 para la medición de las placas y la determinación de la expresión del transgén.

	Vector	Dosis	N
Grupo 1	VAA2/8-TBG-hLDLr	1x 10 <sup>12</sup> cg	12
Grupo 2	VAA2/8-TBG-hLDLr	3x 10 <sup>11</sup> cg	12
Grupo 3	VAA2/8-TBG-hLDLr	1x 10 <sup>11</sup> cg	12

#### C. Lipoproteína en suero y análisis de la función hepática

Se obtuvieron muestras de sangre de los plexos retroorbitales después de un periodo de ayunas de 6 horas. El suero se separó del plasma por centrifugación. La cantidad de lipoproteínas plasmáticas y de transaminasas hepáticas en el suero se detectó usando un analizador químico clínico automatizado (ACE, Schiapparelli Biosystems, Alpha Wassermann).

#### D. Detección de la expresión transgénica

La expresión de receptor de LDL se evaluó mediante tinción con inmunofluorescencia y transferencia de Western. Para la transferencia de Western se homogeneizó tejido hepático congelado con tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 130 mM, Triton X 100 al 1 %, inhibidor completo de proteinasa, sin EDTA, Roche, Mannheim, Alemania). La concentración de proteínas se determinó usando el Kit Micro BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL). Se resolvieron 40  $\mu$ l de proteína en Geles Ready Tris-HCl al 4-15 % (Biorad, Hercules, CA) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen). Para generar anticuerpos contra el receptor de hLDL, un conejo recibió una inyección intravenosa de preparación de AdhLDLr (1x10<sup>13</sup> cg). Cuatro semanas después, se obtuvo el suero del conejo y se usó para la Transferencia de Western. Se usó una dilución de 1:100 del suero como un anticuerpo primario seguido por un anti-IgG de conejo conjugado con HRP y detección quimioluminiscente de ECL (Kit de Detección de Transferencia de Western ECL, Amersham, Arlington Heights, IL).

#### D. Inmunohistoquímica

Para la determinación de la expresión del receptor de LDL se realizaron análisis inmunohistoquímicos en secciones de hígado congeladas. Secciones criostáticas de 10  $\mu$ m se fijaron en acetona durante 5 minutos o no se fijaron. El bloqueo se obtuvo mediante un periodo de incubación de 1 hora con 10 % de suero de cabra. Después, las secciones se incubaron durante una hora con el anticuerpo primario a temperatura ambiente. Se usó un anticuerpo policlonal de conejo contra LDL humano (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo contra IgG de conejo con fluoresceína diluido a 1:100 (Sigma, St. Louis, MO). Los especímenes se examinaron finalmente al microscopio de

fluorescencia, Nikon Microphot F-XA. En todos los casos, tras cada incubación se realizó un lavado exhaustivo con PBS. Los controles negativos consistían en una preincubación con PBS, omisión del anticuerpo primario y sustitución del anticuerpo primario por un anticuerpo control no inmunitario del mismo isotipo. Los tres tipos de controles mencionados anteriormente se realizaron para cada experimento el mismo día.

5

#### E. Eficacia de la transferencia génica

Se obtuvo tejido de hígado después de sacrificar los ratones en los momentos indicados. El tejido se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C hasta procesamiento posterior. El ADN se extrajo del tejido de hígado usando un Mini Kit de ADN QIAamp (QIAGEN GmbH, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las copias de genoma de vectores VAA en el tejido de hígado se evaluaron usando análisis Taqman usando sondas y cebadores contra la cola poli(A) de SV40 como se ha descrito anteriormente.

10

#### F. Medición de las placas ateroscleróticas

15

Para la cuantificación de las placas ateroscleróticas en las aortas de ratón, los ratones se anestesiaron (quetamina y xilazina al 10 %, i.p.), el tórax abierto y el sistema arterial se perfundió con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo a través del ventrículo izquierdo. Después, la aorta se extrajo con cuidado, se deslizó a lo largo de la línea media ventral desde el arco aórtico hacia abajo de las arterias femorales y se fijó en formalina. Las placas ateroscleróticas ricas en lípidos se tiñeron con Sudan IV (Sigma, Alemania) y la aorta se sujetó en horizontal en una superficie de cera negra. La imagen se capturó con una cámara de video de color Sony DXC-960 MD. El área de la placa así como la superficie aórtica completa se determinaron usando el sistema Phase 3 Imaging (Media Cybernetics).

20

#### G. Eliminación de LDL marcado con $I^{125}$

25

Se ensayaron dos animales por grupo experimental. Se infundió un bolo de LDL marcado con  $I^{125}$  (proporcionado generosamente por Dan Rader, Upenn) lentamente a través de la vena de la cola durante un periodo de 30 segundos (1.000.000 de recuentos de LDL- $[I^{125}]$  diluido en PBS estéril 100  $\mu$ l/animal). En los momentos de 3 min, 30 min, 1,5 h, 3 h, 6 h después de la inyección, se obtuvo una muestra de sangre mediante el plexo retroorbital. El plasma se separó de la sangre completa y se contaron 10  $\mu$ l de plasma en el contador gamma. Finalmente se calculó la tasa catabólica fraccional a partir de los datos de eliminación de lipoproteína.

30

#### H. Evaluación de la acumulación de lípidos en el hígado

35

Se realizó tinción con Oil Red de secciones de hígado congeladas para determinar la acumulación de lípidos. Las secciones de hígado congeladas se aclararon brevemente en agua destilada, seguido de una incubación de 2 minutos en propilenglicol absoluto. Las secciones se tiñeron después en solución de Oil Red (0,5 % en propilenglicol) durante 16 horas, seguido de tinción por contraste con solución de hematoxilina de Mayer durante 30 segundos y se montaron en una solución gelatinosa de glicerina caliente.

40

Para la cuantificación del contenido de colesterol y triglicérido hepático, las secciones de hígado se homogeneizaron y se incubaron en cloroformo/metanol (2:1) durante noche. Después de añadir  $H_2SO_4$  al 0,05 % y de centrifugar durante 10 minutos, la capa inferior de cada muestra se recogió, se dividió en dos alícuotas y se secó con nitrógeno. Para la medición de colesterol, los lípidos secos de la primera alícuota se disolvieron en Triton X-100 al 1 % en cloroformo. Una vez disueltos, la solución se secó con nitrógeno. Después de disolver los lípidos en ddH<sub>2</sub>O e incubar durante 30 minutos a 37 °C, la concentración de colesterol total se midió usando un Kit de Colesterol Total (Wako Diagnostics). Para la segunda alícuota los lípidos secos se disolvieron en KOH alcohólico y se incubaron a 60 °C durante 30 minutos. Después se añadió  $MgCl_2$  1 M, seguido de incubación en hielo durante 10 minutos y centrifugación a 14.000 rpm durante 30 minutos. Finalmente el sobrenadante se evaluó con respecto a los triglicéridos (Wako Diagnostics).

45

50

Todos los vectores pseudotipificados en una cápside de VAA2/8 redujeron el colesterol total, el LDL y los triglicéridos en comparación con el control. Estos vectores de ensayo también corrigieron el fenotipo de hipercolesterolemia de una manera dependiente de la dosis. Se observó una reducción en el área de las placas para los ratones tratados con VAA2/8 en los ratones tratados en el primer ensayo (2 meses) y se observó que el efecto persistía durante todo el experimento (6 meses).

55

#### Ejemplo 7 – Expresión del factor IX funcional y corrección de hemofilia

60

##### A. ratones genosuprimidos (Knock-out)

La expresión del factor IX (FIX) canino funcional se evaluó en ratones con hemofilia B. Se construyeron vectores con cápsides de VAA1, VAA2, VAA5 o VAA8 para suministrar la RTI en dirección 5' del VAA2 - el promotor específico de hígado [LPS] - el FIX canino - el elemento post-regulador de la hepatitis de la marmota (WPRE) - la RTI en 3' del VAA2. Los vectores se construyeron como se describe en Wang *et al.*, 2000, Molecular Therapy 2: 154-158), usando

65

las cápsides apropiadas.

Se generaron ratones genosuprimidos como se describe en Wang *et al*, 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11563-11566. Este modelo imita fielmente los fenotipos de la hemofilia B en el ser humano.

Los vectores de diferentes serotipos se suministraron como una sola inyección intraportal en el hígado de ratones adultos C57B1/6 hemofílicos a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  CG/ratón para los cinco serotipos diferentes y también se suministró un segundo vector de VAA8 a  $1 \times 10^{10}$  CG/ratón. Al grupo de control se le inyectaron  $1 \times 10^{11}$  CG de LacZ3 con TBG en VAA2/8. Cada grupo contenía 5-10 ratones macho y hembra. La sangre de los ratones se extrajo cada dos semanas después de la administración del vector.

#### 1. ELISA

La concentración del FIX canino en el plasma de ratón se determinó mediante un ensayo ELISA específico para el factor IX canino, realizado esencialmente como se describe en Axelrol *et al.*, 1990, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87: 5173-5177 con modificaciones. Se usó anti-factor IX canino de oveja (Enzyme Research Laboratories) como anticuerpo primario y anti-factor IX canino de conejo (Enzyme Research Laboratories) como anticuerpo secundario. Comenzando a las dos semanas después de la inyección, se detectaron niveles plasmáticos aumentados de cFIX en todos los vectores de ensayo. Los niveles aumentados se mantuvieron a niveles terapéuticos a lo largo del experimento, es decir, hasta 12 semanas. Se consideró que los niveles terapéuticos constituían un 5 % de los niveles normales, es decir, aproximadamente 250 ng/ml.

