

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 610**

51 Int. Cl.:

C07K 14/015 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2008 PCT/EP2008/004365**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2008 WO08145400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2008 E 08758934 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2158211**

54 Título: **Proteína estructural mutada de un parvovirus**

30 Prioridad:

31.05.2007 US 932410 P

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

21.02.2017

73 Titular/es:

**MEDIGENE AG (100.0%)
LOCHHAMER STRASSE 11
82152 PLANEGG/MARTINSRIED, DE**

72 Inventor/es:

**LUX, KERSTIN;
BÜNING, HILDEGARD;
PERABO, LUCA;
NIELAND, JOHN;
BOUCAS, JORGE;
HALLEK, MICHAEL;
RITTER, MIRKO y
HÖRER, MARKUS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 602 610 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

Proteína estructural mutada de un parvovirus

5 La presente invención está relacionada con una estructura multimérica que comprende una proteína estructural de un parvovirus con una inserción de aminoácido en el sitio de inserción I-453, una biblioteca que comprende la proteína, un ácido nucleico que codifica la proteína, un vector, virus o célula que comprende el ácido nucleico, un medicamento que comprende la proteína, ácido nucleico o estructura multimérica, además de métodos y usos que implican a la proteína, ácido nucleico o estructura multimérica.

10 Las terapias con anticuerpos monoclonales han sido una de las formas de terapia más satisfactorias de los nuevos desarrollos de fármacos durante el último par de años en campos terapéuticos tales como la oncología, enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. En las terapias con anticuerpos monoclonales, los pacientes se inyectan con un anticuerpo monoclonal específico que reconoce el antígeno implicado en la enfermedad. Los anticuerpos reconocen su antígeno con el dominio variable del anticuerpo que también se denomina el idiotipo del anticuerpo.

15 Sin embargo, las terapias con anticuerpos monoclonales también tienen ciertos inconvenientes. Puede observarse que, si la concentración de un anticuerpo específico con un idiotipo particular es demasiado alta, el sistema inmunitario del paciente desarrolla una respuesta de anticuerpos contra el idiotipo del anticuerpo monoclonal terapéutico y así limita su eficacia. Este tipo de anticuerpo que reconoce el idiotipo de un anticuerpo se denomina un anticuerpo antiidiotípico. Además, los anticuerpos para anticuerpos monoclonales terapéuticos dirigidos contra otras partes de los monoclonales frecuentemente limitan la eficacia de una terapia pasiva con anticuerpos. Por tanto, muchos de los fármacos de anticuerpos monoclonales necesitan usarse en combinación con los regímenes de inmunosupresión tradicionales, aumentando los costes globales del tratamiento. Además, la supresión activa del sistema inmunitario del paciente es especialmente perjudicial; si se requiere un sistema inmunitario intacto para controlar el estadio de la enfermedad tal como para indicaciones oncológicas.

25 Como es una vacunación pasiva contra el antígeno diana, el anticuerpo monoclonal tiene que inyectarse frecuentemente dependiendo de la semivida del anticuerpo dentro del suero del paciente. Por tanto, tales tratamientos son caros e inadecuados para los pacientes.

30 Una alternativa a tales terapias con anticuerpos monoclonales ya existe ejemplificada por varios desarrollos clínicos usando anticuerpos antiidiotípicos como fármacos. Tales terapias con anticuerpos antiidiotípicos se basan en el hecho (véase anteriormente) de que el sistema inmunitario del paciente pueden inducir una respuesta de anticuerpos contra el idiotipo de un anticuerpo. Si se usa un anticuerpo monoclonal que expresa una imitación funcional de un epítipo diana (parátipo o mimótipo) como idiotipo, el sistema inmunitario del paciente generará una respuesta del anticuerpo policlonal en el que un subconjunto de estos anticuerpos es capaz de reaccionar de forma cruzada con el epítipo diana en el paciente. Tal anticuerpo que expresa un parátipo se denomina un anticuerpo antiidiotípico (basado en el modelo de la red de Jerne de relaciones idiotípicas (Jerne, 1974, Jerne et al., 1982). Así, la inmunización selectiva con un anticuerpo antiidiotípico puede inducir una respuesta inmunitaria específica dirigida contra el antígeno original (Varela y Coutinho, 1991, Jefferis, 1993, Chatterjee et al., 1994).

40 Por tanto, una vacunación con un anticuerpo antiidiotípico tal induce activamente una respuesta del anticuerpo policlonal. Como consecuencia, tales vacunas de anticuerpo antiidiotípico tienen varias ventajas con respecto a una inmunización pasiva por un anticuerpo monoclonal estándar. No hay respuesta de anticuerpos hacia el anticuerpo antiidiotípico que limite su eficacia, ya que exactamente esta respuesta inmunitaria se usa como principio terapéutico. Por tanto, tampoco es necesario combinar el tratamiento de anticuerpos con un régimen de inmunosupresión. Y además, debido al hecho de que el tratamiento antiidiotípico es una inmunización activa, el fármaco solo tiene que inyectarse de vez en cuando para reforzar la respuesta de anticuerpos generados por el propio paciente manteniendo un título continuo de anticuerpos específicos. Adicionalmente, los anticuerpos antiidiotípicos inducen una respuesta de anticuerpo policlonal contra el antígeno diana que obstaculiza el posible mecanismo para resistencia al tratamiento de, por ejemplo, en células tumorales.

50 Sin embargo, las terapias con anticuerpos antiidiotípicos se enfrentan a grandes desventajas. Los títulos de la respuesta de anticuerpo policlonal inducida obtenida por la vacunación con anticuerpos antiidiotípicos no son frecuentemente suficientemente altos para establecer un tratamiento beneficioso. Esto es debido a la falta de un antígeno fuerte como vacuna, ya que los anticuerpos por definición no son muy inmunogénicos. Además, es difícil generar vacunas antiidiotípicas específicas debido a esta falta de inmunogenicidad y dificultades técnicas para identificar anticuerpos antiidiotípicos.

55 Una serie de publicaciones describe que un antígeno puesto en el contexto de una superficie ordenada de una partícula viral - aquí una partícula del virus del papiloma - pueden inducir una respuesta de linfocitos B que incluso pueden suprimir la tolerancia de linfocitos B a tal antígeno por reticulación directa del receptor de linfocitos B

respectivo. Se usaron partículas similares al virus del papiloma bovino (VLPs) conjugadas con un péptido A β mediante biotina para generar una respuesta inmunitaria contra el auto-antígeno A β (Li et al., 2004). Además, este grupo usó partículas similares al virus del papiloma bovino que tienen el receptor de quimiocina murina mCCR5 insertado en un sitio inmunodominante de la proteína viral L1 para inmunizar ratones que conducen a sueros con altos títulos de anticuerpos anti-CCR5 a pesar del hecho de que CCR5 sea un auto-antígeno. Además, se usó una proteína de fusión L1-CCR5 de macaco para inmunizar macacos cola de cerdo. 4 de los 5 animales de prueba produjeron anticuerpos específicos para CCR5. En otro enfoque, TNF- α se unió a VLPs a modo de una interacción biotina-estreptavidina (Chackerian et al., 2001). Estas VLPs fueron satisfactorias en generar una respuesta de auto-anticuerpos en ratones, mientras que estos anticuerpos se unieron a TNF- α nativo (documento US 6.719.978).

Por tanto, se ha mostrado que las VLPs del papiloma son un esqueleto adecuado para la presentación de antígenos al sistema inmunitario con el fin de generar fuertes respuestas de linfocitos B, probablemente debido a su densa, ordenada y estrechamente empaquetada matriz de epítomos de vacunación. Debido a su inducción de linfocitos B excepcionalmente fuerte, las VLPs del papiloma pueden ser especialmente útiles en vencer la tolerancia de linfocitos B a auto-antígenos.

Sin embargo, el enlace de epítomos mediante biotina es una etapa de proceso complicada de manera que es difícil de realizar bajo condiciones exactamente controladas según se requiera por las autoridades de registro sanitario para un fármaco autorizado. Además, el uso de un esqueleto del virus del papiloma bovino en seres humanos puede generar una respuesta inmunitaria dominante contra el esqueleto viral tal que la respuesta de linfocitos B generada contra el epítomo insertado sea demasiado débil para generar una sensibilización suficiente de linfocitos B, que es especialmente importante si tiene que romperse la tolerancia. Adicionalmente, los virus del papiloma son muy difíciles de fabricar en cultivo de tejido y normalmente tienen que ser aislados de verrugas. Por tanto, para aplicaciones donde son necesarios virus que codifican un genoma viral, los virus del papiloma no son adecuados. Una aplicación tal es la generación de bibliotecas virales de variantes de la cápsida que pueden usarse para cribar un mutante de la cápsida con ciertas propiedades como presentación de un epítomo que coincide con un anticuerpo monoclonal de elección o un inserto capaz de unirse a un receptor celular de elección.

Para el virus adeno-asociado de tipo 2 (AAV-2) se describió tiempo atrás que la inserción de péptidos de ligando en proteínas estructurales produce cápsidas que son capaces de presentar el ligando sobre la superficie de la cápsida y mediar en transducción mediante la interacción del ligando con su receptor, redirigiendo así el tropismo viral por modificaciones genéticas de la cápsida (Girod et al., 1999, Grifman et al., 2001, Nicklin et al., 2001, Shi et al., 2001, Wu et al., 2000), que se denomina en lo sucesivo redireccionamiento. En particular, se ha demostrado que la inserción de un motivo Arg-Gly-Asp (RGD) de unión a integrina en el sitio de inserción I-587 de las proteínas de la cápsida del AAV VP-1 permitieron que partículas de AAV transdujeran células mediante integrinas $\alpha_v\beta_1$ (Aumailley et al., 1990, Girod et al., 1999). El direccionamiento satisfactorio de vectores de gen tales como AAV-2 es importante para aumentar la eficiencia y seguridad de la terapia génica, ya que permitiría restringir la transferencia génica en el tejido deseado, minimizar el riesgo asociado a la transferencia de genes posiblemente peligrosos en otros tipos de células y aumentar la concentración del producto génico terapéutico administrado al tejido enfermo (Kay et al., 2001, Pfeifer y Verma, 2001). Aunque se han descrito otros posibles sitios de inserción para AAV-2, I-587 ha sido usado con creces el más satisfactoriamente y puede considerarse el mejor sitio para modificaciones de la cápsida.

Además, se ha informado que las bibliotecas de AAV-2 que presentan insertos de péptidos al azar en la posición I-587 fueron satisfactoriamente cribadas para elegir como diana mutantes (Perabo et al., 2003, Perabo, 2003, Waterkamp et al., 2006).

Otra ventaja de los parvovirus en este contexto es que, debido a la alta conservación estructural de parvovirus, el conocimiento obtenido para, por ejemplo, AAV-2 puede transferirse fácilmente a otros parvovirus. Siempre que la administración repetida del producto sea necesaria, el cambio entre diferentes esqueletos de parvovirus que presentan el mismo péptido/epítomo puede eludirse (neutralizando) anticuerpos que han sido producidos en una aplicación anterior.

Sin embargo, una inserción dentro de I-587 - dependiendo de su uso - puede tener ciertas desventajas. Se ha informado que la inserción de péptidos de ligando en este sitio destruye la unión del proteoglicano de sulfato de heparina (HSPG), que es el receptor primario de AAV-2, en algunos pero no en todos los mutantes (Perabo et al., 2006b). Este fenómeno es probable debido al hecho de que una inserción interfiere con al menos dos de los cinco aminoácidos positivamente cargados del motivo de unión de HSPG recientemente identificado (Kern et al., 2003, Opie et al., 2003), concretamente R₅₈₅ y R₅₈₈. Los péptidos insertados que contienen una carga negativa neta son propensos a conferir un fenotipo no de unión a HSPG, mientras que las cargas positivas facilitan la interacción con HSPG (Perabo et al., 2006b). Concluyentemente, la interferencia del sitio de unión de HSPG con el sitio de inserción I-587 limita su aplicabilidad universal.

En términos generales, puede esperarse una cierta interferencia de un péptido/ligando insertado con sus aminoácidos circundantes del esqueleto de la cápsida. Tal interferencia determina qué tipo de inserto es aceptable para la cápsida viral en un sitio específico. Si se usa otro sitio para las inserciones, puede esperarse que el contexto

del esqueleto sea diferente y pueden integrarse satisfactoriamente diferentes péptidos. Por tanto, el péptido "ideal" (por ejemplo, para el direccionamiento del virus) puede interferir en un sitio, pero puede ajustarse perfectamente en otro sitio.