Los niveles de expresión más altos se observaron para el VAA2/8 (a  $10^{11}$ ), con niveles cFIX superfisiológicos mantenidos (diez veces más altos que los niveles normales). Los niveles de expresión para VAA2/8 ( $10^{11}$ ) eran aproximadamente 10 veces más altos que los observados para VAA2/2 y VAA2/8 ( $10^{10}$ ). Los niveles de expresión más bajos, aunque aún por encima del intervalo terapéutico, se observaron para VAA2/5.

#### 2. Ensayo *in vitro* de tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa)

La actividad del factor IX funcional en plasma de los ratones con genosupresión de FIX se determinó mediante un ensayo *in vitro* de tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa). Se recogieron muestras de sangre de ratón del plexo retroorbital en un volumen de 1/10 de tampón citrato. El ensayo de TTPa se realizó como describen Wang *et al*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11563-11566.

Los tiempos de coagulación mediante el TTPa en muestras de plasma de todos los ratones inyectados con el vector, estaban dentro del intervalo normal (aproximadamente 60 s) cuando se midieron dos semanas después de la inyección, y los tiempos de coagulación se mantuvieron en el intervalo normal o más corto que el intervalo normal a lo largo del estudio (12 semanas).

Se observaron tiempos de coagulación mantenidos más bajos en los animales que recibieron VAA2/8 ( $10^{11}$ ). A la semana 12, el VAA2/2 también indujo tiempos de coagulación similares a los de VAA2/8. Sin embargo, este tiempo de coagulación más bajo no se observó para VAA2/2 hasta la semana 12, mientras que se observaron tiempos de coagulación más bajos (en el intervalo de 25 – 40 s) para VAA2/8 comenzando a la semana dos.

La tinción inmunohistoquímica de los tejidos del hígado extraídos de algunos de los ratones tratados se realiza del modo habitual. Aproximadamente el 70-80 % de los hepatocitos se tiñeron positivos para el FIX canino en el ratón inyectado con el vector VAA2/B.cFIX.

#### B. Perros con hemofilia B

Los perros que tienen una mutación puntual en el dominio catalítico del gen F.IX que, basándose en estudios de modelado parecían hacer que la proteína fuese inestable, padecen hemofilia B [Evans *et al*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10095-10099]. Durante más de dos décadas, una colonia de estos perros se ha mantenido en la Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill. Los parámetros homeostáticos de estos perros se describen bien y se incluye la ausencia de antígeno F.IX en plasma, tiempos de coagulación de sangre entera en exceso de 60 minutos, mientras que en los perros normales es de 6-8 minutos, y tiempo de tromboplastina parcial activado prolongado de 50-80 segundos, mientras que en los perros normales es de 13-28 segundos. Estos perros experimentan hemorragias espontáneas recurrentes. Típicamente, los episodios de sangrado significativos se controlaron satisfactoriamente a través de una infusión intravenosa simple de 10 ml/kg de plasma canino normal; ocasionalmente, se requieren infusiones repetidas para controlar el sangrado.

Cuatro perros recibieron inyección intraportal de VAA.cFIX de acuerdo con el siguiente programa. Un primer perro recibió una sola inyección de VAA2/2.cFIX a una dosis de  $3,7 \times 10^{11}$  de copias de genoma (CG)/kg y se sacrificó el día 665 debido a una hemorragia espinal grave. Un segundo perro recibió una primera inyección de VAA2/2.cFIX ( $2,8 \times 10^{11}$  CG/kg), seguido de una segunda inyección de VAA2/2.cFIX ( $2,3 \times 10^{13}$  CG/kg) el día 1180. Un tercer perro recibió una sola inyección de VAA2/2.cFIX a una dosis de  $4,6 \times 10^{12}$  CG/kg. El cuarto perro recibió una inyección de

VAA2/2.cFIX ( $2,8 \times 10^{12}$  CG/kg) y una inyección el día 995 de VAA2/8.cFIX ( $5 \times 10^{12}$  CG/kg).

El abdomen de los perros con hemofilia se abrió aséptica y quirúrgicamente con anestesia general y se administró una sola infusión de vector en la vena porta. Los animales se protegieron de la hemorragia en el periodo perioperativo por administración intravenosa de plasma canino normal. El perro se sedó, se intubó para inducir la anestesia general y el abdomen se rasuró y se preparó. Después de abrir el abdomen, el bazo se extirpó en el campo operativo. La vena esplénica se localizó y se colocó una sutura holgada próxima a la incisión distal pequeña en la vena. Rápidamente, en la vena se insertó un globo de catéter, después la sutura se aflojó y se roscó una cánula de 5 F en una localización intravenosa cerca de la vena porta roscada en una localización intravenosa cerca de la bifurcación de la vena porta. Después se aseguró la hemostasis y el catéter de globo se infló, aproximadamente 5,0 ml de vector diluido en PBS se infundió en la vena porta durante un intervalo de 5 minutos. Después de la infusión del vector se infundieron 5,0 ml de solución salina. A continuación el globo se desinfló, se extrajo la cánula y se aseguró la hemostasis venosa. Después, el bazo se reemplazó, los vasos sangrantes se cauterizaron y se cerró la herida quirúrgica. El tubo se extrajo del animal que había tolerado bien el procedimiento quirúrgico. Las muestras de sangre se analizaron como se describe. [Wang *et al*, 2000, Molecular Therapy 2: 154-158].

Los resultados se resumen en la siguiente tabla. El perro hembra C51, pesaba 13,6 kg y tenía 6,5 meses de vida en el momento de la primera inyección. El perro macho C52, pesaba 17,6 kg y tenía 6,5 meses de vida en la primera inyección; y 17,2 kg y 45,2 meses en la segunda inyección. El perro macho C55, tenía un peso de 19,0 kg y 12,0 meses en la primera inyección. El perro hembra D39 pesada 5,0 kg y tenía 2,8 meses en la primera inyección; 22,6 kg y 35,4 meses de vida en el momento de la segunda inyección. En la tabla, CG se refiere a las copias de genoma de los vectores de VAA. El TCST, fue mayor de 60 minutos (excepto en C52 que fue de 42 minutos) antes de la inyección. El TTPa inicial para C51 fue = 98,4 s, para C52 = 97,7 s; para C55 = 145,1 s y para D39 = 97,8 s. Los sangrados después del tratamiento eran episodios de sangrado espontáneos que se producían en perros con hemofilia B después del tratamiento con el vector de VAA que requerían tratamiento con infusión de plasma.

Perros con hemofilia B inyectados con VAAr a través de la vía intraportal							
	Perro	Vector	Dosis del vector (CG/kg)	Total de CG inyectado	TCST prom. (min)	TTPa prom. (min)	cFIX prom. en plasma (ng/ml)
1ª inyección	C51	VAA2-LSP.cFIX	$3,7 \times 10^{11}$	$5 \times 10^{12}$	$13,2 \pm 2,1$	$77,5 \pm 15,1$	$3,8 \pm 1,0$
	C52	VAA2-LSP.cFIX	$2,8 \times 10^{11}$	$5,0 \times 10^{12}$	$16,1 \pm 3,5$	$81,5 \pm 17,7$	$3,7 \pm 1,1$
	C55	VAA2-LSP.cFIX WPRE	$4,6 \times 10^{12}$	$8,7 \times 10^{13}$	$10,2 \pm 2,2$	$46,4 \pm 6,1$	$259,7 \pm 28,5$
	D39	VAA2-LSPcFIX WPRE	$2,8 \times 10^{12}$	$1,4 \times 10^{13}$	$11,5 \pm 62,6$	$59,1 \pm 6,3$	$34,4 \pm 9,8$
2ª inyección	C52	VAA2/5-LSP.cFIX WPRE	$2,3 \times 10^{13}$	$4,0 \times 10^{14}$	$12,9 \pm 1,1$	$41,9 \pm 2,7$	$817,3 \pm 102,1$
2ª inyección	D39	VAA2/8-LSP.cFIX WPRE	$5,0 \times 10^{12}$	$1,1 \times 10^{14}$	$12,6 \pm 1,5$		$656,9 \pm 1,1$

### 1. Tiempo de coagulación de sangre total (TCST)

El TCST después de inyección con los vectores VAA2/2 era algo variable, oscilando de aproximadamente 6,5 min a 30 min. El TCST para un perro normal es de 6-12 min. Se observaron descensos bruscos en el TCST inmediatamente después de la inyección de los vectores VAA2/8 o VAA2/5. También se observó un descenso brusco en el perro C55 inyectado con VAA2 (d2 = 9 min), y para C51 y C52, los puntos de datos iniciales para el TCST no se comprobaron. Se piensa que el descenso brusco se debe a la infusión de plasma de perro antes y después de la cirugía. El TCST es un ensayo muy sensible a nivel bajo de FIX, no es muy sensible a nivel real de FIX (el TTPa es más relevante).

### 2. Ensayo de TTPa

Los tiempos de coagulación mediante un TTPa en muestras de plasma de todos los perros inyectados con vectores fueron variables durante los primeros aproximadamente 700 días, momento el cual los tiempos de coagulación se igualaron al intervalo normal (40 – 60 s, perro normal: 24-32 s). Se observó un descenso brusco en el intervalo normal después de cada una de las segundas inyecciones (VAA2/8 o VAA2/5). Aunque los tiempos de coagulación no se mantuvieron en el intervalo normal, los tiempos de coagulación se redujeron a niveles por debajo de los observados antes de la segunda inyección.

El TTPa en perros normales era de 24-32 s y en los perros con hemofilia B era de 80-106 segundos. Para los perros C51 y C52, que recibieron una dosis baja de vector VAA2.cFIX, el TTPa promedio después del tratamiento permaneció a 77,5 y 81,5 segundos, sin diferencia significativa con respecto a los perros con hemofilia B sin

tratamiento. Una dosis mayor de VAA2 mejoró el *TTPa* promedio a 59,1 y 46,4 segundos, respectivamente para el perro D39 y el C55. Después del tratamiento con VAA2/5, el *TTPa* promedio para el perro C52 mejoró significativamente de 81,5 a 41,9 segundos. Y para el perro D39, después del tratamiento con VAA2/8, el *TTPa* promedio mejora desde 59,1 segundos.

5

### 3. ELISA del factor IX canino

Los niveles del factor XI canino, cFIX, eran detectables después del primer conjunto de inyecciones, aunque por debajo de los niveles terapéuticos. Después de la inyección de VAA2/8 y VAA2/5, los niveles de cFIX se dispararon en el intervalo terapéutico y después se igualaron dentro del intervalo terapéutico (lo normal es de 5 µg/ml en plasma, el nivel terapéutico es el 5 % del nivel normal que es de 250 ng/ml).

10

Las tres primeras semanas de TCST, el *TTPa* y el antígeno cFIX estaban afectados por la infusión del plasma de perro antes y después de la cirugía. Es complicado llegar a la conclusión de que el descenso del tiempo de coagulación o el aumento del nivel de antígeno cFIX se debe al vector o la infusión de plasma durante las 3 primeras semanas. Sin embargo, es interesante observar que se produce un aumento rápido y drástico del antígeno cFIX, después de la inyección del vector 2/5 y 2/8. Esto es único para los perros inyectados con VAA2/5 y 2/8 y podría atribuirse a los vectores VAA2/5 y 2/8 más que a la infusión de plasma de perro normal, ya que todos los perros recibieron una cantidad similar de infusión de plasma de perro normal para la cirugía. Tres días después de la inyección de VAA2/8, el nivel de cFIX en el plasma del perro D39 alcanzó 9,5 µg/ml y ascendió a 10,4 µg/ml el día 6, tanto como el doble del nivel normal (5 µg/ml). El nivel de cFIX disminuyó gradualmente al promedio de 817 ng/ml (C52, VAA2/5) y de 657 ng/ml (D39, VAA2/8). En el perro C52, 3 días después de la inyección del vector VAA2/5, el nivel de cFIX alcanzó 2,6 µg/ml y ascendió a 4,6 µg/ml el día 7. En el perro C55, que recibió el vector VAA2 a una dosis similar a la del perro D39 inyectado con VAA2/8, ascendió solo a 2,2 µg/ml el día 3, disminuyendo gradualmente después y se mantuvo al 5 % del nivel normal de cFIX.

15

20

25

Las dosis del vector que recibió el perro C55 (VAA2,  $4,6 \times 10^2$  CG/kg) y la segunda inyección en el perro D39 (VAA2/8,  $5 \times 10^{12}$  CG/kg) eran muy parecidas. Sin embargo, los niveles de expresión de cFIX aumentados en D39 por el vector VAA2/8 (promedio 657-34 = 623 ng/ml, 12,5 % del nivel normal) eran 2,5 veces más altos que los de C55 (promedio 259 ng/ml, 5 % del nivel normal). Esto sugiere que VAA2/8 es 2,5 veces más fuerte que VAA2 en perros inyectados por vía intraportal con una dosis similar de vectores. Y en el mismo perro D39, la segunda inyección de dosis dos veces mayores de VAA2/8 aumentó drásticamente el nivel de cFIX de 0,7 % a 13,1 %, 18,7 veces más alto que la primera inyección. Y en C52, la segunda inyección de  $2,3 \times 10^{13}$  CG/ml de vector VAA2/5 dio como resultado un promedio de 817 ng/ml (16,3 % del nivel normal) de cFIX en el plasma. Esto era solo ligeramente más alto (1,3 veces) que el nivel de cFIX aumentado en D39 mediante VAA2/8 (promedio de 623 ng/ml, 12,5 % del nivel normal). Sin embargo, la dosis de VAA2/5 inyectada en el perro C52 fue 4,6 veces más alta que la dosis de VAA2/8 inyectado en el perro D39. Esto sugiere que el vector VAA2/8 también es más fuerte que el vector VAA2/5 en perros.

30

35

La primera inyección de vectores VAA2 no bloqueó el éxito de la transducción con los vectores VAA2/5 y VAA2/8 después de la segunda inyección en perros. La readministración usando un serotipo diferente de vector de VAA puede usarse como una estrategia para tratar animales o seres humanos que previamente se han expuesto a VAA2 o que se han tratado con vectores de VAA2.

40

45

#### Ejemplo 8 – Modelo de ratón de trastorno enzimático de hígado

El vector VAA2/8 generado como se describe en el presente documento se estudió con respecto a su eficacia en la transferencia del gen enzimático de hígado de la ornitina transcarbamilasa (OTC) en un modelo animal aceptado de insuficiencia de OTC [X. Ye *et al*, *Pediatric Research*, 41(4): 527-534 (1997); X. Ye *et al*, *J. Biol. Chem.*, 271(7): 3639-3646 (febrero de 1996)]. Los resultados de este experimento (datos no mostrados) demuestran que se observó que un vector de VAA2/8 de la invención, que llevaba el gen de la ornitina transcarbamilasa (OTC), corregía la insuficiencia de OTC.

50

Aunque la invención se ha descrito con referencia a realizaciones particularmente preferidas, se apreciará que pueden realizarse modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones.

55

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of The University of Pennsylvania Gao, Guangping Wilson, James M. Alvira, Mauricio

60

<120> Secuencias de serotipo 8 del virus adenoasociado (VAA), vectores que las contienen y usos de las mismas

<130> UPN-02733PCT

65

<150> US 60/341.151

ES 2 602 352 T3

<151> 17-12-2001

<150> US 60/377.133

<151>01-05- 2002

5

<150> US 60/386.122

<151> 05-06-2002

<160> 8

10

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 4393

15

<212> ADN

<213> virus adenoasociado de serotipo 8

<400> 1

```

cagagagggga gtggccaact ccatcactag gggtagcgcg aagcgctcc cacgctgccg      60
cgtcagcgct gacgtaaatt acgtcatagg ggagtgggcc tgtattagct gtcacgtgag      120
tgcttttgcg gcattttgcg acaccacgtg gccatttgag gtatatatgg ccgagtgagc      180
gagcaggatc tccattttga ccgcgaaatt tgaacgagca gcagccatgc cgggcttcta      240
cgagatcgtg atcaaggtgc cgagcgacct ggacgagcac ctgccgggca tttctgactc      300
gtttgtgaac tgggtggccg agaaggaatg ggagctgccc ccggattctg acatggatcg      360
gaatctgatc gagcaggcac ccctgaccgt ggccgagaag ctgcagcgcg acttctctggt      420
ccaatggcgc cgcgtgagta aggccccgga ggccctcttc tttgttcagt tcgagaaggg      480
cgagagctac tttcacctgc acgttctggt cgagaccacg ggggtcaagt ccatggtgct      540
aggccgcttc ctgagtcaga ttcgggaaaa gcttgggtcca gaccatctac ccgcggggtc      600
gagccccacc ttgcccaact ggttcgcggt gaccaaagac gcggtaatgg cgccggcggg      660
ggggaacaag gtggtggacg agtgctacat ccccaactac ctctgccc aagactcagcc      720
cgagctgcag tgggcgtgga ctaacatgga ggagtatata agcgcgctgct tgaacctggc      780

```

20

ES 2 602 352 T3

cgagcgcaaa cggctcgtgg cgcagcacct gacccacgtc agccagacgc aggagcagaa 840  
 caaggagaat ctgaacccca attctgacgc gcccgatgatc aggtcaaaaa cctccgcgcg 900  
 ctatatggag ctggtcgggt ggctggtgga ccggggcatc acctccgaga agcagtggat 960  
 ccaggaggac caggcctcgt acatctcctt caacgccgcc tccaactcgc ggtcccagat 1020  
 caaggccgcg ctggacaatg ccggcaagat catggcgctg accaaatccg cgcccgacta 1080  
 cctggtgggg ccctcgtcgc ccgaggacat taccagaac cgcattctacc gcatcctcgc 1140  
 tctcaacggc tacgaccctg cctacgccgg ctccgtcttt ctgggctggg ctcagaaaaa 1200  
 gttcgggaaa cgcaacacca tctggtggtt tggaccgcc accaccgga agaccaacat 1260  
 tgcggaagcc atcgcccacg ccgtgcctt ctacggctgc gtcaactgga ccaatgagaa 1320  
 ctttcccttc aatgattgcg tcgacaagat ggtgatctgg tgggaggagg gcaagatgac 1380  
 ggccaaggtc gtggagtccg ccaaggccat tctcggcggc agcaagggtc gcgtggacca 1440  
 aaagtgcaag tcgtccgccc agatcgacc ccccccggtg atcgtcacct ccaacaccaa 1500  
 catgtgcgcc gtgattgacg ggaacagcac caccttcgag caccagcagc ctctccagga 1560  
 ccggatgttt aagttcgaac tcaccgcgcg tctggagcac gactttggca aggtgacaaa 1620  
 gcaggaagtc aaagagttct tccgctgggc cagtgatcac gtgaccgagg tggcgcatga 1680  
 gttttacgtc agaaagggcg gagccagcaa aagaccgcc cccgatgacg cggataaaaag 1740  
 cgagcccaag cgggcctgcc cctcagtcgc ggatccatcg acgtcagacg cggaggagc 1800  
 tccggtggac tttgcccaca ggtaccaaaa caaatgttct cgtcacgcgg gcatgcttca 1860  
 gatgctgttt ccctgcaaaa cgtgcgagag aatgaatcag aatttcaaca tttgcttcac 1920  
 acacggggtc agagactgct cagagtgttt ccccgccgtg tcagaatctc aaccggtcgt 1980  
 cagaaagagg acgtatcgga aactctgtgc gattcatcat ctgctggggc gggctcccga 2040  
 gattgcttgc tcggcctgcg atctggtcaa cgtggacctg gatgactgtg tttctgagca 2100  
 ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca 2160  
 acctctctga gggcattcgc gagtgggtgg cgctgaaacc tggagccccg aagcccaag 2220  
 ccaaccagca aaagcaggac gacggccggg gtctggtgct tcctggctac aagtacctcg 2280  
 gacccttcaa cggactcgac aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg 2340  
 agcacgacaa ggcctacgac cagcagctgc aggcgggtga caatccgtac ctgcggtata 2400  
 accacgccga cgccgagttt caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc 2460  
 tcgggcgagc agtcttcag gccaaagaagc gggttctcga acctctcggt ctggttgagg 2520