5 En el caso de fines de vacunación, la unión de HSPG podría ser necesaria, o al menos útil, para que las cápsidas entren en células predendríticas, cuya activación es necesaria para ejercer una respuesta T_{H1} . Por consiguiente, la inserción de un epítipo de linfocitos B en I-587 puede destruir la unión de HSPG y, por tanto, no provocaría una respuesta T_{H1} . Adicionalmente, virus con un motivo de unión de HSPG intacto pueden todavía ser eficientemente purificados usando cromatografía de afinidad por heparina común.

10 Además, la combinación de I-587 con otro sitio de inserción sería ideal para aumentar la densidad de epítopos de linfocitos B sobre la superficie de la cápsida o para presentar dos epítopos diferentes expresados a partir de un único gen cap - a diferencia de las cápsidas de mosaico generadas por co-expresión de más de un gen cap diferente, que es desventajoso desde un punto de vista regulador.

15 Tomados conjuntamente, estos hechos y consideraciones sugieren que AAV y otros parvovirus son esqueletos adecuados para fines de vacunación y/o enfoques de redireccionamiento en el contexto de la terapia génica, pero se necesita un sitio de inserción adicional con propiedades iguales o mejoradas. Por tanto, el problema subyacente de la presente invención es la identificación de otro sitio de inserción que sea una alternativa o incluso superior a I-587, en el que los péptidos puedan insertarse solos o en combinación con inserciones en, por ejemplo, I-587, péptidos que se presentan sobre la superficie de una cápsida y péptidos que están al menos unidos por un anticuerpo respectivo y para el uso de redireccionamiento los vectores virales pueden mediar en la transducción de células diana.

20 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la posición después del aminoácido G_{453} de AAV-2 es especialmente adecuada para tales inserciones.

25 Por consiguiente, el principal objetivo de la presente invención es una estructura multimérica que comprende una proteína estructural de parvovirus que comprende una inserción de aminoácido, en el que la inserción de aminoácido es directamente en el extremo C del aminoácido G_{453} en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, y en el que la proteína estructural con la inserción tiene capacidad de formación de partículas, y en el que la inserción (a) tiene una longitud de 4 a 30 aminoácidos, y/o (b) es un epítipo.

30 Inserciones cerca, pero no exactamente en este sitio, han sido previamente sugeridas, pero fueron solo de éxito limitado o sin éxito. La inserción del péptido L14 de 14 aminoácidos después del aminoácido R_{447} (I-447) (Girod et al., 1999) condujo a cápsidas intactas, ya que el anticuerpo A20 sensible a la conformación todavía reaccionó con él. Además, un anticuerpo específico para L14 reconoció específicamente el inserto en un ELISA. La cápsida mutante fue además capaz de unirse específicamente a células que expresan el receptor de integrina específico de L14. Sin embargo, no se produjo transducción satisfactoria para la inserción en I-447 en tales células - a diferencia de una cápsida mutante con la misma inserción en I-587. Estos datos muestran que en principio es posible insertar péptidos en I-447 ya que las cápsidas están todavía formadas y el péptido insertado se presenta sobre la superficie de la proteína, pero al menos para el péptido L14 tal inserción no conduce a una transducción satisfactoria, sugiriendo que I-447 no es un candidato ideal para inserciones en general.

40 También Wu et al. (Wu et al., 2000) informan de la inserción de un péptido de hemaglutinina (HA) en la posición I-447. De hecho, la proteína estructural mutada muestra formación de cápsida intermedia y transducción (tabla 5, página 8643), pero claramente este sitio de inserción es inferior a I-587.

45 Además, Grifman et al. insertaron un epítipo Myc entre T_{448} y N_{449} (denominado por los autores 449Myc, véase Fig. 3B; y en el presente documento I-448) (Grifman et al., 2001). El epítipo Myc estaba accesible a un anticuerpo anti-Myc y estaba, por tanto, presente sobre la superficie de la cápsida. Mientras que el redireccionamiento satisfactorio era nuevamente informado para la inserción después de N_{587} (aquí la inserción de un motivo NGR que media en la unión a CD13), no se presentaron datos sobre el redireccionamiento usando el sitio I-449, que indica que el redireccionamiento era nuevamente no satisfactorio, a pesar del hecho de que este sitio puede usarse para presentar insertos sobre la superficie de una cápsida.

50 En otro estudio, la inserción de un péptido RGD4C insertado después del aminoácido R_{459} disminuyó seriamente la transducción de títulos, mientras que la inserción del mismo péptido en las posiciones A_{139} , Q_{584} y R_{588} fue bien tolerada (Shi y Bartlett, 2003).

Debido a las estructuras de barril β cercanas que podrían llegar a ser afectadas por las inserciones en I-453, no se hubiera esperado que I-453 fuera en realidad un sitio de inserción superior o al menos un sitio de inserción alternativo en comparación con I-587.

Sorprendentemente, en el contexto de la presente invención, se encontró que las inserciones directamente en el extremo C1 de G₄₅₃ de AAV-2 eran superiores o al menos una alternativa válida a I-587.

5 Como se detalla adicionalmente más adelante, las secuencias de péptidos que han sido satisfactoriamente insertadas después de G₄₅₃ y que se presentaron sobre la superficie de la cápsida, fueron reconocidas por anticuerpos específicos de péptido y - en el caso de un mutante de direccionamiento - mediaron en la transducción viral. Cuando se alinean secuencias de aminoácidos de diversos parvovirus se ha descubierto de manera sorprendente que G₄₅₃ de AAV-2 está conservado entre todos los virus adeno-asociados incluidos en el alineamiento y algunos parvovirus más distantemente relacionados tales como FPV, CPV y B19 (véase la Figura 2). Los alineamientos previamente publicados de esta región no revelan este aminoácido conservado (Grifman et al., 2001) Fig. 1, A y B, Bucle III, (Girod et al., 1999) Fig. 1c). Por consiguiente, la invención no se limita a AAV-2, sino que también es aplicable a otros parvovirus como se define más adelante. Secuencias de parvovirus adicionales pueden alinearse fácilmente con el alineamiento proporcionado (Figura 2).

15 Según la presente invención, la inserción de aminoácido es directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus. También se desvelan en el presente documento inserciones que pueden hacerse en el sitio de inserción I-453 definido en el presente documento, que es una inserción localizada directamente en el extremo N o C, preferentemente en el extremo C de un aminoácido en la secuencia de 5 aminoácidos del extremo N o C del aminoácido correspondiente a G₄₅₃ de AAV-2, preferentemente 3, más preferentemente 1, especialmente directamente en el extremo N o C, en particular extremo C, del aminoácido correspondiente a G₄₅₃ de AAV-2. Esto significa que el sitio de inserción I-453 referido en la descripción se corresponde con los aminoácidos enumerados en la Tabla 1. La flecha (▼) indica la posición de los sitios de inserción según las reivindicaciones.

Tabla 1: I-453

Parvovirus	Aminoácido N.º	Sec. de aminoácido	SEQ ID NO:
AAV-2	G ₄₅₃	NTPSG▼TTTQS	SEQ ID NO: 1
AAV-5	G ₄₄₆	NNTGG▼VQFNK	SEQ ID NO: 2
AAV-1	G ₄₅₄	QNQSG▼SAQNK	SEQ ID NO: 3
AAV-6	G ₄₅₄	QNQSG▼SAQNK	SEQ ID NO: 4
AAV-8	G ₄₅₆	QTTGG▼TANTQ	SEQ ID NO: 5
AAV-10	G ₄₅₆	QSTGG▼TQGTQ	SEQ ID NO: 6
AAV-3b	G ₄₅₄	GTTSG▼TTNQS	SEQ ID NO: 7
AAV-7	G ₄₅₆	SNPGG▼TAGNR	SEQ ID NO: 8
AAV-4	G ₄₄₅	STTTG▼TTLNA	SEQ ID NO: 9
AAV-11	G ₄₄₄	STTSG▼ETLNQ	SEQ ID NO: 10
b-AAV	G ₄₄₇	STTSG▼GTLNQ	SEQ ID NO: 11
FPV	G ₃₀₇	FGDIG▼VQQDK	SEQ ID NO: 12
CPV	G ₂₇₁	FGDIG▼VQQDK	SEQ ID NO: 13
B19	G ₂₆₈	PDTLG▼GDPKF	SEQ ID NO: 14
GPV	Y ₃₂₃	VSATY▼TEGEA	SEQ ID NO: 15
MVM	T ₃₀₉	AGTLT▼AQGSR	SEQ ID NO: 16
▼ indica el sitio de inserción dentro de I-453 según la presente invención para cada proteína estructural enumerada.			

25 Al igual que el sitio de inserción I-587 previamente conocido, I-453 se encuentra dentro de la región del extremo C de las proteínas CAP que está presente en VP-1, VP-2 y VP-3. Por consiguiente, una inserción de una secuencia codificante de ADN en marco en el gen cap en el sitio correspondiente de I-453 conduce a una inserción de aminoácido respectiva en VP-1, VP-2 y VP-3 (véase la Figura 1).

Las siguientes definiciones explican cómo los términos definidos deben interpretarse en el contexto de los productos, métodos y usos de la presente invención:

Una "proteína estructural" significa una proteína que es parte de la cápsida del virus. Para parvovirus, las proteínas estructurales se denominan generalmente VP-1, VP-2 y/o VP-3, codificadas por el gen cap. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales de parvovirus son muy conocidas en la técnica. Están conservadas dentro de los parvovirus. Posiciones de aminoácidos proporcionadas en el presente documento que no se especifican adicionalmente se refieren a la secuencia de AAV-2 de la proteína de la cubierta principal VP-1 como se publica por Ruffing et al. (Ruffing et al., 1994); Acceso de Genpept N.º 2906023).

Una "proteína estructural mutada" significa una proteína estructural que tiene al menos una mutación en comparación con la proteína estructural respectiva de virus no mutado.

Un "parvovirus" significa un miembro de la familia de Parvoviridae que contiene varios géneros divididos entre dos subfamilias Parvovirinae (Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus, Amdovirus y Bocavirus) y Densovirinae (Densovirus, Iteravirus, Brevidensovirus, Pefundensovirus y Contravirus) (Fields: Virology, Cuarta Edición 2001, Volumen 2, capítulos 69 (especialmente la Tabla 1) y 70, Lippincott Williams Wilkins, Filadelfia; <http://virus.stanford.edu/parvo/parvovirus.html>, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_parvo.htm#SubFamily1). Parvovirus preferidos son miembros del género Parvovirus tales como AAV-1, AAV-2, AAV-3b, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV bovino (b-AAV), AAV canino (CAAV), parvovirus canino (CPV), parvovirus de ratón, virus mínimo de ratones (MVM), B19, H1, AAV aviar (AAAV), virus de la panleucopenia felina (FPV) y parvovirus del ganso (GPV). Parvovirus más preferidos son aquellos que tienen un alineamiento de G conservado para G₄₅₃ de AAV-2, que son AAV-1, AAV-2, AAV-3b, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-10, AAV-11, FPV, CPV y B19 (véase la Figura 2). Los preferidos son AAV-2, AAV-1 y AAV-6.

Un "epítipo" es la parte de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente por anticuerpos, linfocitos B, o linfocitos T citotóxicos. Aunque normalmente se cree que los epítipos se derivan de no auto-proteínas, secuencias derivadas del huésped que pueden reconocerse también se clasifican como epítipos. Los epítipos tienen una longitud de al menos 4 aminoácidos, preferentemente 4 a 30 aminoácidos, más preferentemente 5 a 20 aminoácidos, especialmente 5 a 15 aminoácidos. Los epítipos pueden ser lineales o estar formados de manera tridimensional normalmente por aminoácidos que son distantes entre sí en la estructura de proteína primaria, pero que llegan a estar estrechamente relacionados en una estructura secundaria y/o terciaria. Epítipos que son específicamente reconocidos por linfocitos B se denominan epítipos de linfocitos B.

Un "tolerógeno" es un auto-antígeno que es - en su entorno natural - accesible al sistema inmunitario humoral. Puede ser tanto secretado como liberado de otro modo de una célula viva o asociado a la superficie externa de o integrado en la membrana celular. En términos generales, los tolerógenos no provocan - bajo circunstancias normales, a diferencia de, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias - una respuesta inmunitaria específica debido a la tolerancia contra el antígeno que resulta de una exposición previa al mismo antígeno. La tolerancia puede producirse debido a tolerancia central o tolerancia periférica. Tolerancia central se refiere a tolerógenos cuyos antígenos correspondientes han sido expuestos a linfocitos T en el timo, conduciendo a la eliminación de los linfocitos T específicos. Se produce tolerancia periférica cuando los antígenos / epítipos / mimótipos / parátipos se presentan a linfocitos T sin estímulos adicionales apropiados, comúnmente proporcionados por inflamación, que conduce a anergia. Sin embargo, se ha observado que los tolerógenos pueden inducir respuestas de linfocitos B reguladoras (Vogel et al., 2004) hasta cierto grado.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a tolerógenos debidos a tolerancia periférica, preferentemente tolerógenos derivados de antígenos de tumor/epítipos/mimótipos/parátipos. Los tolerógenos englobados por la presente invención incluyen péptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos, preferentemente péptidos.

Los tolerógenos preferidos son antígenos sobre la superficie de una célula, especialmente células tumorales, por ejemplo receptores, especialmente receptores del factor de crecimiento (preferentemente EGFR), antígenos de tumor (preferentemente Her2/NEU, Melan A, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW MAA), CA125), receptores virales (CCR5), CD20, receptores de acetilcolina, receptores de interleucina (receptor de IL-13). Tolerógenos adicionalmente preferidos pueden ser proteínas de la sangre (preferentemente CETP), interleucinas (preferentemente IL-6, IL-9, IL-13, IL-17), citocinas, miembros de la familia de TNF (preferentemente TNF- α), inmunoglobulinas (preferentemente IgE), factores del complemento, proteínas erróneamente plegadas (preferentemente β -amiloide) y factores de crecimiento (preferentemente VEGF).

Un "epítipo derivado de tolerógeno" de un tolerógeno específico en el contexto de los productos, métodos y usos de la presente invención se refiere a un epítipo de linfocito B que

i) es idéntico a un epítipo de linfocito B del tolerógeno,

- ii) un derivado (por ejemplo, un mutante) de un epítipo de linfocito B del tolerógeno que reacciona de forma cruzada con un anticuerpo que se une al epítipo de linfocito B del tolerógeno,
- iii) un mimótopo de un epítipo de linfocito B del tolerógeno, y/o
- iv) un parátipo de un epítipo de linfocito B del tolerógeno.

5 La longitud de un epítipo derivado de tolerógeno normalmente es 4-30, preferentemente 5-20 y lo más preferentemente 5-15 aminoácidos.

10 El derivado de un epítipo de linfocito B de un tolerógeno puede generarse por una o más sustituciones de aminoácidos, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, es decir, sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Ejemplos de tales familias son aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc. Además, pueden obtenerse derivados por una o más deleción (deleciones) y/o inserción (inserciones) de un único aminoácido.

15 "Reacción cruzada" o "reaccionar de forma cruzada" de epítopos de linfocitos B con un anticuerpo monoclonal específico significa según la presente invención que la afinidad (K_D ; véase más adelante) de los epítopos con el anticuerpo está dentro de dos magnitudes, preferentemente dentro de una magnitud cuando se compara el epítipo de linfocito B con su derivado.

20 Epítopos derivados de tolerógeno dentro de la estructura multimérica que comprende proteínas estructurales mutadas de parvovirus según la presente invención son idénticos, se parecen o imitan estiramientos de antígeno de un tolerógeno que están - en su entorno natural - accesibles al sistema inmunitario, por ejemplo, epítopos de proteína de membrana localizada en la parte extracelular, proteínas del suero, inmunoglobulinas, proteínas de placa. Tales estiramientos de antígeno están preferentemente localizados sobre la superficie de tal proteína dentro del cuerpo de un mamífero, preferentemente un ser humano.

25 Un "mimótopo" es un epítipo estructural no lineal compuesto de varios aminoácidos derivados de diferentes regiones de la secuencia lineal de la proteína estructural localizada en estrecha vecindad debido a la estructura terciaria global de la cápsida que está específicamente unida por un anticuerpo, o un epítipo lineal que imita a un epítipo discontinuo de la proteína estructural.

Un "parátipo" es el sitio de unión al antígeno que está específicamente unido por un anticuerpo.

30 El mimótopo o parátipo en el contexto de la presente invención podría consistir en (partes de) la secuencia de péptidos insertada sola o podría estar compuesto de péptido insertado y restos de aminoácidos de partículas del núcleo de parvovirus.

35 Una "inserción" de (un) aminoácido(s) es en términos generales una inserción de al menos un aminoácido heterólogo en la secuencia de - para la presente invención - una proteína estructural de parvovirus. 'Heterólogo', en este contexto, significa heterólogo en comparación con el virus, del que se deriva la proteína estructural de parvovirus. Los aminoácidos insertados pueden insertarse simplemente entre dos aminoácidos dados de la proteína estructural de parvovirus. Una inserción de aminoácidos también puede ir junto con una deleción de aminoácidos dada de la proteína estructural de parvovirus en el sitio de inserción, conduciendo a una sustitución completa (por ejemplo, 10 aminoácidos dados están sustituidos con 10 o más aminoácidos insertados) o sustitución parcial (por ejemplo, 10 aminoácidos dados están sustituidos con 8 aminoácidos insertados) de aminoácidos de la proteína estructural de parvovirus.

45 El término "ligante" se refiere a una molécula que se une específicamente a su componente de unión respectivo. Ligantes comúnmente usados son anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales, derivados de anticuerpo tales como anticuerpos monocatenarios o fragmentos de anticuerpos. En principio, pueden usarse todas las clases de anticuerpos, se prefieren anticuerpos IgG. Igualmente pueden usarse fragmentos o multímeros de anticuerpos. Fragmentos comúnmente usados son anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab o $(Fab)_2$. Ejemplos de otros ligantes adecuados son armazones de proteínas tales como anticalinas o lipocalinas (Nygren y Skerra, 2004), receptores o partes de los mismos (por ejemplo, receptores de linfocitos T solubles), alquirina, microcuerpos o aptámeros.

50 El término "se une específicamente a" significa que dos moléculas A y B, preferentemente proteínas, se unen la una a la otra, generando así el complejo AB con una afinidad ($K_D = K_{dis}/k_{as}$) de al menos $K_D = 1 \times 10^{-5}$ mol/l, preferentemente 1×10^{-7} mol/l, más preferentemente 1×10^{-8} mol/l, especialmente 1×10^{-9} mol/l.

"Heterólogo", en el contexto de la presente invención, significa una secuencia de péptidos, por ejemplo un epítipo que no está presente sobre la cápsida viral no mutante del parvovirus y/o proteína estructural.

El término "antígeno" en el contexto de los productos, métodos y usos de la presente invención se refiere a cualquier antígeno diana contra el que debe inducirse una reacción inmunitaria. Tales antígenos diana son normalmente antígenos que son susceptibles a la respuesta inmunitaria humoral. Son normalmente proteínas que pueden ser posttraduccionalmente modificadas, como, por ejemplo, proteínas glucosiladas. Antígenos preferidos son proteínas del suero, proteínas que pueden encontrarse al menos bajo ciertas condiciones (por ejemplo, en un estado de enfermedad) en la sangre (por ejemplo CETP, IL-6, IL-17, TNF- α) y proteínas de membrana, especialmente proteínas de receptor (por ejemplo, CD20, receptores de acetilcolina, IL13R, EGFR). Antígenos especialmente preferidos son IgE, antígenos de tumor (por ejemplo, Melan A, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW MAA), CA125, IL13R, Her2/NEU, molécula de adhesión a células L1), VEGF, EGFR, CD20, CETP (proteína de transferencia de éster de colesterol), miembros de la familia TNF (por ejemplo, TNF- α), interleucinas (IL-9, IL-6, IL-13, IL-17), o proteínas erróneamente plegadas que conducen a una agregación de proteínas y, por tanto, causan enfermedades conformacionales (para una visión general véase Uversky et al., 2006, por ejemplo, β -amiloide). Se excluyen de la definición anterior de "antígeno" antígenos de parvovirus, es decir, antígenos inherentes al propio parvovirus no mutado, por ejemplo, derivados de B19 (Klenerman et al., 2002).

Insertando aminoácidos en I-453, los aminoácidos insertados se localizan sobre la superficie de la cápsida formada por las proteínas estructurales. La presentación de los aminoácidos sobre la superficie permite la inserción para ejercer su función de vacunación o de direccionamiento.

Inserciones en la posición I-453 no interfirieron con la formación de partículas de las proteínas de la cápsida. La estructura multimérica de la presente invención muestra características ventajosas, en particular si van a usarse para fines de vacunación, ya que se cree que las partículas ordenadas/similares a virus son superiores para ejercer una respuesta inmunitaria fuerte y específica de inserción. Sin embargo, como se mostró para partículas similares al virus del papiloma humano, también subunidades de la cápsida como capsómeros fueron capaces de usarse para fines de vacunación. Como la vacunación con una partícula que contiene un genoma es una terapia génica se prefiere usar partículas de AAV inactivadas (por ejemplo, por irradiación gamma o UV) que contienen genoma, o partículas similares a virus del parvovirus respectivo. Tales partículas similares a virus (o en resumen partículas) son estructuras similares a la cápsida que están compuestas de las proteínas estructurales del parvovirus respectivo, por ejemplo, VP-1, VP-2 y/o VP-3, o partes de las mismas tales como proteínas estructurales truncadas en el extremo N o C, pero esencialmente no contienen un genoma viral. Se ha mostrado que VP-2 solo se ensambla en partículas similares a virus y puede expresarse en diversos sistemas de expresión tales como bacterias, por ejemplo, *E. coli*, levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, en células de insecto, por ejemplo, el sistema de expresión de baculovirus (células SF9, SF+ o High Five), o en células de mamífero (tales como CHO, HeLa, 293, BHK o PerC6).

Por lo que se refiere al contexto de terapia génica, donde vectores virales se construyen, la capacidad de formar partículas tales como cápsidas es una característica altamente preferida, ya que en general se necesitan partículas intactas para encapsidar un genoma viral que lleva el transgén.

En una realización preferida, el parvovirus es un virus adeno-asociado, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en AAV-1, AAV-2, AAV-3b, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 y b-AAV, especialmente seleccionado del grupo que consiste en AAV-1, AAV-2, AAV-5 y AAV-8. En otra realización preferida, el parvovirus está seleccionado del grupo que consiste en AAV bovino (b-AAV), AAV canino (CAAV), parvovirus canino (CPV), parvovirus de ratón, virus mínimo de ratones (MVM), B19, H1, AAV aviar (AAAV), virus de la panleucopenia felina (FPV) y parvovirus del ganso (GPV), más preferentemente FPV, CPP, B19, GPV y MVM, especialmente FPV, CPV y B19.

La estructura multimérica reivindicada contiene una proteína que tiene una inserción de aminoácido que tiene una longitud de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 aminoácidos, preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 20, lo más preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 15 aminoácidos. Normalmente, el tamaño de un epítipo de linfocito B es al menos 5 aminoácidos (documento US 2004/0228798A1). Lo mismo es cierto para varias secuencias de aminoácidos conocidas adecuadas como secuencias de direccionamiento. Es probable que insertos más largos interfieran entre sí. También está englobado por la presente invención que un inserto comprenda más de una secuencia de aminoácidos funcional (por ejemplo, epítopos y/o secuencias de direccionamiento) en una fila. Por ejemplo, el inserto puede comprender 2, 3, 4, 5 o 6 insertos idénticos en una fila o 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias de aminoácidos funcionales diferentes tales como diferentes epítopos.

La naturaleza de la inserción de aminoácido es preferentemente un epítipo, especialmente un epítipo de linfocito B. Los epítopos son generalmente preferidos si las proteínas estructurales se modifican para ser adecuadas para los fines de vacunación. Los epítopos pueden ser epítopos de linfocitos B conocidos que se han identificado como epítopos lineales, parátomos o secuencias que forman mimótopos. Por tanto, los epítopos de linfocitos B pueden ser tanto lineales como estructurales. Sin embargo, es especialmente preferido usar epítopos lineales que no son mimótopos.