ES 2 602 352 T3

aaggcgctaa gacggctcct ggaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgttctc 2580  
cagactcctc tacgggcatc ggcaagaaag gccaacagcc cgccagaaaa agactcaatt 2640  
ttggtcagac tggcgactca gagtcagttc cagaccctca acctctcgga gaacctccag 2700  
cagcgccctc tgggtgtgga cctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgca ccaatggcag 2760  
acaataacga aggcgcccac ggagtggtta gttcctcggg aaattggcat tgcgattcca 2820  
catggctggg cgacagagtc atcaccacca gcacccgaac ctgggccctg cccacctaca 2880  
acaaccacct ctacaagcaa atctccaacg ggacatcggg aggagccacc aacgacaaca 2940  
cctacttcgg ctacagcacc ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact 3000  
tttcaccacg tgactggcag cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac 3060  
tcagcttcaa gctcttcaac atccaggta aggaggcac gcagaatgaa ggcaccaaga 3120  
ccatcgccaa taacctcacc agcaccatcc aggtgtttac ggactcggag taccagctgc 3180  
cgtacgttct cggctctgcc caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtgttca 3240  
tgattcccca gtacggctac ctaacactca acaacggtag tcaggccgtg ggacgtcct 3300  
ccttctactg cctggaatac tttccttcgc agatgctgag aaccggcaac aacttccagt 3360  
ttacttacac cttcgaggac gtgcctttcc acagcageta cccccacagc cagagcttgg 3420  
accggctgat gaatectctg attgaccagt acctgtacta cttgtctcgg actcaaaaa 3480  
caggaggcac ggcaaatacg cagactctgg gcttcagcca aggtgggcct aatacaatgg 3540  
ccaatcaggc aaagaactgg ctgccaggac cctgttaccg ccaacaacgc gtctcaacga 3600  
caaccgggca aaacaacaat agcaactttg cctggactgc tgggaccaa taccatctga 3660  
atggaagaaa ttcatggct aatcctggca tcgctatggc aacacacaaa gacgacgagg 3720  
agcgtttttt tcccagtaac gggatcctga tttttggcaa acaaaatgct gccagagaca 3780  
atgctgatta cagcgatgac atgctcacca gcgaggaaga aatcaaaacc actaacctg 3840  
tggctacaga ggaatacggc atcgtggcag ataacttgca gcagcaaaac acggctcctc 3900  
aaattggaac tgtcaacagc cagggggcct taccgggtat ggtctggcag aaccgggacg 3960  
tgtacctgca gggcccac tgggccaaga ttctcacac ggacggcaac ttccaccctg 4020  
ctccgctgat gggcggcttt ggccgaaac atcctccgcc tcagatcctg atcaagaaca 4080  
cgctgtacc tgcggatcct ccgaccacct tcaaccagtc aaagctgaac tctttcatca 4140  
cgcaatacag caccggacag gtcagcgtgg aaattgaatg ggagctgcag aaggaaaaca 4200  
gcaagcgctg gaaccccag atccagtaca cctccaacta ctacaaatct acaagtgtgg 4260  
actttgctgt taatacagaa ggcgtgtact ctgaaccccg cccatttggc acccgttacc 4320  
tcaccgtaa tctgtaattg cctgttaatc aataaacggc ttgattcgtt tcagttgaac 4380  
tttggctctc gcg 4393

<210> 2  
<211> 738

ES 2 602 352 T3

<212> PRT

<213> proteína de cápside de virus adenoasociado de serotipo 8

<400> 2

5

```

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1           5           10           15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
          20           25           30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
          35           40           45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50           55           60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65           70           75           80

Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
          85           90           95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
          100          105          110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
          115          120          125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
          130          135          140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145          150          155          160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln

```



Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr  
 405 410 415  
 Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser  
 420 425 430  
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu  
 435 440 445  
 Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly  
 450 455 460  
 Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly  
 485 490 495  
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His  
 500 505 510  
 Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr  
 515 520 525  
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile  
 530 535 540  
 Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val  
 545 550 555 560  
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr  
 565 570 575  
 Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala  
 580 585 590  
 Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val  
 595 600 605  
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile  
 610 615 620

ES 2 602 352 T3

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe  
625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val  
645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe  
660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu  
675 680 685

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr  
690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu  
705 710 715 720

Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg  
725 730 735

Asn Leu

- <210> 3
- <211> 625
- <212> PRT
- <213> proteina rep de virus adenoasociado de serotipo 8
- <400> 3

5

Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp  
1 5 10 15

Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu  
20 25 30

Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Arg Asn Leu Ile  
35 40 45

Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu  
50 55 60

Val Gln Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val

10

ES 2 602 352 T3

65					70					75					80
Gln	Phe	Glu	Lys	Gly	Glu	Ser	Tyr	Phe	His	Leu	His	Val	Leu	Val	Glu
				85					90					95	
Thr	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Met	Val	Leu	Gly	Arg	Phe	Leu	Ser	Gln	Ile
			100					105					110		
Arg	Glu	Lys	Leu	Gly	Pro	Asp	His	Leu	Pro	Ala	Gly	Ser	Ser	Pro	Thr
		115					120					125			
Leu	Pro	Asn	Trp	Phe	Ala	Val	Thr	Lys	Asp	Ala	Val	Met	Ala	Pro	Ala
	130					135					140				
Gly	Gly	Asn	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Cys	Tyr	Ile	Pro	Asn	Tyr	Leu	Leu
145					150					155					160
Pro	Lys	Thr	Gln	Pro	Glu	Leu	Gln	Trp	Ala	Trp	Thr	Asn	Met	Glu	Glu
				165					170					175	
Tyr	Ile	Ser	Ala	Cys	Leu	Asn	Leu	Ala	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu	Val	Ala
			180					185					190		
Gln	His	Leu	Thr	His	Val	Ser	Gln	Thr	Gln	Glu	Gln	Asn	Lys	Glu	Asn
		195					200					205			
Leu	Asn	Pro	Asn	Ser	Asp	Ala	Pro	Val	Ile	Arg	Ser	Lys	Thr	Ser	Ala
	210					215					220				
Arg	Tyr	Met	Glu	Leu	Val	Gly	Trp	Leu	Val	Asp	Arg	Gly	Ile	Thr	Ser
225					230					235					240
Glu	Lys	Gln	Trp	Ile	Gln	Glu	Asp	Gln	Ala	Ser	Tyr	Ile	Ser	Phe	Asn
				245					250					255	
Ala	Ala	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn	Ala
			260					265					270		
Gly	Lys	Ile	Met	Ala	Leu	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Asp	Tyr	Leu	Val	Gly
		275					280					285			
Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Asp	Ile	Thr	Gln	Asn	Arg	Ile	Tyr	Arg	Ile	Leu
	290					295					300				

Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Ala Tyr Ala Gly Ser Val Phe Leu Gly  
 305 310 315 320

Trp Ala Gln Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe Gly  
 325 330 335

Pro Ala Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His Ala  
 340 345 350

Val Pro Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro Phe  
 355 360 365

Asn Asp Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met  
 370 375 380

Thr Ala Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys  
 385 390 395 400

Val Arg Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro Thr  
 405 410 415

Pro Val Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp Gly  
 420 425 430

Asn Ser Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe  
 435 440 445

Lys Phe Glu Leu Thr Arg Arg Leu Glu His Asp Phe Gly Lys Val Thr  
 450 455 460

Lys Gln Glu Val Lys Glu Phe Phe Arg Trp Ala Ser Asp His Val Thr  
 465 470 475 480

Glu Val Ala His Glu Phe Tyr Val Arg Lys Gly Gly Ala Ser Lys Arg  
 485 490 495

Pro Ala Pro Asp Asp Ala Asp Lys Ser Glu Pro Lys Arg Ala Cys Pro  
 500 505 510

Ser Val Ala Asp Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Gly Ala Pro Val Asp  
 515 520 525

ES 2 602 352 T3

Phe Ala Asp Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Ala Gly Met Leu  
 530 535 540

Gln Met Leu Phe Pro Cys Lys Thr Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Phe  
 545 550 555 560

Asn Ile Cys Phe Thr His Gly Val Arg Asp Cys Ser Glu Cys Phe Pro  
 565 570 575

Gly Val Ser Glu Ser Gln Pro Val Val Arg Lys Arg Thr Tyr Arg Lys  
 580 585 590

Leu Cys Ala Ile His His Leu Leu Gly Arg Ala Pro Glu Ile Ala Cys  
 595 600 605

Ser Ala Cys Asp Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Val Ser Glu  
 610 615 620