Además, los epítopos pueden ser secuencias que se han identificado por presentación en fagos o por presentación en AAV, donde una biblioteca de secuencias de aminoácidos se presenta sobre la superficie de fagos o AAV y se identifica que tales fagos/AAVs se unen específicamente a un ligante específico, especialmente un anticuerpo de elección. La secuencia de aminoácidos insertada puede secuenciarse y transferirse en I-453. En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos se identifica directamente a partir de una biblioteca de AAV, donde la biblioteca de secuencias de aminoácidos había sido insertada en I-453, por ejemplo, en analogía a las bibliotecas de AAV-2 descritas en (Perabo et al., 2003, Lieber, 2003, Muller et al., 2003) (documento WO 03/054197). En este contexto, se usa la ventaja de que el inserto de aminoácido se identifica en el mismo contexto de superficie que se usa para vacunación más adelante. Por tanto, la conformación no cambia en comparación con las configuraciones donde un epítipo se transfiere desde un contexto original (por ejemplo, de un antígeno o de un fago) al sitio I-453.

En una realización preferida, el epítipo de linfocito B es heterólogo al parvovirus.

En una realización especialmente preferida, el epítipo de linfocito B insertado es un epítipo derivado de tolerógeno. Como se ha descrito anteriormente, es especialmente difícil de romper la tolerancia y las estructuras multiméricas según la presente invención son especialmente adecuadas para este fin. Epítopos derivados de tolerógeno preferidos se derivan de IgE, CETP, CCR5, HER2/Neu, TNF- α , IL-17, IL-6 o β -amiloide, preferentemente IgE humana y β -amiloide humano, ejemplificados por los siguientes epítopos preferidos:

Epítopos de IgE:

VNLTWSRASG ("Kricek")	(SEQ ID NO: 50)
EFCINHRGYWVCGD ("Rudolf")	(SEQ ID NO: 55)
EDGQVMDVDLS ("Flex")	(SEQ ID NO: 85)
EKQRNGTLT ("Bind-2")	(SEQ ID NO: 86)
TYQCRVTHPHLPRALMR ("3DEpi1")	(SEQ ID NO: 87)
RHSTTQPRKTKGSG ("3DEpi2")	(SEQ ID NO: 88)
DSNPRGVSAYLSR (3DEpi3)	(SEQ ID NO: 89)
TITCLWDLAPSK ("3DEpi4")	(SEQ ID NO: 90)
KTKGSGFFVF ("C4E")	(SEQ ID NO: 91)
THPHLPRALMRS ("Wang-CS")	(SEQ ID NO: 92)
GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK ("Wang")	(SEQ ID NO: 93)
LPRALMRS ("C21")	(SEQ ID NO: 94)
INHRYWV ("C4M")	(SEQ ID NO: 95)

Epítopos de CETP:

CDAGSVRTNAPD	(SEQ ID NO: 60)
AKAVSNLTERSESLQS ("CETP TP10")	(SEQ ID NO: 96)
SLTGDEFKVKLET ("CETP TP11")	(SEQ ID NO: 97)
REAVAYRFEED ("CETPTP12")	(SEQ ID NO: 98)
INPEITLDG ("CETP TP13")	(SEQ ID NO: 99)
DISVTGAPVITATYL ("CETP TP18")	(SEQ ID NO: 100)
DISVTGAPVITA ("CETP TP20A")	(SEQ ID NO: 101)
PKTVSNLTESSSESVQS ("hTP10")	(SEQ ID NO: 102)
SLMGDEFKAVLET ("hTP11")	(SEQ ID NO: 103)
QHSVAYTFEED ("hTP12")	(SEQ ID NO: 104)
INPEITRDG ("hTP13")	(SEQ ID NO: 105)
DISLTGDPVITASYL ("hTP18")	(SEQ ID NO: 106)
DISLTGDPVITA ("hTP20")	(SEQ ID NO: 107)

DQSIDFEIDSA ("hRitsch-1")	(SEQ ID NO: 108)
KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS ("hRitsch-2")	(SEQ ID NO: 109)
KNVSEDLPLPT ("hRitsch-3")	(SEQ ID NO: 110)
CDSGRVRTDAPD ("hCETP-intern")	(SEQ ID NO: 111)
FPEHLLVDFLQSLs ("hCTP C-Term")	(SEQ ID NO: 112)

Epítopo de β -amiloides:

DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 65)

Epítopos de CCR5:

HYAAAQWDFGNTMCQL (Chackerian, 1999)	(SEQ ID NO: 113)
AAQWDFGNTMCQ (Barassi et al., 2005)	(SEQ ID NO: 114)
RSQKEGLHYT (Misumi et al., 2006)	(SEQ ID NO: 115)

5

Epítopos de TNF- α :

SSRTPSDKPVAHWANPQAE ("TNF- α V1")	(SEQ ID NO: 116)
SRTPSDKPVAHWANP ("TNF- α V2")	(SEQ ID NO: 117)
SSRTPSDKP ("TNF- α V3")	(SEQ ID NO: 118)

Epítopos de IL-17:

NADGNVDYHMNSVP ("IL-17 V1")	(SEQ ID NO: 119)
DGNVDYHMNSV ("IL-17 V2")	(SEQ ID NO: 120)

Epítopos de IL-6:

RSFKEFLQSSLRALRQ ("IL-6 V1")	(SEQ ID NO: 121)
FKEFLQSSLRA ("IL-6 V2")	(SEQ ID NO: 122)

Epítopo de HER2/Neu:

QMWAPQWGPD (Riemer et al. 2007)	(SEQ ID NO: 123).
---------------------------------	-------------------

- 10 Como se describe anteriormente, es una realización modificar proteínas estructurales con el fin de redirigir el parvovirus a una célula o tejido diferente. Por tanto, en otra realización preferida de la presente invención, la inserción de aminoácido es una secuencia que provoca un aumento en la actividad de transducción del parvovirus mutado. El aumento en la actividad de transducción según la presente invención significa preferentemente que la relación de partículas genómicas dividida entre partículas de transducción (GenP/tP), como se determina en el
- 15 Ejemplo 6.1, es reducida para una línea celular de elección en comparación con el parvovirus no mutado respectivo. Un aumento en este contexto se refiere preferentemente a una disminución de GenP/tP de al menos aproximadamente el 25 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 100 %, todavía más preferentemente al menos aproximadamente el 300 %, lo más preferentemente al menos aproximadamente el 1000 %.
- 20 Tal aumento en la actividad de transducción se realiza normalmente por una inserción de aminoácido que media en la unión de la proteína estructural en forma de una partícula a un receptor de la membrana celular. Estas secuencias de direccionamiento insertadas pueden ser ligandos conocidos o partes de los mismos para un receptor dado. Además, las secuencias de direccionamiento pueden ser secuencias que se han identificado por presentación en fagos o por presentación en AAV, donde una biblioteca de secuencias de aminoácidos se presenta sobre la
- 25 superficie de fagos o AAV y se identifica que tales fagos/AAVs se unen específicamente a un receptor de elección. La secuencia de aminoácidos insertada puede secuenciarse y transferirse en I-453. En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos se identifica directamente a partir de una biblioteca de AAV, donde la biblioteca de secuencias de aminoácidos ha sido insertada en I-453, por ejemplo, en analogía a las bibliotecas de AAV-2 descritas en (Perabo et al., 2003, Lieber, 2003, Muller et al., 2003), (documento WO 03/054197). En este contexto se usa la

ventaja de que el inserto de aminoácido se identifica en el mismo contexto de superficie que se usa después. Por tanto, la conformación no cambia en comparación con configuraciones donde una secuencia de direccionamiento se transfiere desde un contexto original (por ejemplo, como parte de ligando o de un fago) al sitio I-453.

5 En una realización especialmente preferida, la secuencia de direccionamiento insertada no contiene un motivo RGD, especialmente es la secuencia ACDCRGDCFCA (SEQ ID NO: 84), denominada en el presente documento el péptido RGD-4C. El motivo RGD en general y especialmente el péptido RGD-4C media en la unión a las integrinas, especialmente $\alpha_V\beta_3$ y $\alpha_V\beta_5$. Por consiguiente, estas proteínas estructurales pueden usarse para dirigirse a células que expresan estas integrinas.

10 En otra realización preferida, la inserción provoca una alteración en una propiedad cromatográfica de la proteína estructural. Se prefiere insertar una marca conocida que pueda usarse para unir la proteína estructural o una partícula compuesta de la proteína estructural a un ligando. Tales marcas son muy conocidas en la técnica. Ejemplos se dan en la Tabla 2.

Tabla 2: Marcas y ligandos correspondientes

Marca	Ligando
HIS	Níquel
GST	Glutación
Proteína A	IgG
Biotina o Strep	Estreptavidina
Péptido de unión a calmodulina	Calmodulina
Fc-Péptido de IgG	Proteína A
Flag	Péptido FLAG o 3xFLAG
HA (hemaglutinina)	Péptido HA

15 Dependiendo de su uso, las partículas de la presente invención pueden tener que ser purificadas a alta pureza. Por lo demás, las proteínas estructurales no modificadas pueden modificarse por inserción para alterar sus propiedades cromatográficas como se ha descrito en el documento WO 01/05991. En el caso de AAV-2, las capacidades de unión a HSPG debidas a la estructura de bucle alrededor de I-587 permanecen inalteradas si se inserta una marca en I-453. Además, las proteínas estructurales modificadas que comprenden, por ejemplo, un inserto de
20 direccionamiento y/o un epítipo en un sitio diferente a I-453 pueden modificarse adicionalmente para presentar una marca que permite la purificación simple y escalable a alta pureza.

La inserción según la presente invención puede tener un conector del extremo N y/o C. Un conector según la presente invención es otro estiramiento de al menos un aminoácido del extremo N y/o C del epítipo insertado, que se dirige a la secuencia o marca, preferentemente de 2-12 aminoácidos. Aminoácidos preferidos para el conector
25 son aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Ala, Gly, Ser, Pro y Cys, especialmente 3 Ala en la dirección 5' y 2 en la dirección 3' del epítipo de linfocito B, 5 Ala en la dirección 5' y 5 en la dirección 3' del epítipo de linfocito B, o 3-5 Gly en la dirección 5' y 3-5 Gly en la dirección 3' del epítipo de linfocito B.

En otra realización preferida, la inserción comprende secuencias conectoras que permiten una circularización de las secuencias de péptidos insertadas con el fin de presentar mejor la inserción. Por consiguiente, se seleccionan las
30 secuencias espaciadoras para formar dedos de cinc (dedo de Zn), muy conocidos en la técnica. Motivos de dedo de Zn preferidos son CXXC o C_2H_2 . Motivos de dedo de Zn preferidos son C_2H_2 , C_4 y C_2HC que incluyen, pero no se limitan a, los motivos $CX_2CX_nC_2$, $CX_2CX_{10-30}CX_2C$, $CX_5HX_{10-30}CX_2C$, $CX_2CX_{10-30}CX_4H$ (Laity et al., 2001, Gamsjaeger et al., 2007).

Un ejemplo de un conector de dedo de Zn preferido es:

35 $X_{(3-5)}CXXCX_{(0-5)}(NNK)_n X_{(0-5)}CXXCX_{(3-5)}$

(X=Gly o Ala, C=Cys; siendo cada N cualquier nucleótido y representando K G o T). Así, la secuencia de NNK al azar sobresale de la superficie de la cápsida.

En una realización especialmente preferida, el conector comprende al menos un extremo N de Cys y al menos un extremo C de Cys de la inserción. Tales cisteínas son capaces de formar un enlace disulfuro para generar un bucle que estabiliza la inserción y así facilita su unión a su anticuerpo, receptor o ligando.

5 Es otra realización de la presente invención que la proteína estructural de parvovirus comprenda una o más mutación (mutaciones) adicional(es) en un sitio diferente de I-453. Esta/Estas mutación (mutaciones) adicional(es) se selecciona(n) independientemente del grupo que consiste en una mutación puntual, una delección interna, una delección terminal, una inserción y una sustitución. En general, el fin de tal mutación adicional puede seleccionarse del mismo grupo de fines que se ha expuesto anteriormente para la inserción en I-453, concretamente para generar una vacuna, para dirigir un vector a una célula/tejido diferente y/o cambiar las propiedades cromatográficas con el fin de purificar las partículas a alta pureza. Por consiguiente, una inserción adicional puede nuevamente ser un epítipo, preferentemente un epítipo de linfocito B o epítipo CTL (como se especifica adicionalmente más adelante), especialmente un epítipo derivado de tolerógeno, una secuencia de direccionamiento que potencia la transducción, preferentemente un ligando para un receptor de elección, o una marca. Para la caracterización de actividad adicional de estas inserciones adicionales se hace referencia a las secciones anteriores que describieron las características para la inserción I-453 que se aplican igualmente para una segunda inserción.