Gln  
 625

- <210> 4
- <211> 735
- <212> PRT
- <213> virus adenoasociado de serotipo 2
- <400> 4

5

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
 20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala

10



Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
 325 330 335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
 340 345 350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
 355 360 365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
 405 410 415  
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430  
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr  
 435 440 445  
 Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460  
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn  
 485 490 495  
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510  
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp  
 515 520 525  
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr  
580 585 590

Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
595 600 605

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr  
610 615 620

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys  
625 630 635 640

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn  
645 650 655

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
660 665 670

Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys  
675 680 685

Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr  
690 695 700

Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr  
705 710 715 720

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
725 730 735

<210> 5  
<211> 736  
5 <212> PRT  
<213> virus adenoasociado de serotipo 1  
  
<400> 5

10 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

ES 2 602 352 T3

1				5						10					15
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Asp	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro
			20					25					30		
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
		35					40					45			
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro
	50					55					60				
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
65					70					75					80
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala
				85					90					95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
			100					105					110		
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro
		115					120					125			
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
	130					135					140				
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly
145					150				155						160
Lys	Thr	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
				165					170					175	
Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro
			180					185					190		
Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
		195					200					205			
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ala
	210					215					220				
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
225					230					235					240

ES 2 602 352 T3

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His  
 260 265 270  
 Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe  
 275 280 285  
 His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn  
 290 295 300  
 Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln  
 305 310 315 320  
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn  
 325 330 335  
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro  
 340 345 350  
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala  
 355 360 365  
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly  
 370 375 380  
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro  
 385 390 395 400  
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe  
 405 410 415  
 Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp  
 420 425 430  
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg  
 435 440 445  
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser  
 450 455 460

ES 2 602 352 T3

Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn  
 485 490 495  
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn  
 500 505 510  
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys  
 515 520 525  
 Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly  
 530 535 540  
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile  
 545 550 555 560  
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg  
 565 570 575  
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala  
 580 585 590  
 Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595 600 605  
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His  
 610 615 620  
 Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala  
 645 650 655  
 Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr  
 660 665 670  
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln  
 675 680 685

ES 2 602 352 T3

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn  
690 695 700

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu  
705 710 715 720

Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu  
725 730 735

<210> 6  
<211> 736  
<212> PRT  
<213> virus adenoasociado de serotipo 3

5

<400> 6

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Val Pro Gln Pro  
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro  
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro  
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Gly  
130 135 140

Ala Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly  
145 150 155 160

10

ES 2 602 352 T3

Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
 260 265 270  
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
 275 280 285  
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
 290 295 300  
 Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
 305 310 315 320  
 Arg Gly Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
 325 330 335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
 340 345 350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
 355 360 365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
 385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
 405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr  
 435 440 445

Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser  
 450 455 460

Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro  
 465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn  
 485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn  
 500 505 510

Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys  
 515 520 525

Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly  
 530 535 540

Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile  
 545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln  
 565 570 575

Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr  
 580 585 590

Thr Gly Thr Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595 600 605

ES 2 602 352 T3

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His  
610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu  
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala  
645 650 655

Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr  
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln  
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn  
690 695 700

Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val  
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
725 730 735

<210> 7  
<211> 736  
<212> PRT  
<213> virus adenoasociado de serotipo 9

5

<400> 7

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
65 70 75 80

10

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140  
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Ser Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Glu Ala Pro Ser Gly Leu Gly Pro Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn  
 260 265 270  
 Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
 275 280 285  
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn  
 290 295 300

ES 2 602 352 T3

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
 305 310 315 320  
 Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn  
 325 330 335  
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu  
 340 345 350  
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
 355 360 365  
 Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn  
 370 375 380  
 Gly Ser Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr  
 405 410 415  
 Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
 420 425 430  
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val  
 435 440 445  
 Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr Gln Thr Leu Ala Phe Ser  
 450 455 460  
 Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln Ala Arg Asn Trp Val Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Asn Gln Asn  
 485 490 495  
 Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Ala Lys Phe Lys Leu Asn  
 500 505 510  
 Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Ser His Lys  
 515 520 525

ES 2 602 352 T3

Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly  
 530 535 540  
 Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp Tyr Ser Gln Val Leu Ile  
 545 550 555  
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu  
 565 570 575  
 Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala Ala Asn Thr Gln Ala Gln  
 580 585  
 Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595 600 605  
 Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His  
 610 615 620  
 Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala  
 645 650 655  
 Asp Pro Pro Leu Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr  
 660 665 670  
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln  
 675 680 685  
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn  
 690 695 700  
 Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val  
 705 710 715 720  
 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 725 730 735

<210> 8  
 <211> 737  
 <212> PRT  
 <213> virus adenoasociado de serotipo 7  
 <400> 8

5

ES 2 602 352 T3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser  
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Ala Lys Lys Arg  
130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile  
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln  
165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro  
180 185 190

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Val Gly Ser Gly Thr Val Ala Ala Gly Gly  
195 200 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn  
210 215 220

ES 2 602 352 T3

Ala Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val  
 225 230 235 240

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His  
 245 250 255

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Glu Thr Ala Gly Ser Thr Asn Asp Asn  
 260 265 270

Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
 275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn  
 290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Arg Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
 305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn  
 325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu  
 340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
 355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn  
 370 375 380

Gly Ser Gln Ser Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Ser  
 405 410 415

Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
 420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ala  
 435 440 445

Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala Gly Asn Arg Glu Leu Gln  
 450 455 460

Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala Glu Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Leu Asp  
 485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His  
 500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr  
 515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile  
 530 535 540

Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr Thr Leu Glu Asn Val Leu  
 545 550 555 560

Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu  
 565 570 575

Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Ala Ala Asn Thr Ala Ala  
 580 585 590

Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp  
 595 600 605

Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro  
 610 615 620

His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly  
 625 630 635 640

Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro  
 645 650 655

Ala Asn Pro Pro Glu Val Phe Thr Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile  
 660 665 670

Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu



## REIVINDICACIONES

1. Un vector de virus adenoasociado (VAA) que comprende una cápside de VAA que comprende al menos una proteína de cápside vp3 de VAA8 que tiene una secuencia que comprende los aminoácidos 204 a 738 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos 95 % o a al menos 99 % a esta, teniendo dicha cápside empaquetado en su interior un minigén que tiene una secuencia de repetición terminal invertida de VAA y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora.
2. El VAA de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cápside de VAA comprende al menos una proteína de cápside vp2 de VAA que tiene una secuencia que comprende los aminoácidos 138 a 738 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos 95 % o idéntica a al menos 99 % a esta.
3. El VAA de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cápside de VAA comprende al menos una proteína de cápside vp1 de VAA8 que tiene una secuencia que comprende los aminoácidos 1 a 738 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos 95 % o idéntica a al menos 99 % a esta.
4. Un vector de virus adenoasociado (VAA) que comprende una cápside de VAA que comprende al menos una proteína de cápside vp1 de VAA8 que tiene una secuencia que comprende los aminoácidos 1 a 738 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos 95 % o idéntica a al menos 99 % a esta, teniendo dicha cápside empaquetado en su interior un minigén que tiene una secuencia de repetición terminal invertida de VAA y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora.
5. El VAA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cápside de VAA comprende una proteína codificada por una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo constituido por:
- vp1, nt 2121 a 4337;  
vp2, nt 2532 a 4337; y  
vp3, nt 2730 a 4337,
- en el que los números de los nucleótidos son de VAA8, SEQ ID NO: 1.
6. El VAA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que VAA se produce por vía recombinante.
7. El VAA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las repeticiones terminales invertidas son de un VAA diferente de VAA8, proporcionando de este modo un VAA pseudotipificado.
8. El VAA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los elementos de control de expresión comprenden un promotor específico de tejido.
9. El VAA de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el promotor específico de tejido es un promotor específico de hígado.
10. Un método de generación de un virus adenoasociado (VAA) recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende una cápside de serotipo de VAA que comprende las etapas de cultivar una célula hospedadora que contenga: (a) una molécula que codifique una cápside de VAA que comprenda al menos una proteína de cápside vp3 de VAA8 que tenga una secuencia que comprenda los aminoácidos 204 a 738 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos 95 % a esta; (b) un gen rep funcional; (c) un minigén que comprenda repeticiones terminales invertidas (RTI) de VAA y un gen heterólogo; y (d) funciones auxiliares suficientes para permitir el empaquetado del minigén en la proteína de cápside de VAA.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el gen rep funcional codifica una proteína rep de VAA8 o un fragmento de la misma seleccionado del grupo constituido por:
- aa 1 a 625; aa 1 a 102; aa 103 a 140; aa 141 a 173; aa 174 a 226; aa 227 a 275; aa 276 a 374; aa 375 a 383; aa 384 a 446; aa 447 a 542; aa 543 a 555 y aa 556 a 625, de SEQ ID NO: 3.
12. Una célula hospedadora de empaquetado útil en la generación de un virus adenoasociado (VAA) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, conteniendo dicha célula hospedadora: una molécula que codifique una proteína de cápside de VAA que tenga una proteína de cápside vp3 de VAA8 que tenga una secuencia que comprenda los aminoácidos 204 a 738 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos 95 % a esta; un minigén que tenga una secuencia de repetición terminal invertida de VAA y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora; y un gen rep funcional.

13. Una célula hospedadora en cultivo que contiene un virus adenoasociado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 5 14. Una composición que comprende al menos un VAA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 y un transportador fisiológicamente compatible.
- 10 15. Una composición que comprende al menos un vector de virus adenoasociado (VAA) y un transportador fisiológicamente compatible, comprendiendo el vector de VAA una cápside de VAA que comprende al menos una proteína de cápside vp3 de VAA8 que tiene una secuencia que comprende los aminoácidos 204 a 738 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos 95 % o idéntica a al menos 99 % a esta, teniendo dicha cápside empaquetado en su interior un minigén que tiene una secuencia de repetición terminal invertida de VAA y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora.
- 15 16. Una composición que comprende al menos un vector de virus adenoasociado (VAA) y un transportador fisiológicamente compatible, comprendiendo el vector de VAA al menos una proteína de cápside vp1 de VAA8 que tiene una secuencia que comprende los aminoácidos 1 a 738 de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos idéntica a al menos 95 % o idéntica a al menos 99 % a esta, teniendo dicha cápside empaquetado en su interior un minigén que tiene una secuencia de repetición terminal invertida de VAA y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora.
- 20 17. Un virus adenoasociado (VAA) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, para su uso en el suministro de un gen heterólogo a una célula.
- 25 18. El VAA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 17, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el gen heterólogo se selecciona del grupo que consiste en una secuencia del Factor VIII, una secuencia de alfa-1 antitripsina y una secuencia de VIH.
- 30 19. El VAA o la composición de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el gen heterólogo es una secuencia de Factor VIII.
20. El VAA o la composición de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el gen heterólogo codifica el Factor IX.
- 35 21. El VAA o la composición de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el gen heterólogo codifica el Factor IX y el VAA es para su uso en el tratamiento de hemofilia.
- 40 22. El VAA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 17, o una composición con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el gen heterólogo codifica una inmunoglobulina, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena simple.
- 45 23. El VAA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 17, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el gen heterólogo codifica una ornitina transcarbamilasa (OTC).
- 50 24. El VAA o la composición de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el gen heterólogo codifica una OTC y el VAA es para su uso en el tratamiento de insuficiencia de OTC.
- 55 25. El VAA de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 17, o una composición con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el gen heterólogo codifica un receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLr).
- 60 26. El VAA o la composición de acuerdo con la reivindicación 25, en el que el gen heterólogo codifica un receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLr) y el VAA es para su uso en el tratamiento de hipercolesterolemia.
- 65 27. El VAA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 17, o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el gen heterólogo codifica insulina, glucagón, hormona del crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor de liberación de la hormona del crecimiento (GRF), hormona estimuladora de folículos (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina humana coriónica (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina, angiostatina, factor de estimulación de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de insulina I (IGF-I) y factor de crecimiento de insulina II (IGF-II), TGF $\alpha$ , activina, inhibina, proteínas morfogénicas óseas (BMP) 1 a 15, herregulina/neurregulina/ARIA/factor de diferenciación neu (NDF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina NT-3, neurotrofina NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF), neurturina, agrina, semaforina/colapsina, netrina-1, netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrina, nogina, erizo sónico, tirosina hidroxilasa, interleucinas (IL) 1 a

18, proteína quimioatrayente de monocitos, factor inhibidor de leucemia, factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos, ligando de Fas, factores de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ , interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factor de células madre, ligando de fkl-2/flt3, proteína reguladora de complemento, proteínas de cofactor de membrana (MCP), factor acelerador de la descomposición (DAF), CR1, CF2, CD59, una hormona, un factor de crecimiento, una citocina, una linfocina, un receptor de glucocorticoides, un receptor de estrógenos, un receptor de Vitamina D, jun, fos, max, mad, 5 factor de respuesta a suero (SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD y miogenina, una proteína que contiene la caja ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, una proteína que se une a la caja CCAAT, factor de regulación de interferón (IRF-1), proteína de tumor de Wilms, una proteína que se une a ETS, STAT, una proteína que se une a la caja GATA, una proteína de hélice alada de la familia forkhead, carbamoil 10 sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, cistationa beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, beta-glucosidasa, piruvato carboxilato, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, una secuencia reguladora transmembrana de 15 fibrosis quística (CFTR) o una secuencia de ADNc de distrofina.

FIG. 1A

cagagagggga	gtggccaact	ccatcactag	gggtagcgcg	aagcgctcc	cacgctgccg	60
cgtcagcgct	gacgtaaatt	acgtcatagg	ggagtgggtcc	tgtattagct	gtcacgtgag	120
tgcttttgcg	gcattttgcg	acaccacgtg	gccatttgag	gtatatatgg	ccgagtgagc	180
Rep68/78 inicio						
gagcaggatc	tccattttga	ccgcgaaatt	tgaacgagca	gcagccatgc	cgggcttcta	240
cgagatcgtg	atcaaggtgc	cgagcgacct	ggacgagcac	ctgccgggca	tttctgactc	300
gtttgtgaac	tgggtggccg	agaaggaatg	ggagctgccc	ccggattctg	acatggatcg	360
gaatctgata	gagcaggcac	ccctgacctg	ggccgagaag	ctgcagcgcg	acttcctggt	420
ccaatggcgc	cgcgtgagta	aggccccgga	ggccctcttc	tttgttcagt	tcgagaaggg	480
cgagagctac	tttcacctgc	acgttctggt	cgagaccacg	ggggtcaagt	ccatgggtgct	540
aggccgcttc	ctgagtcaga	ttcgggaaaa	gcttgggtcca	gaccatctac	ccgcgggggtc	600
gagccccacc	ttgcccaact	ggttcgcggt	gaccaaagac	gcggtaatgg	cgccggcggg	660
ggggaacaag	gtggtggacg	agtgctacat	ccccactac	ctcctgcca	agactcagcc	720
cgagctgcag	tgggcgtgga	ctaacatgga	ggagtatata	agcgcgtgct	tgaacctggc	780
cgagcgcaaa	cggtcgtgg	cgcagcacct	gaccacgtc	agccagacgc	aggagcagaa	840
caaggagaat	ctgaacccca	attctgacgc	gcccgtgatc	aggtcaaaaa	cctccgcgcg	900
Rep40/52 inicio						
ctatatggag	ctggtcgggt	ggctgggtgga	ccggggcatc	acctccgaga	agcagtggat	960
ccaggaggac	caggcctcgt	acatctcctt	caacgccgcc	tccaactcgc	ggtcccagat	1020
caaggccgcg	ctggacaatg	ccggcaagat	catggcgctg	accaaaccg	cgcccgacta	1080
cctggtgggg	ccctcgtgct	ccgcggacat	taccagaac	cgcatctacc	gcatcctcgc	1140
tctcaacggc	tacgacctg	cctacgccgg	ctcctctttt	ctcggctggg	ctcagaaaaa	1200
gttcgggaaa	cgcaacacca	tctggctggt	tggaccgcc	accaccggca	agaccaacat	1260
tgcggaagcc	atcgcccacg	ccgtgccctt	ctacggctgc	gtcaactgga	ccaatgagaa	1320
ctttcccttc	aatgattgcg	tcgacaagat	ggtgatctgg	tgggaggagg	gcaagatgac	1380
ggccaaggtc	gtggagtccg	ccaaggccat	tctcggcggc	agcaagggtc	gcgtggacca	1440
aaagtgcaag	tcgtccgcc	agatcgacco	cacccccgtg	atcgtcacct	ccaacaccaa	1500

FIG. 1B

catgtgcgcc	gtgattgacg	ggaacagcac	caccttcgag	caccagcagc	ctctccagga	1560
ccggatgttt	aagtccgaac	tcacccgccg	tctggagcac	gactttggca	aggtgacaaa	1620
gcaggaagtc	aaagagttct	tccgctgggc	cagtgatcac	gtgaccgagg	tggcgcatga	1680
gttttacgtc	agaaagggcg	gagccagcaa	aagaccgcc	cccgatgacg	cggataaaaag	1740
cgagcccaag	cgggcctgcc	cctcagtcgc	ggatccatcg	acgtcagacg	cggaaggagc	1800
tccggtggac	tttgccgaca	ggtaccaaaa	caaatgttct	cgtcacgcgg	gcatgcttca	1860
gatgctgttt	ccctgcaaaa	cgtgcgagag	aatgaatcag	aatttcaaca	tttgcttcac	1920
acacggggtc	agagactgct	cagagtgttt	ccccggcgtg	tcagaatctc	aaccggtcgt	1980
cagaaagagg	acgtatcgga	aactctgtgc	gattcatcat	ctgctggggc	gggctcccga	2040
gattgcttgc	tcggcctgcg	atctggtcaa	cgtggacctg	gatgactgtg	tttctgagca	2100
<u>ataaatgact</u>	taaaccaggt	<u>atggctgccg</u>	atggttatct	tccagattgg	ctcgaggaca	2160
acctctctga	gggcattcgc	gagtgggtggg	cgctgaaacc	tggagccccg	aagcccaaaag	2220
ccaaccagca	aaagcaggac	gacggccggg	gtctggtgct	tcctggctac	aagtacctcg	2280
gacccttcaa	cggactcgac	aagggggagc	ccgtcaacgc	ggcggacgca	gcggccctcg	2340
agcacgacaa	ggcctacgac	cagcagctgc	aggcgggtga	caatccgtac	ctgcggtata	2400
accacgccga	cgccgagttt	caggagcgtc	tgcaagaaga	tacgtctttt	gggggcaacc	2460
tcgggcgagc	agtcttccag	gccaagaagc	gggttctcga	acctctcggt	ctggttgagg	2520
aaggcgctaa	<u>gacggctcct</u>	ggaaagaaga	gaccggtaga	gccatcacc	cagcgttctc	2580
cagactcttc	tacgggcatc	ggcaagaaag	gccaacagcc	cgccagaaaa	agactcaatt	2640
ttggtcagac	tggcgactca	gagtcagttc	cagaccctca	acctctcgga	gaacctccag	2700
cagcgccttc	tggtgtggga	cctaatacaa	<u>tggctgcagg</u>	cggtggcgca	ccaatggcag	2760
acaataacga	aggcgccgac	ggagtgggta	gttcctcggg	aaattggcat	tgcgattcca	2820
catggctggg	cgacagagtc	atcaccacca	gcacccgaac	ctgggcccctg	cccacctaca	2880
acaaccacct	ctacaagcaa	atctccaacg	ggacatcggg	aggagccacc	aacgacaaca	2940