Este péptido adicional puede ser idéntico a la inserción en I-453. Esto se prefiere si es clave que tenga un gran número de péptidos idénticos que se presentan óptimamente sobre la superficie de una partícula, especialmente en casos en los que se requiere reticulación directa del receptor de linfocitos B (BCR) para la sensibilización independiente de linfocitos T de linfocitos B y la rotura la de tolerancia contra auto-antígenos. Una densidad más alta de epítopos de linfocitos B aumenta la verosimilitud de la óptima reticulación de BCR específica de péptido que requiere una distancia definida entre BCRs (por ejemplo, aproximadamente 5-10 nm), y por tanto, epítopos de linfocitos B respectivos que se presentan sobre una cápsida de parvovirus. Además, como se muestra en la presente invención (Figura 5), modificaciones de cápsidas de parvovirus en dos o más sitios diferentes de una en una pueden conducir a una comunicación cruzada conformacional dentro de la estructura de la cápsida que conduce a una presentación mejorada de la secuencia de péptidos insertada. Además, un número más grande de epítopos de linfocitos B insertados disminuye la probabilidad de reacciones inmunitarias no deseadas contra el esqueleto de parvovirus debido a i) enmascaramiento de epi-/mimótopos de linfocitos B de parvovirus naturales y/o ii) ligeros cambios de la cápsida estructural que convierten estos epi-/mimótopos de linfocitos B naturales en menos inmunogénicos.

30 Por consiguiente, en este caso se prefiere especialmente que el péptido insertado sea un epítipo de linfocito B, incluso más preferido un epítipo derivado de tolerógeno. Proteínas estructurales de parvovirus que presentan un alto número de epítopos sobre la superficie de una partícula/cápsida similar a virus pueden usarse eficientemente para generar respuestas de linfocitos B independientes de linfocitos T e incluso romper la tolerancia. Como se muestra en los Ejemplos 5.4 y 6.2, pueden insertarse epítopos idénticos, respectivamente epítopos de linfocitos B, en dos sitios de inserción diferentes, aquí I-453 y I-587, y están accesibles a ligando soluble, en este caso $\alpha\beta_3$, o β -amiloide, respectivamente. Por tanto, es una realización especialmente preferida de la presente invención que un péptido idéntico se inserte en I-453 y I-587 y que este péptido sea un epítipo de linfocito B, lo más preferido un epítipo derivado de tolerógeno. Otra variante de inserción doble preferida es una variante con inserciones en I-453 y I-261.

40 Sin embargo, el péptido adicional puede ser uno diferente en comparación con el péptido insertado en I-453.

Por tanto, es otra realización de la presente invención que una inserción en la posición I-453 se combine con al menos una inserción de aminoácido adicional en uno o más sitios adicionales. Sitios de inserción adecuados adicionales identificados que usan AAV-2 son muy conocidos en la técnica y se enumeran a modo de ejemplo en la Tabla 3. Sin embargo, debe entenderse que la inserción de aminoácido adicional en uno o más sitio(s) adicional(es) no se limita a aquellas enumeradas a continuación.

Tabla 3: Sitios de inserción adicionales

Sitio de inserción	aminoácido corresp. / secuencia de AAV-2		SEQ ID NO:	Referencias
I-1	M ₁	M ₁ AADGY	SEQ ID NO: 17	(Wu et al., 2000)
I-34	P ₃₄	PPPKP ₃₄ AERHK	SEQ ID NO: 18	(Wu et al., 2000)
I-138	T ₁₃₈	EPVKT ₁₃₈ APGKK	SEQ ID NO: 19	(Wu et al., 2000, Warrington et al., 2004, Lux et al., 2005)

ES 2 602 610 T3

Sitio de inserción	aminoácido corresp. / secuencia de AAV-2		SEQ ID NO:	Referencias
I-139	A ₁₃₉	PVKTA ₁₃₉ PGKKR	SEQ ID NO: 20	(Shi et al., 2001, Shi y Bartlett, 2003, Arnold et al., 2006)
I-161	K ₁₆₁	SGT GK ₁₆₁ AGQQP	SEQ ID NO: 21	(Shi et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-261	S ₂₆₁	YKQIS ₂₆₁ SQSGA	SEQ ID NO: 22	(Girod et al., 1999)
I-266	A ₂₆₆	SQSGA ₂₆₆ SNDNH	SEQ ID NO: 23	(Wu et al., 2000)
I-381	N ₃₈₁	YLTLN ₃₈₁ NGSQA	SEQ ID NO: 24	(Girod et al., 1999)
I-447	R ₄₄₇	YYLSR ₄₄₇ TNTPS	SEQ ID NO: 25	(Girod et al., 1999, Wu et al., 2000)
I-448	T ₄₄₈	YLSRT ₄₄₈ NTPSG	SEQ ID NO: 26	(Grifman et al., 2001)
I-459	R ₄₅₉	TTQSR ₄₅₉ LQFSQ	SEQ ID NO: 27	(Shi et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-471	R ₄₇₁	ASDIR ₄₇₁ DQSRN	SEQ ID NO: 28	(Asokan y Samulski, 2006, Moskalenko et al., 2000)
I-520	G ₅₂₀	LVNPG ₅₂₀ PAMAS	SEQ ID NO: 29	(Shi et al., 2006)
I-534	F ₅₃₄	EEKFF ₅₃₄ PQSGV	SEQ ID NO: 30	(Girod et al., 1999)
I-570	P ₅₇₀	<u>R</u> TTNP ₅₇₀ <u>V</u> A <u>T</u> EQ	SEQ ID NO: 124	Datos propios
I-573	T ₅₇₃	NPVAT ₅₇₃ EQYGS	SEQ ID NO: 31	(Girod et al., 1999)
I-584	Q ₅₈₄	STNLQ ₅₈₄ RGNRQ	SEQ ID NO: 32	(Shi et al., 2001, Shi y Bartlett, 2003, Shi et al., 2006)
I-587	N ₅₈₇	LQRGN ₅₈₇ RQAAT	SEQ ID NO: 33	(Girod et al., 1999, Shi et al., 2001, Grifman et al., 2001, Ried et al., 2002, Nicklin et al., 2001, Work et al., 2004, White et al., 2004, Arnold et al., 2006, Maheshri et al., 2006, Work et al., 2006)
I-588	R ₅₈₈	QRG NR ₅₈₈ QAATA	SEQ ID NO: 34	(Shi y Bartlett, 2003, Muller et al., 2003, Waterkamp et al., 2006)
I-591	A ₅₉₁	NRQAA ₅₉₁ TADV N	SEQ ID NO: 35	(Wu et al., 2000)
I-657	P ₆₅₇	VPANP ₆₅₇ STTFS	SEQ ID NO: 36	
I-664	A ₆₆₄	TFSAA ₆₆₄ K FASF	SEQ ID NO: 37	(Wu et al., 2000)
I-713	T ₇₁₃	NVDFT ₇₁₃ VDTNG	SEQ ID NO: 38	
I-716	T ₇₁₆	FTVDT ₇₁₆ NGVYS	SEQ ID NO: 39	(Maheshri et al., 2006)

I-570 es especialmente adecuado como sitio de inserción que va junto con una delección de aminoácidos dados de la proteína estructural de parvovirus en el sitio de inserción, conduciendo a una sustitución completa. En este caso, los aminoácidos RTTNPVATEQ pueden estar sustituidos con un péptido o epi- o mimótopo de direccionamiento.

También se han hecho satisfactoriamente inserciones en serotipos de AAV distintos de AAV-2 (Tabla 4).

Tabla 4: Inserciones en serotipos de AAV distintos de AAV2

Serotipo de AAV	Secuencia	SEQ ID NO :	Sitio de ins. / aminoácido con respecto a AAV2		Referencias
AAV1	FQSSS ₅₈₈ TDPAT	SEQ ID NO: 125	I-587	N ₅₈₇	Datos propios
AAV1	SSSTD ₅₉₀ PATGD	SEQ ID NO: 40	I-589	Q ₅₈₉	(Arnold et al., 2006, Stachler y Bartlett, 2006)
AAV3	NNLQS ₅₈₆ -SNTAP	SEQ ID NO: 41	I-585	K ₅₈₅	(Arnold et al., 2006)
AAV4	GGDQS ₅₈₄ -NSNLP	SEQ ID NO: 42	I-585		(Arnold et al., 2006)
AAV5	TNNQS ₅₇₅ -STTAP	SEQ ID NO: 43	I-585		(Arnold et al., 2006)

5 La nomenclatura usada I-### dentro de la presente invención se refiere al sitio de inserción, nombrando ### el número de aminoácido con respecto a la proteína VP-1 de AAV2, que, sin embargo, significa que la inserción puede localizarse directamente en el extremo N o C, preferentemente extremo C de un aminoácido en la secuencia de 5 aminoácidos del extremo N o C del aminoácido dado, preferentemente 3, más preferentemente 2, especialmente 1 aminoácido(s) del extremo N o C del aminoácido dado. Para parvovirus distintos de AAV2, los sitios de inserción adicionales correspondientes pueden identificarse realizando un alineamiento de aminoácidos o por comparación de las estructuras de la cápsida, si está disponible. Tal alineamiento se ha realizado para los parvovirus AAV1, AAV6, AAV2, AAV3b, AAV7, AAV8, AAV10, AAV4, AAV11, b-AAV, AAV5, GPV, B19, MVM, FPV y CPV (véase la Figura 3).

10 La mayoría del trabajo sobre el direccionamiento de parvovirus se hizo usando AAV2. Sin embargo, debido a la alta conservación de estiramientos al menos grandes y al miembro grande de miembros de la familia estrechamente relacionados, es fácil identificar sitios de AAV2 correspondientes dentro de otros parvovirus, por ejemplo, usando alineamientos como se muestra en la Figura 3.

15 Una inserción en la posición correspondiente del ácido nucleico codificante de uno de estos sitios del gen cap conduce a una inserción en VP-1, VP-2 y/o VP-3, ya que las proteínas cap se codifican solapando marcos de lectura del mismo gen con codones de iniciación escalonados. Por tanto, para AAV2, según esta nomenclatura, las inserciones entre aminoácidos 1 y 138 solo se insertan en VP-1, las inserciones entre 138 y 203 se insertan en VP-1 y VP-2, y las inserciones entre 203 y el extremo C se insertan en VP-1, VP-2 y VP-3, que es, por supuesto, también el caso para el sitio de inserción I-453. Una organización esquemática del gen cap de AAV2 se proporciona en la Figura 1. Por tanto, la presente invención engloba genes estructurales de parvovirus con inserciones correspondientes en las proteínas VP-1, VP-2 y/o VP-3.

Sitios de inserción adicionales más preferidos son I-138, I-261, I-570, I-575, I-584, I-587, I-588 y I-590.

25 El sitio de inserción adicional más preferido es I-587, ya que se han hecho diversas inserciones en el estiramiento de aminoácidos alrededor de N₅₈₇ (LQRGN₅₈₇ RQAAT) de AAV2. Dentro de este estiramiento, se hicieron inserciones de diversos péptidos en el extremo C de los aminoácidos Q₅₈₄, N₅₈₇, R₅₈₈ y A₅₉₁ en AAV2 (Tabla 3) y el extremo C de los aminoácidos de otros serotipos de AAV correspondientes a R₅₈₅ y Q₅₈₉ de AAV2 (Tabla 4).

30 El aminoácido 138 es el extremo N de VP-2. Realizaciones preferidas son proteínas estructurales VP-2 con una fusión del extremo N adicional a uno de los aminoácidos dentro del estiramiento T₁₃₈ de APGKKR. Con el fin de lograr una fusión del extremo N a VP-2 solo, podría usarse una construcción de expresión con la secuencia codificante para VP-2 con el inserto respectivo que comprende su propio codón de iniciación. Esta construcción se co-transfectaría con una construcción de vector donde se eliminó el codón de iniciación para VP-2.

35 Además, preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos insertada adicional puede insertarse en cualquier sitio correspondiente a los primeros 1 a 50 aminoácidos del extremo amino de VP-1.

Dentro de la presente invención se generó una proteína estructural de AAV2 que contenía una inserción de un epítipo derivado de tolerógeno de β-amiloide tanto en I-453 como en I-587. Sorprendentemente, se mostró que en comparación con una proteína estructural que contiene el mismo inserto solo en I-587, las partículas respectivas

fueron mucho mejor reconocidas por un anticuerpo específico de β -amiloide (véase el Ejemplo 5).

Por la presente invención están englobadas adicionalmente mutaciones puntuales tales como sustituciones o delecciones internas, donde al menos un aminoácido se deleciona o sustituye con un aminoácido diferente que disminuye la unión de la proteína estructural y/o partículas respectivas compuestas de las proteínas estructurales a receptores celulares primarios o secundarios para el virus respectivo. Este des-direccionamiento del virus de su célula huésped natural es importante, especialmente si está prevista administración sistémica frente a local o loco-regional de las partículas, ya que la captación de las partículas por las células huésped naturales limita la dosis eficaz de las partículas. En caso de HSPG de AAV2 y AAV6, se informa que es el receptor primario para la captación viral en un gran número de células, especialmente células del hígado. Para AAV2, la actividad de unión de HSPG depende de un grupo de 5 aminoácidos básicos, R₄₈₄, R₄₈₇, R₅₈₅, R₅₈₈ y K₅₃₂ (Kern et al., 2003). Recientemente se informó que la sustitución de aminoácidos de lisina a glutamato K₅₃₁E conduce a la supresión de la capacidad de AAV6 para unirse a heparina o HSPG ((Wu et al., 2006)).

Por consiguiente, mutaciones puntuales preferidas son aquellas que reducen la actividad de transducción de la partícula para una célula diana dada mediada por el receptor natural al menos el 50 %, preferentemente al menos el 80 %, especialmente al menos el 95 %, en caso de HSPG como receptor primario la unión de las partículas a HSPG. La capacidad de transducción puede determinarse como se describe en el Ejemplo 6.1 como la relación GenP/tP (véase también anteriormente).

Por consiguiente, mutaciones adicionales preferidas para las partículas de unión de HSPG son aquellas mutaciones que agotan o sustituyen un aminoácido básico tal como R, K o H, preferentemente R o K, que participa en la unión de HSPG del virus respectivo, por un aminoácido no básico tal como A, D, G, Q, S y T, preferentemente A o un aminoácido que está presente en la posición correspondiente de un serotipo de AAV diferente, pero altamente conservado, que carece de tal aminoácido básico en esta posición. Por consiguiente, sustituciones de aminoácidos preferidas son R₄₈₄A, R₄₈₇A, R₄₈₇G, K₅₃₂A, K₅₃₂D, R₅₈₅A, R₅₈₅S, R₅₈₅Q, R₅₈₈A o R₅₈₈T, especialmente R₅₈₅A y/o R₅₈₈A para AAV2, y K₅₃₁A o K₅₃₁E para AAV6.

Una realización especialmente preferida de la invención son tales estructuras multiméricas que comprenden mutantes de proteína estructural de AAV2 que contienen adicionalmente las dos mutaciones puntuales R₅₈₅A y R₅₈₈A, ya que estas dos mutaciones puntuales son suficientes para degradar la actividad de unión de HSPG a un gran grado. Estas mutaciones puntuales permiten un des-direccionamiento eficaz de las células que expresan HSPG que - para fines de direccionamiento - aumentan la especificidad del virus mutante respectivo para su nueva célula diana. Además, estas mutaciones puntuales parecen conducir a un cambio estructural que convierte al mutante de la cápsida RGD4C 453 A2 en transductor (Figura 7).

También es una realización de la presente invención que la proteína estructural mutada de parvovirus comprenda al menos una mutación adicional que reduce la capacidad para inducir una respuesta de linfocitos B contra un epítipo y/o mimótopo específico de parvovirus, reduciendo así la antigenicidad natural de la partícula respectiva. La administración de partículas, bien como vacunas o como vectores, está normalmente impedida por anticuerpos existentes dirigidos contra ciertos epítopos de la partícula/cápsida. En caso de AAV2, la mayoría de la población humana tiene un estado en suero AAV2 positivo. En caso de parvovirus no humanos, el paciente generará una fuerte respuesta inmunitaria humoral contra el esqueleto de la partícula que puede neutralizar el vector o puede dominar una respuesta inmunitaria prevista contra un epítipo insertado. Se han descrito mutaciones puntuales, además de inserciones, para modificar la antigenicidad natural de partículas para evadir una respuesta inmunitaria preexistente (por ejemplo, (Huttner et al., 2003); documento WO 01/05990). Perabo et al. fueron capaces de identificar mutaciones puntuales que aumentaron la capacidad de escape inmunitario de AAV2 hasta valores de N50 5,5 veces mayores (cantidad de suero humano necesaria para reducir a la mitad el número de células transducidas) en comparación con AAV2 con proteínas estructurales no mutantes (Perabo et al., 2006a), concretamente una mutación puntual en las posiciones R₄₅₉ y N₅₅₁. Por tanto, otra realización preferida es una estructura multimérica que comprende una proteína estructural mutada que comprende además una mutación puntual que reduce la capacidad para inducir una respuesta de linfocitos B contra un epítipo y/o mimótopo específico de AAV, preferentemente para AAV2 una mutación puntual en la posición R₄₅₉ y/o N₅₅₁.

También puede usarse otra mutación para componer mimótopos más complejos o para potenciar la correcta presentación de una secuencia de aminoácidos insertada. Tales mutaciones adicionales pueden tanto identificarse usando software de predicción de estructuras como insertando mutaciones puntuales al azar en el gen cap respectivo, por ejemplo, por PCR propensa a error y entonces seleccionando para presentación madurada de las secuencias de aminoácidos insertada.

En otra realización preferida, la mutación adicional podría ser adecuada para introducir al menos un epítipo de linfocitos T citotóxicos (epítipo CTL). Para tanto las enfermedades infecciosas como el cáncer lo más útil es combinar tanto las respuestas inmunitarias humorales como celulares para luchar contra estas enfermedades. Las estructuras multiméricas según la presente invención son en principio capaces de pseudo-infectar células. Por consiguiente, estas estructuras - al igual que los virus - son capaces de entrar en las células, se procesan a

péptidos, los péptidos se cargan sobre moléculas de clase I y II de MHC y finalmente se presentan a linfocitos T positivos para CD8 o CD4. Los linfocitos T llegar a estimularse después del reconocimiento específico de tal péptido procesado presentado por moléculas de clase I y II de MHC. Como consecuencia de tal estimulación, las células CD8 pueden diferenciarse en linfocitos T citotóxicos y entonces producir una respuesta inmunitaria celular. Las células CD4 pueden desarrollarse en linfocitos T colaboradores que estimulan los linfocitos B para proporcionar una respuesta inmunitaria humoral o linfocitos T positivos para CD8 para proporcionar una respuesta inmunitaria citotóxica, que pueden ellas mismas inducir la lisis de células infectadas y otras células que llevan y presentar el mismo péptido. Epítomos CTL adecuados son conocidos en la técnica para diversos antígenos del cáncer o antígenos virales, o pueden predecirse a partir de secuencias de antígeno dadas usando, por ejemplo, el programa de predicción de péptidos por Parker bajo http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/ (Parker et al., 1994). Epítomos CTL propuestos pueden ser validados según los métodos como se ejemplifica para epítomos del HPV en el documento US 6.838.084, Ejemplos 2-8 (incorporado en el presente documento por referencia). A medida que se produce el procesamiento de epítomos de CTL dentro de la célula no es necesario que tales epítomos de CTL estén localizados sobre la superficie o estén presentes en una conformación específica.

Una realización adicional de la presente invención es una biblioteca de proteínas estructurales, en la que la biblioteca comprende un conjunto de proteínas estructurales parvovirales diferentes insertadas en I-453 como se ha descrito anteriormente. Las bibliotecas de AAV2 ha sido descritas previamente para el sitio de inserción I-587 (Perabo et al., 2003, Lieber, 2003, Muller et al., 2003). La misma tecnología puede igualmente aplicarse al sitio de inserción I-453 recientemente identificado. Las ventajas descritas para el sitio de inserción I-453 para inserciones frente a I-587 y otros sitios en general se aplican igualmente a una biblioteca generada para el sitio de inserción I-453. Por ejemplo, usando bibliotecas basadas en I-453 puede producirse la selección de otros péptidos (como, por ejemplo, con bibliotecas basadas en I-587) ya que los residuos vecinos pueden tener una influencia sobre la exposición y funcionalidad de los péptidos insertados en la proteína estructural. Además, los sitios (I-587 y I-453) están localizados sobre bucles diferentes de la cápsida de AAV. Así, puede asumirse un mecanismo diferente de interacción celular. Además, las partículas de AAV derivadas de bibliotecas de I-453 pueden purificarse con cromatografía de afinidad por heparina, ya que el sitio de unión de heparina que se solapa con I-587 está todavía intacto. Además, puede usarse una biblioteca con conjuntos insertados de inserciones de aminoácido en tanto I-453 como otro sitio de inserción para potenciar la multiplicidad de la biblioteca y seleccionar proteínas estructurales con mayores afinidades de unión.

En una realización preferida, se acoplan el genotipo y fenotipo de partículas de virión de la biblioteca. Esto significa que el mutante genómico del virión es idéntico al mutante fenotípico del mismo virión o, en otras palabras, que cada virus estructuralmente modificado codifica su proteína estructural mutante.

A diferencia de una transformación bacteriana, donde solo un bacteriófago se recoge por una célula bacteriana, usando métodos de transfección para células eucariotas, pueden recogerse muchas copias de ADN (hasta 1×10^6) por célula (Dean et al., 2005). Por tanto, en el caso de una biblioteca de AAV, una célula puede replicar miles de genomas de AAV al mismo tiempo donde cada uno puede expresar una proteína estructural mutada diferente con una secuencia de péptidos diferente insertada en VP1, VP2 y/o VP3 de AAV. Al menos algunas de estas proteínas estructurales pueden parecerse a una cápsida viral completa (que consiste en 5 proteínas VP1, 5 VP2 y 50 VP3) que encapsidan esencialmente solo uno de los miles genomas de AAV presentes en la célula. En caso de una biblioteca geno-/fenotípicamente acoplada, al menos el 10 %, preferentemente más del 25 %, especialmente más del 50 % de las partículas de AAV resultantes, tienen un genoma encapsulado que codifica al menos el 25 %, preferentemente más del 50 %, especialmente más del 80 % de las 60 proteínas VP de las que está compuesta su cápsida. Como consecuencia, si se usó una biblioteca no acoplada para un primer cribado contra un anticuerpo diana o receptor diana, la probabilidad de que las partículas cribadas contuvieran el genoma que codifica esta secuencia de aminoácidos específica podría ser muy baja.

En general, se obtienen partículas/bibliotecas de virión geno-/fenotípicamente acopladas cuando se introduce esencialmente una única copia del genoma del virus en cada célula de producción de virión que entra en el núcleo de la célula. Esta célula solo producirá variantes de proteína de la cápsida codificadas de exactamente el genoma introducido que se replica y después se encapsida en la partícula de virión mutante. Diferentes configuraciones experimentales pueden garantizar esto:

Para obtener una biblioteca geno-/fenotípicamente acoplada de viriones de parvovirus, se produce una biblioteca de viriones de parvovirus transfectando una biblioteca de plásmidos en células de producción bajo condiciones adecuadas, mientras que se usa un bajo número de copias de genomas virales igual a o inferior a 100 genomas por célula, preferentemente igual a o inferior a 10 genomas, más preferentemente igual a o inferior a un genoma por célula, produciendo viriones/biblioteca geno-/fenotípicamente acoplados. La eficacia de transfección global será finalmente decisiva del número ideal de genomas de virus por célula que va a transfectarse.

La cantidad requerida de plásmido de virus puede cuantificarse, si, por ejemplo, se usan plásmidos de replicación autónoma con tamaño similar al genoma de virus que codifica un gen indicador tal como GFP como sistema modelo. Los plásmidos de replicación autónoma son, por ejemplo, sistemas que comprenden origen de replicación SV40 y

antígeno T grande o el origen P1 del VEB (virus de Epstein-Barr) y EBNA. Cantidades crecientes del plásmido del gen indicador auto-replicante se co-transfectan con ADN de vehículo tal como ADN de plásmido vacío (por ejemplo, derivados de pUC) que mantiene la cantidad de ADN total constante. En teoría, cada célula transfectada con el plásmido de gen indicador expresará, debido a su auto-replicación, cantidades suficientes de la proteína indicadora que va a detectarse. A alguna relación de vector de gen indicador con respecto a ADN de vehículo, un aumento adicional de plásmido de gen indicador conducirá a un aumento correspondiente en el número de células transfectadas. Por este medio, puede determinarse la cantidad ideal de plásmido de gen indicador auto-replicante, reflejando la cantidad ideal de genomas de vector.