FIG. 1C

cctacttcgg	ctacagcacc	ccctgggggt	atthtgactt	taacagattc	cactgccact	3000
tttcaccacg	tgactggcag	cgactcatca	acaacaactg	gggattccgg	cccaagagac	3060
tcagcttcaa	gctcttcaac	atccagggtca	aggagggtcac	gcagaatgaa	ggcaccaaga	3120
ccatcgccaa	taacctcacc	agcaccatcc	aggtgtttac	ggactcggag	taccagctgc	3180
cgtacgttct	cggtctgccc	caccaggggt	gcctgcctcc	gttcccggcg	gacgtgttca	3240
tgattcccca	gtacggctac	ctaactca	acaacggtag	tcaggccgtg	ggacgctcct	3300
ccttctactg	cctggaatac	tttccttcgc	agatgctgag	aaccggcaac	aacttccagt	3360
ttacttacac	cttcgaggac	gtgcctttcc	acagcagcta	cgcccacagc	cagagcttgg	3420
accggctgat	gaatcctctg	attgaccagt	acctgtacta	cttgtctcgg	actcaaacia	3480
caggaggcac	ggcaaatacg	cagactctgg	gcttcagcca	aggtgggcct	aatacaatgg	3540
ccaatcaggc	aaagaactgg	ctgccaggac	cctgttaccg	ccaacaacgc	gtctcaacga	3600
caaccgggca	aaacaacaat	agcaactttg	cctggactgc	tgggaccaa	taccatctga	3660
atggaagaaa	ttcattggct	aatcctggca	tcgctatggc	aacacacaaa	gacgacgagg	3720
agcgtttttt	tcccagtaac	gggatcctga	tttttggcaa	acaaaatgct	gccagagaca	3780
atgctggatta	cagcgatgtc	atgctcacca	gcgaggaaga	aatcaaaacc	actaacctg	3840
tggctacaga	ggaatacggc	atcgtggcag	ataacttga	gcagcaaac	acggctcctc	3900
aaattggaac	tgtcaacagc	cagggggcct	taccgggtat	ggtctggcag	aaccgggacg	3960
tgtacctgca	gggtccatc	tgggccaaga	ttcctcacac	ggacggcaac	ttccaccctg	4020
ctccgctgat	gggcggttt	ggcctgaaac	atcctccgcc	tcagatcctg	atcaagaaca	4080
cgctgtacc	tgcggatcct	ccgaccacct	tcaaccagtc	aaagctgaac	tctttcatca	4140
cgcaatacag	caccggacag	gtcagcgtgg	aaattgaatg	ggagctgcag	aaggaaaaca	4200
gcaagcgtg	gaaccccgag	atccagtaca	cctccaacta	ctacaaatct	acaagtgtgg	4260
actttgctgt	taatacagaa	ggcgtgtact	ctgaaccccc	ccccattggc	accggttacc	4320
tcaccgtaa	tctg <u>taattg</u>	cctgttaatc	<u>aataa</u> accgg	ttgattcgtt	tcagttgaac	4380
tttggctctct	gcg					4393

vp1-3 terminaci3n      poliA

Fig. 2A

	1				50
AAV_2	MAADGYLPDW	LEDTLSEGIR	QWWKLKPGPP	PPKPAERHKD	DSRGLVLPGY
AAV_7	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWDDLKPGAP	KPKANQQKQD	NGRGLVLPGY
AAV_8	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWWALKPGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPGY
AAV_1	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWDDLKPGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPGY
AAV_3	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWWALKPGVP	QPKANQQHQD	NRRLVLPGY
AAV_9	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWDDLKPGAP	<u>KPKANQQKQD</u>	DGRGLVLPGY
	51				100
AAV_2	KYLGPFNGLD	KGEPVNEADA	AALEHDKAYD	RQLDSGDNPY	LKYNHADAEF
AAV_7	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LRYNHADAEF
AAV_8	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLQAGDNPY	LRYNHADAEF
AAV_1	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LRYNHADAEF
AAV_3	KYLGPFNGLD	KGEPVNEADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LKYNHADAEF
AAV_9	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	<u>QQLKAGDNPY</u>	LRYNHADAEF
	101				150
AAV_2	QERLKEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEPVKTAP	GKKRPVEHSP
AAV_7	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEGAKTAP	AKKRPVEPSP
AAV_8	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEGAKTAP	GKKRPVEPSP
AAV_1	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEGAKTAP	GKKRPVEQSP
AAV_3	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRILEPLG	LVEEAAKTAP	GKKGAVDQSP
AAV_9	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEGAKTAP	<u>GKKRPVEQSP</u>
	151				200
AAV_2	.VEPDSSTGI	GKAGQQPARK	RLNFGQTGDA	DSVPDPQPLG	QPPAAPSGLG
AAV_7	QRSPDSSTGI	GKKGQQPARK	RLNFGQTGDS	ESVPDPQPLG	EPPAAPSSVG
AAV_8	QRSPDSSTGI	GKKGQQPARK	RLNFGQTGDS	ESVPDPQPLG	EPPAAPSGVG
AAV_1	.QEPDSSSGI	GKTGQQPAKK	RLNFGQTGDS	ESVPDPQPLG	EPPATPAAVG
AAV_3	.QEPDSSSGV	GKSGKQPARK	RLNFGQTGDS	ESVPDPQPLG	EPPAAPTSLG
AAV_9	QE. <u>PDS</u> SSGI	<u>GKSG</u> QQPAKK	RLNFGQTGDS	ESVPDPQPLG	EPPEAP <u>PSGLG</u>
	201				250
AAV_2	TNTMATGSGA	PMADNNEGAD	GVGNSGNWH	CDSTWMDRV	ITTSTRTWAL
AAV_7	SGTVAAGGGA	PMADNNEGAD	GVGNASGNWH	CDSTWLGDRV	ITTSTRTWAL
AAV_8	PNTMAAGGGA	PMADNNEGAD	GVGSSGNWH	CDSTWLGDRV	ITTSTRTWAL
AAV_1	PTTMASGGGA	PMADNNEGAD	GVGNASGNWH	CDSTWLGDRV	ITTSTRTWAL
AAV_3	SNTMASGGGA	PMADNNEGAD	GVGNSGNWH	CDSQWLDRV	ITTSTRTWAL
AAV_9	PNT <u>MA</u> SGGGA	PMADNNEGAD	GVGNSGNWH	CDSTWLGDRV	ITTSTRTWAL
	251				300
AAV_2	PTYNNHLYKQ	ISSQS--GAS	NDNHYFGYST	PWGYFDNRF	HCHFSPRDWQ
AAV_7	PTYNNHLYKQ	ISSETA-GST	NDNTYFGYST	PWGYFDNRF	HCHFSPRDWQ
AAV_8	PTYNNHLYKQ	ISNGTSGGAT	NDNTYFGYST	PWGYFDNRF	HCHFSPRDWQ
AAV_1	PTYNNHLYKQ	ISSAST.GAS	NDNHYFGYST	PWGYFDNRF	HCHFSPRDWQ
AAV_3	PTYNNHLYKQ	ISSQS.GAS	NDNHYFGYST	PWGYFDNRF	HCHFSPRDWQ
AAV_9	PTYNNHLYKQ	ISNGTSGG <u>ST</u>	<u>NDNTY</u> FGYST	PWGYFDNRF	HCHFSPRDWQ

Fig. 2B

	301				350
AAV_2	RLINNNWGFR	PKRLNFKLFN	IQVKEVTQND	GTTTIANNLT	STVQVFTDSE
AAV_7	RLINNNWGFR	PKKLRFKLFN	IQVKEVTTND	GVTTIANNLT	STIQVFSOSE
AAV_8	RLINNNWGFR	PKRLSFKLFN	IQVKEVTQNE	GTKTIANNLT	STIQVFTDSE
AAV_1	RLINNNWGFR	PKRLNFKLFN	IQVKEVTTND	GVTTIANNLT	STVQVFSOSE
AAV_3	RLINNNWGFR	PKKLSFKLFN	IQVRGVTQND	GTTTIANNLT	STVQVFTDSE
AAV_9	RLINNNWGFR	PKRLNFKLFN	IQVKEVTTNE	GTKTIANNLT	STVQVFTDSE
	351				400
AAV_2	YQLPYVLGSA	HQGCLPPFPA	DVFMVPQYGY	LTLNNGSQAV	GRSSFYCLEY
AAV_7	YQLPYVLGSA	HQGCLPPFPA	DVFMIPQYGY	LTLNNGSQSV	GRSSFYCLEY
AAV_8	YQLPYVLGSA	HQGCLPPFPA	DVFMIPQYGY	LTLNNGSQAV	GRSSFYCLEY
AAV_1	YQLPYVLGSA	HQGCLPPFPA	DVFMIPQYGY	LTLNNGSQAV	GRSSFYCLEY
AAV_3	YQLPYVLGSA	HQGCLPPFPA	DVFMVPQYGY	LTLNNGSQAV	GRSSFYCLEY
AAV_9	YQLPYVLGSA	HQGCLPPFPA	DVFMVPQYGY	LTLNNGSQAL	GRSSFYCLEY
	401				450
AAV_2	FPSQMLRTGN	NFTFSYTFED	VPFHSSYAHS	QSLDRLMNPL	IDQYLYYLSR
AAV_7	FPSQMLRTGN	NFEFSYSFED	VPFHSSYAHS	QSLDRLMNPL	IDQYLYYLAR
AAV_8	FPSQMLRTGN	NFOFTYTFED	VPFHSSYAHS	QSLDRLMNPL	IDQYLYYLSR
AAV_1	FPSQMLRTGN	NFTFSYTFEE	VPFHSSYAHS	QSLDRLMNPL	IDQYLYYLSR
AAV_3	FPSQMLRTGN	NFOFSYTFED	VPFHSSYAHS	QSLDRLMNPL	IDQYLYYLSR
AAV_9	FPSQMLRTGN	NFOFSYTFED	VPFHSSYAHS	QSLDRLMNPL	IDQYLYYLSR
	451				500
AAV_2	TNTPSG.TTT	QSRLQFSQAG	ASDIRDQS	RNWLPGPCYRQQ	RVSKTSADNN
AAV_7	TQSNPGGTAG	NRELQFYQGG	PSTMAEQA	KNWLPGPCFRQQ	RVSKTLDQNN
AAV_8	TQTTGG.TAN	TQTLGFSQGG	PNTMANQA	KNWLPGPCYRQQ	RVSTTTGQNN
AAV_1	TQ.NQSGSAQ	NKDLESRGS	PAGMSVQP	KNWLPGPCYRQQ	RVSKTKTDNN
AAV_3	TQGTTSGTTN	QSRLLESQAG	POSMSLQA	RNWLPGPCYRQQ	RLSKTANDNN
AAV_9	<u>TQTTGG</u> .TGG	<u>TQTLAESQAG</u>	<u>PSSMANQA</u>	<u>RNWVPGPCYRQQ</u>	<u>RVSTTTNQNN</u>
	501				550
AAV_2	NSEYSWTGAT	KYHLNGRDSL	VNPGPAMASH	KDDEEKFFPQ	SGVLIFGKQG
AAV_7	NSNFAWTGAT	KYHLNGRNSL	VNPGVAMATH	KDDEDRFFPS	SGVLIFGKQG
AAV_8	NSNFAWTAGT	KYHLNGRNSL	ANPGIAMATH	KDDEERFFPS	NGILIFGKQN
AAV_1	NSNFTWTGAS	KYNLNGRESI	INPGTAMASH	KDDEDKFFPM	SGVMIFGKES
AAV_3	NSNFPWTAAS	KYHLNGRDSL	VNPGPAMASH	KDDEEKFFPM	HGNLIFGKEG
AAV_9	<u>NSNFAWTGAA</u>	<u>KFKLNGRDSL</u>	<u>MNPGVAMASH</u>	<u>KDDEDRFFPS</u>	<u>SGVLIFGKQG</u>
	551				600
AAV_2	SEKTNVDIEK	VMITDEEEIR	T TNPVATEQY	GSVSTNLQRG	NRQAATADVN
AAV_7	ATNKTT-LEN	VMTNEEEIR	P TNPVATEEY	GIVSSNLQAA	NTAAQTQVVN
AAV_8	AARDNADYSD	VMLTSEEEIK	T TNPVATEEY	GIVADNLQQQ	NTAPQIGTVN
AAV_1	AGASNTALDN	VMITDEEEIK	A TNPVATERF	GTAVVNFQSS	STDPATGDVH
AAV_3	TTASNAELDN	VMITDEEEIR	T TNPVATEQY	GTVANLQSS	NTAPTGTGVN
AAV_9	AGNDGVDYSQ	<u>VLITDEEEIK</u>	A TNPVATEEY	<u>GAVAINNQAA</u>	NTQAQTGLVH

Fig. 2C

	601				650
AAV_2	TQGVLPGMVW	QDRDVYLQGP	IWAKIPHTDG	HFHPSPLMGG	FGLKHPPPQI
AAV_7	NQGALPGMVW	QNRDVYLQGP	IWAKIPHTDG	NFHPSPLMGG	FGLKHPPPQI
AAV_8	SQGALPGMVW	QNRDVYLQGP	IWAKIPHTDG	NFHPSPLMGG	FGLKHPPPQI
AAV_1	AMGALPGMVW	QDRDVYLQGP	IWAKIPHTDG	HFHPSPLMGG	FGLKNPPPQI
AAV_3	HQGALPGMVW	QDRDVYLQGP	IWAKIPHTDG	HFHPSPLMGG	FGLKHPPPQI
AAV_9	NQGVIPGMVW	QNRDVYLQGP	IWAKIPHTDG	NFHPSPLMGG	FGLKHPPPQI
	651				700
AAV_2	LIKNTPVPA	NPSTTFSAAKF	ASFITQYSTG	QVSVEIEWEL	QKENSKRWNP
AAV_7	LIKNTPVPA	NPPEVETPAKF	ASFITQYSTG	QVSVEIEWEL	QKENSKRWNP
AAV_8	LIKNTPVPA	DPPTTFNQSKL	NSFITQYSTG	QVSVEIEWEL	QKENSKRWNP
AAV_1	LIKNTPVPA	NPPAEFSATKF	ASFITQYSTG	QVSVEIEWEL	QKENSKRWNP
AAV_3	MIKNTPVPA	NPPTTFSPAKF	ASFITQYSTG	QVSVEIEWEL	QKENSKRWNP
AAV_9	LIKNTPVPA	<u>DE</u> PL <u>TEN</u> Q <u>AKL</u>	NSFITQYSTG	QVSVEIEWEL	QKENSKRWNP
	701				739
AAV_2	EIQYTSNYNK	SVNVDFTVDT	NGVYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV_7	EIQYTSNF EK	QTGVDFAVDS	QGVYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV_8	EIQYTSNYYK	STSVDFAVNT	EGVYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV_1	EVQYTSNYAK	SANVDFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV_3	EIQYTSNYNK	SVNVDFTVDT	NGVYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV_9	EIQYTSNYYK	<u>STNV</u> DFAVNT	<u>EG</u> VYSEPRPI	GTRYLTRNL	

Fig. 3A

Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp  
 1 5 10 15

Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu  
 20 25 30

Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Arg Asn Leu Ile  
 35 40 45

Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu  
 50 55 60

Val Gln Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val  
 65 70 75 80

Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Leu His Val Leu Val Glu  
 85 90 95

Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile.  
 100 105 110

Arg Glu Lys Leu Gly Pro Asp His Leu Pro Ala Gly Ser Ser Pro Thr  
 115 120 125

Leu Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Asp Ala Val Met Ala Pro Ala  
 130 135 140

Gly Gly Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu Leu  
 145 150 155 160

Pro Lys Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu Glu  
 165 170 175

Tyr Ile Ser Ala Cys Leu Asn Leu Ala Glu Arg Lys Arg Leu Val Ala  
 180 185 190

Gln His Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu Asn  
 195 200 205

Leu Asn Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser Ala  
 210 215 220

Fig. 3B

Arg Tyr Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Arg Gly Ile Thr Ser  
 225 230 235 240

Glu Lys Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe Asn  
 245 250 255

Ala Ala Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Ala Ala Leu Asp Asn Ala  
 260 265 270

Gly Lys Ile Met Ala Leu Thr Lys Ser Ala Pro Asp Tyr Leu Val Gly  
 275 280 285

Pro Ser Leu Pro Ala Asp Ile Thr Gln Asn Arg Ile Tyr Arg Ile Leu  
 290 295 300

Ala Leu Asn Gly Tyr Asp Pro Ala Tyr Ala Gly Ser Val Phe Leu Gly  
 305 310 315 320

Trp Ala Gln Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe Gly  
 325 330 335

Pro Ala Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His Ala  
 340 345 350

Val Pro Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro Phe  
 355 360 365

Asn Asp Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met  
 370 375 380

Thr Ala Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys  
 385 390 395 400

Val Arg Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro Thr  
 405 410 415

Pro Val Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp Gly  
 420 425 430

Asn Ser Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe  
 435 440 445

Fig. 3C

Lys Phe Glu Leu Thr Arg Arg Leu Glu His Asp Phe Gly Lys Val Thr  
 450 455 460

Lys Gln Glu Val Lys Glu Phe Phe Arg Trp Ala Ser Asp His Val Thr  
 465 470 475 480

Glu Val Ala His Glu Phe Tyr Val Arg Lys Gly Gly Ala Ser Lys Arg  
 485 490 495

Pro Ala Pro Asp Asp Ala Asp Lys Ser Glu Pro Lys Arg Ala Cys Pro  
 500 505 510

Ser Val Ala Asp Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Gly Ala Pro Val Asp  
 515 520 525

Phe Ala Asp Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Ala Gly Met Leu  
 530 535 540

Gln Met Leu Phe Pro Cys Lys Thr Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Phe  
 545 550 555 560

Asn Ile Cys Phe Thr His Gly Val Arg Asp Cys Ser Glu Cys Phe Pro  
 565 570 575

Gly Val Ser Glu Ser Gln Pro Val Val Arg Lys Arg Thr Tyr Arg Lys  
 580 585 590

Leu Cys Ala Ile His His Leu Leu Gly Arg Ala Pro Glu Ile Ala Cys  
 595 600 605

Ser Ala Cys Asp Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Val Ser Glu  
 610 615 620

Gln  
 625