Similarmente, otro sistema de lectura para la detección de células satisfactoriamente transfectadas son métodos tales como PCR *in situ* para detectar el genoma de plásmido transfectado al nivel de una única célula.

Alternativamente, la biblioteca geno-/fenotípicamente acoplada de viriones de parvovirus puede producirse transduciendo una biblioteca de viriones (no acoplada o parcialmente) en células de producción bajo condiciones adecuadas a una relación de genomas por célula de 5 a 5.000, preferentemente 10 a 1.000, más preferentemente 50 a 300, especialmente aproximadamente 100, y seleccionando condiciones de transducción para que sean independientes de las vías de infección, particularmente mediante captación no específica mediante pinocitosis y/o fagocitosis, produciendo viriones/biblioteca geno-/fenotípicamente acoplados.

Es especialmente relevante para el cribado de proteínas estructurales que tienen insertos de epítipo el método usado para infectar células después de que los viriones de unión se hayan separado de viriones no de unión. Se sabe que una inserción de péptido en el sitio de I-587 de AAV2 frecuentemente destruye (dependiendo de la secuencia del péptido insertado) el motivo de unión de heparina requerido para la eficiente infección del receptor de HSPG que contiene células tales como células HeLa o 293. Ahora se ha encontrado que una inserción en I-453 opcionalmente en combinación con I-587 puede alterar la actividad de transducción de viriones respectivos. Por tanto, métodos de infección simple podrían influir en el método de cribado y conducir solo a mutantes que todavía pueden entrar en células HeLa específicamente mediante el receptor respectivo, en caso de AAV2 mediante proteoglicano de sulfato de heparano (HSPG). Por tanto, una captación no específica de partícula de virus por la célula de producción puede ser ventajosa. Tal captación no específica puede lograrse sembrando las células de producción sobre viriones de parvovirus inmovilizados. Para este método, los viriones se recubren directamente a un soporte tal como una placa de cultivo de tejido. Alternativamente, primero un anticuerpo específico de cápsida (en el caso de AAV2, por ejemplo, A20) se recubre al soporte y segundo las cápsidas se unen a los anticuerpos recubiertos. La ventaja en el último caso es que el complejo de partícula de anticuerpo/virus, respectivamente la propia partícula de virus, se desprende más eficazmente del soporte y así se internaliza por la célula. Y, lo que es más importante, la introducción de secuencias de péptidos extrañas en I-453 de AAV2 no destruye la afinidad de A20 por la partícula mutante respectiva, ya que los epítopos de A20 están difícilmente afectados, si lo están, por la inserción de péptido. Las células, por ejemplo, células HeLa, se siembran finalmente sobre las cápsidas unidas. Se espera que este procedimiento conduzca a una captación del virus, por ejemplo, AAV, por la célula independiente de la vía infecciosa natural, supuestamente por pinocitosis y/o fagocitosis.

Alternativamente o adicionalmente, la etapa de selección puede llevarse a cabo sobre células que expresan un receptor específico para un ligante de elección que se usa para seleccionar la variante parvoviral deseada. Por ejemplo, pueden usarse células que expresan el FcγRI que es específico para cualquier ligante que comprende una parte Fc de un anticuerpo. Para este ejemplo, tales células que expresan FcγRI pueden transducirse con un conjunto de bibliotecas de parvovirus. Primero, puede realizarse una selección negativa para evitar la selección no específica de candidatos parvovirales que por ellos mismos son capaces de transducir células independientemente de una interacción de un ligante con el FcγRI. Por tanto, las células que expresan FcγRI se incuban con el conjunto de bibliotecas. El sobrenadante (conjunto de parvovirus que no es capaz de transducir las células) se recoge y posteriormente se incuba con el ligante de elección (por ejemplo, anticuerpo de selección) para realizar la selección positiva. En la selección positiva, los parvovirus decorados con el ligante serán capaces de transducir células que expresan FcγRI mediante el acoplamiento del ligante al FcγRI sobre la superficie de las células. Las células transducidas pueden posteriormente usarse para amplificar las partículas en presencia del ligante, suponiendo que el tráfico intracelular no esté alterado dentro de las células.

En otra realización preferida, puede obtenerse una biblioteca geno-/fenotípicamente acoplada de viriones de parvovirus por un método donde viriones seleccionados son específicamente captados por células de producción. En este caso, la biblioteca de viriones de parvovirus se produce transduciendo la biblioteca en células de producción bajo condiciones adecuadas a una relación de genomas por célula de 10 a 10.000, preferentemente 50 a 5.000, más preferentemente 100 a 3.000, especialmente aproximadamente 1.000, en la que las condiciones de transducción están seleccionadas para ser dependientes de las vías de infección, particularmente mediante la unión específica de receptor, produciendo viriones/biblioteca geno-/fenotípicamente acopladas. Con el fin de lograr tal captación específica de receptor, los viriones de la biblioteca son preferentemente no inmovilizados, pero se añaden a las células en suspensión, mientras que tanto las células como los viriones pueden estar en suspensión o las células se inmovilizan y se añaden viriones en suspensión. Por tanto, la transfección de las células es básicamente dependiente de la vía de infección del virus.

5 La dependencia de las vías de infección significa que los viriones son recogidos por las células, por ejemplo, mediante captación específica de receptor, por ejemplo, para captación específica de proteoglicano de sulfato de heparina (HSPG) de AAV2 (por ejemplo, para las bibliotecas de virión donde las vías de infección naturales no son bloqueadas o destruidas por las secuencias de péptidos al azar insertadas). Para mantener la biodiversidad de la biblioteca durante la etapa de acoplamiento (tanto por transfección de genomas de virus como por transducción de células con partículas de virión por cualquier medio, captación o infección), siempre debe transducirse un exceso de al menos 10 veces, preferentemente 100 veces, especialmente 500 veces de partículas genómicas, en comparación con la multiplicidad de mutantes parvovirales con el fin de garantizar que se amplifique cada variante de virus. Para garantizar adicionalmente que cada virus se acople en la biblioteca resultante, va a usarse un exceso de al menos 2 veces, preferentemente al menos 5 veces, de células en comparación con el número total de partículas genómicas.

15 Se desea el acoplamiento de geno-/fenotipo, ya que la información genética del ADN encapsidado puede usarse fácilmente para obtener la secuencia de aquellas partículas que tienen alta afinidad o avidéz por el ligante de antígeno respectivo. Es un objetivo de la invención usar la identificación de una proteína estructural mutada de parvovirus tal como bibliotecas geno-/fenotípicamente acopladas con un acoplamiento de al menos el 5 %, preferentemente de al menos el 25 % y más preferentemente de al menos el 50 %, especialmente de al menos el 90 %.

20 En una realización preferida, la biblioteca de la presente invención tiene una multiplicidad de mutantes parvovirales de superior a 10^3 , preferentemente superior a 10^5 , más preferentemente superior a 10^6 , especialmente superior a 10^7 . Multiplicidad significa según la presente invención el número de diferentes viriones o genomas virales dentro de la biblioteca. En principio es ventajoso usar una biblioteca de alta multiplicidad ya que la verosimilitud para identificar un clon óptimo aumenta con la multiplicidad de la biblioteca. La multiplicidad de la biblioteca se genera por inserción de un inserto de ácido nucleico en la región codificante del gen que codifica una proteína estructural parvoviral que conduce a una inserción de aminoácido en una posición dentro de la proteína estructural parvoviral.

25 Una realización de la presente invención es una estructura multimérica que comprende una proteína estructural de parvovirus de la presente invención. Una estructura multimérica según la presente invención es una estructura de al menos 5, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 30, lo más preferentemente al menos 60 proteínas estructurales. Pueden formar partículas regulares tales como capsómeros, partículas similares a virus (envolturas virales vacías) o cápsidas. Alternativamente, también pueden formar agregados no regulares. Como se ha explicado anteriormente, la formación de partículas capaces de encapsidar un genoma viral es una característica altamente preferida, particularmente si las proteínas estructurales de la presente invención deben usarse como vectores virales. En caso de que las proteínas estructurales estén previstas para su uso como vacunas, tal formación de partículas puede no ser necesaria para ejercer una respuesta inmunitaria suficiente y capsómeros o agregados pueden ser suficientes. Todavía, se cree que la formación de partículas también es beneficiosa para la presentación de los epítopos insertados, especialmente si la reticulación directa de epítopos de linfocitos B es necesaria para romper la tolerancia.

35 Una realización de la presente invención es un ácido nucleico que codifica una proteína estructural como se ha descrito anteriormente. El ácido nucleico es preferentemente un vector que comprende el nucleico reivindicado. Los ácidos nucleicos, especialmente los vectores, son necesarios para expresar recombinantemente las proteínas estructurales de la presente invención.

40 Otra realización es una biblioteca de vectores, en la que la biblioteca comprende un conjunto de diferentes vectores descritos anteriormente. En una realización preferida, la biblioteca tiene una multiplicidad de mutantes parvovirales de superior a 10^3 , preferentemente superior a 10^5 , más preferentemente superior a 10^6 , especialmente superior a 10^7 . Multiplicidad significa según la presente invención el número de viriones diferentes o genomas virales dentro de la biblioteca. En principio es ventajoso usar una biblioteca de alta multiplicidad ya que la verosimilitud para identificar un clon adecuado o incluso ideal aumenta con la multiplicidad de la biblioteca.

45 Otra realización de la presente invención es un virus, preferentemente un parvovirus como se ha caracterizado adicionalmente anteriormente, que comprende un ácido nucleico como se ha caracterizado anteriormente o un vector como se ha caracterizado anteriormente.

50 Otra realización de la presente invención es una célula aislada que comprende un ácido nucleico como se ha caracterizado anteriormente o un vector como se ha caracterizado anteriormente.

Otra realización de las proteínas estructurales mutadas según la presente invención es su uso para terapia génica. El vector de terapia génica se formula para contener sales comunes, tampón y excipientes. El vector de terapia génica según la presente invención puede administrarse por vías de administración comunes tales como por vía intravenosa o local o loco-regional.

55

También se describe un proceso para la preparación de una proteína estructural de un parvovirus, comprendiendo el método las etapas de:

- a) expresar un ácido nucleico según la presente invención bajo condiciones adecuadas, y
- b) aislar la proteína estructural expresada de la etapa a).

5 Otras realizaciones de la presente invención es un método para alterar el tropismo de un parvovirus, comprendiendo el método las etapas de: a) co-expresar funciones de colaborador parvoviral y de vector, en las que la función de colaborador expresa una proteína estructural parvoviral según la presente invención en condiciones que permiten la formación de parvovirus, y b) aislar el parvovirus

10 Otra realización de la presente invención es un método para presentar un epítipo sobre la superficie de un parvovirus, comprendiendo el método las etapas de: a) expresar el ácido nucleico según la presente invención bajo condiciones adecuadas, y b) aislar la proteína estructural expresada de la etapa a).

15 También se describe un método de vacunación de un mamífero, comprendiendo el método la vacunación de un mamífero, preferentemente un ser humano, con una proteína estructural, preferentemente una partícula según la presente invención. Como se ha desvelado anteriormente, la proteína estructural se formula para contener sales comunes, tampón, excipientes y/o adyuvantes. Adyuvantes preferidos se enumeran más adelante. Las vacunas según la presente invención pueden administrarse por vías de administración comunes como se describen más adelante. Tal vacunación se usa preferentemente para romper la tolerancia inmunitaria, sino también para tratar enfermedades infecciosas, comprendiendo el método la vacunación de un mamífero, preferentemente un ser humano, con una proteína estructural según la invención.

20 Adicionalmente se describe un método de transducción de células *in vitro* o *in vivo*, comprendiendo el método las etapas de: a) co-expresar funciones de colaborador parvoviral y de vector, en las que la función de colaborador expresa una proteína estructural parvoviral según la presente invención en condiciones que permiten la formación de parvovirus, b) aislar el parvovirus, y c) transducir las células con dicho parvovirus.

25 Se da un método de producción de una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende una multiplicidad de ácidos nucleicos expresables según la presente invención se administra, que comprende las etapas de: a) proporcionar un conjunto de ácidos nucleicos que codifica cada uno una proteína estructural parvoviral, b) insertar una biblioteca de insertos en marco en una pluralidad de ácidos nucleicos en una posición correspondiente a la definida en el presente documento.

30 Otra realización de la presente invención es un medicamento que comprende al menos una proteína estructural de parvovirus según la presente invención y/o un ácido nucleico según la presente invención, preferentemente al menos una estructura multimérica según la presente invención. Preferentemente, tal medicamento se usa como vacuna o como un vector de transferencia génica. La proteína estructural de parvovirus según la presente invención, el ácido nucleico según la presente invención, y la estructura multimérica según la presente invención pueden definirse como se ha detallado anteriormente.

35 Otra realización de la presente invención es el uso de al menos una proteína estructural de parvovirus según la presente invención y/o un ácido nucleico según la presente invención, preferentemente al menos una estructura multimérica según la presente invención para la fabricación de una vacuna o para su uso como un vector de transferencia génica.

40 Como se ha descrito anteriormente, una utilidad preferida de las proteínas estructurales mutadas según la presente invención es su uso como vacuna. Vacuna en el contexto de la presente invención significa que una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta inmunitaria humoral, se genera después de la administración de la proteína estructural mutada. La vacuna se formula para contener sales comunes, tampón, excipientes y/o adyuvantes.

45 El medicamento de la presente invención puede englobar adicionalmente vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención son convencionales y pueden incluir tampones, estabilizadores, diluyentes, conservantes y solubilizantes. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica del (de los) (poli) péptidos desvelado(s) en el presente documento. En general, la naturaleza del vehículo o excipientes dependerá del modo de administración particular que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de

magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que van a administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitano.

5 En una realización preferida, el medicamento comprende además una sustancia inmunoestimulante tal como un adyuvante. El adyuvante puede seleccionarse basándose en el método de administración y puede incluir adyuvantes basados en aceite mineral tales como adyuvante completo e incompleto de Freund, adyuvante incompleto Montanide de Seppic tal como ISA, adyuvantes de emulsión de aceite en agua tales como el sistema de adyuvantes de Ribi, formulación de adyuvante syntax que contiene muramil dipéptido, o adyuvantes de sales de aluminio. Preferentemente, el adyuvante es un adyuvante basado en aceite mineral, especialmente ISA206 (SEPPIC, París, Francia), lo más preferentemente ISA51 (SEPPIC, París, Francia). En otra realización preferida, la proteína estructural mutada de parvovirus se co-formula con al menos un adyuvante adecuado tal como CpG, imidazoquinolinas, MPL, MDP, MALP; flagelina, LPS, LTA, o toxina del cólera o derivado de la misma, HSP60, HSP70, HSP90, saponinas, QS21, ISCOMs, CFA, SAF, MF59, adamantanos, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o una citocina.

En una realización más preferida, la sustancia inmunoestimulante está seleccionada del grupo que comprende polímeros policatiónicos, especialmente péptidos policatiónicos tales como poliarginina, desoxinucleótidos inmunoestimulantes (ODNs), péptidos que contienen al menos dos motivos LysLeuLys, especialmente KLKLLLLLKLK (SEQ ID NO: 126), compuestos neuroactivos, especialmente hormona de crecimiento humana, alumbre, adyuvantes o combinaciones de los mismos. Preferentemente, la combinación es tanto un polipolímero catiónico y desoxinucleótidos inmunoestimulantes como de un péptido que contiene al menos dos motivos LysLeuLys y desoxinucleótidos inmunoestimulantes. En una realización todavía más preferida, el polímero policatiónico es un péptido policatiónico.

En una realización incluso más preferida de la invención, la sustancia inmunoestimulante es al menos un ácido nucleico inmunoestimulante. Ácidos nucleicos inmunoestimulantes son, por ejemplo, ácidos nucleicos neutros o artificiales que contienen CpG, estiramientos cortos de ácidos nucleicos derivados de no vertebrados o en forma de oligonucleótidos cortos (ODNs) que contienen dinucleótidos citosina-guanina no metilados (CpG) en un contexto de base definido (por ejemplo, como se describe en el documento WO 96/02555). Alternativamente, también pueden usarse preferentemente ácidos nucleicos basados en inosina y citidina como se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/93903, o ácidos desoxinucleicos que contienen restos de desoxi-inosina y/o desoxiuridina (descritos en los documentos WO 01/93905 y WO 02/095027) como ácidos nucleicos inmunoestimulantes en la presente invención. Preferentemente, se usan mezclas de diferentes ácidos nucleicos inmunoestimulantes en la presente invención. Adicionalmente, los compuestos policatiónicos anteriormente mencionados pueden combinarse con cualquiera de los ácidos nucleicos inmunoestimulantes que se han mencionado anteriormente. Preferentemente, tales combinaciones son según las descritas en los documentos WO 01/93905, WO 02/32451, WO 01/54720, WO 01/93903, WO 02/13857 y WO 02/095027 y la solicitud de patente australiana A 1924/2001.

En una realización adicional, la proteína estructural mutada de parvovirus de la presente invención se usa para la fabricación de una vacuna para prevenir o tratar una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, diabetes tipo 1), una enfermedad tumoral (ejemplos son: melanoma: por ejemplo, HMW MAA, glioblastoma multiforme: por ejemplo, CA125, anti-IL13R, cáncer de colon: por ejemplo, CA125 o anti-EGF(R), cáncer de mama: por ejemplo, HER2/NEU, cáncer de ovario: por ejemplo, molécula de adhesión L1, linfoma de linfocitos B: por ejemplo, CD20), una enfermedad alérgica (asma, alergias tales como rinitis alérgica, por ejemplo, IgE), una enfermedad metabólica (por ejemplo, colesterol alto, intervención en el metabolismo del colesterol, obesidad, hipertensión, por ejemplo, CETP), una enfermedad inflamatoria (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, por ejemplo, IL-6, IL-17, TNF- α), una enfermedad neurológica (por ejemplo, Alzheimer, por ejemplo, β -amiloide) o que va a usarse en oftalmología.

Ejemplos de enfermedad autoinmunitaria que son especialmente adecuados para la presente invención se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5: Enfermedades autoinmunitarias y dianas/antígenos de anticuerpo adecuados

Enfermedad	diana/antígeno de anticuerpo
Miastenia grave	Receptores de acetilcolina
Enfermedad de Graves	Receptor de la hormona estimulante de la tiroides
Tiroiditis	Tiroides
Diabetes resistente a insulina	Receptor de insulina
Asma	Receptores beta-2 adrenérgicos

Enfermedad	diana/antígeno de anticuerpo
Diabetes juvenil dependiente de insulina	Células de los islotes pancreáticos
Anemia perniciosa	Células parietales gástricas
Enfermedad de Addison	Células suprarrenales
Hipoparatiroidismo idiopático	Células de la paratiroides
Infertilidad espontánea	Esperma
Fallo ovárico prematuro	Células intersticiales, células del cuerpo lúteo
Pénfigo	Sustancia de piel intercelular
Cirrosis biliar primaria	Mitocondrias
Anemia hemolítica autoinmune	Eritrocitos
Púrpura trombocitopénica idiopática	Plaquetas
Neutropenia idiopática	Neutrófilos
Vitiligo	Melanocitos
Osteosclerosis y enfermedad de Meniere	Colágeno tipo II
Hepatitis activa crónica	Núcleos de hepatocitos
Síndrome de Goodpasture	Membranas basales
Artritis reumatoide	Gamma globulina, antígenos relacionados con el virus, IL-6, IL-17, TNF- α
Síndrome de Sjögren	Núcleos y centrómeros
Lupus eritematoso sistémico	Núcleos, ADN, ARN, eritrocitos, etc.
Esclerodermia	Núcleos y centrómeros
Polimiositis	Núcleos, ARN

5 Enfermedades autoinmunitarias preferidas son asma, diabetes juvenil dependiente de insulina (diabetes tipo 1) y artritis reumatoide. Por tanto, antígenos preferidos son los antígenos correspondientes de receptores beta-2 adrenérgicos, células de los islotes pancreáticos, gamma globulina E, antígenos relacionados con virus, IL-6, IL-17 y TNF- α .

Ejemplos de enfermedades tumorales que son especialmente adecuadas para la presente invención se enumeran en la Tabla 6.

Tabla 6: Enfermedades tumorales y dianas/antígenos de anticuerpo adecuados

Enfermedad	diana/antígeno de anticuerpo
Melanoma	HMW MAA (= antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular), BAGE, GAGE, MAGE-3, Melan A, MART-1, NY ESO, gp 100, tirosinasa
Cáncer de colon	CA125, EGFR
Glioblastoma multiforme (GBM)	CA125, IL13R
Cáncer de mama	Her2/NEU
Cáncer de ovario	molécula de adhesión a células L1
diversos cánceres (por ejemplo, para cáncer de colon, carcinoma de células pulmonares pequeñas)	VEGF
linfoma de linfocitos B, por ejemplo, linfoma no Hodgkin	CD20

Ejemplos de enfermedades alérgicas son asma, especialmente asma atópica, y todos los tipos de alergias. Los antígenos diana preferidos para la vacunación contra enfermedades alérgicas son IgE, IL-9 y IL-13, especialmente IgE.

5 Un ejemplo de una enfermedad metabólica es un trastorno en el metabolismo del colesterol (por ejemplo, aterosclerosis), un antígeno diana preferido es CETP.

Ejemplos de enfermedades inflamatorias que son especialmente adecuadas para la presente invención se enumeran en la Tabla 7.

Tabla 7: Enfermedades inflamatorias y dianas/antígenos de anticuerpo adecuados

Enfermedad
EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica)
OA (osteoartritis)
Artritis reumatoide
Polimialgia reumática
Artritis gotosa, gota, pseudogota
Aterosclerosis
Enfermedad de Crohn (enfermedad inflamatoria del intestino)
Tendinitis del hombro, bursitis
Colitis
Esclerosis múltiple
Lupus eritematoso sistémico
Psoriasis
Diabetes juvenil
Diabetes mellitus tipo I (diabetes resistente a insulina)
Hipotiroidismo
Síndrome de fatiga crónica
Enfermedad de Kawasaki
Enfermedad cardiovascular
Pericarditis
Adenopatía linfática
Fenómeno de Raynaud
Sarcoidosis
Síndrome de Sjögren
Espondiloartropatías
Vasculitis
Esclerodermia
Síndrome de Goodpasture
Granulomatosis de Wegener
temporal = arteritis de células gigantes
Celiaquía
Enfermedad de Addison

Enfermedad
Hepatitis autoinmune
Enfermedad de Graves
Enfermedad de injerto frente al huésped

Antígenos diana preferidos son TNF- α , CD20, IL-6 y IL-17.

Ejemplos de enfermedades en oftalmología son degeneración macular senil (AMD) y retinopatía diabética, una diana preferida en estas indicaciones es VEGF.

5 Otras enfermedades preferidas son enfermedad de Alzheimer con el antígeno diana β -amiloide.

La proteína estructural mutada de parvovirus según la presente invención puede ser especialmente útil para la fabricación de un medicamento para romper la tolerancia inmunitaria.

En el contexto de los usos de la invención, las características de la proteína estructural mutada de parvovirus son como se han definido anteriormente.

10 En una realización preferida, la enfermedad no es una enfermedad infecciosa, que significa una enfermedad producida por un virus, una bacteria, un hongo o un parásito eucariota.

En otra realización, la proteína estructural mutada de parvovirus no se usa para preparar un vector que se usa en terapia génica.

15 Una realización preferida de la presente invención es una proteína estructural de un parvovirus como se ha definido adicionalmente anteriormente que comprende un epi-/mimótopo antiidiotípico de un anticuerpo anti-IgE, y/o un epi-/mimótopo de IgE. Vacunas preferidas son las siguientes:

Vacunas para el tratamiento de asma y enfermedades alérgicas

20 El asma atópica y la rinitis alérgica se producen por respuestas inmunitarias adversas, tipificadas por IgE, contra proteínas ambientales por lo demás inocuas, los alérgenos. En individuos sensibilizados, IgE específica de alérgeno se localiza en tejidos uniéndose al receptor de alta afinidad para IgE, Fc ϵ RI, expresado por mastocitos en diversos tejidos y basófilos, además de eosinófilos en la sangre. Encuentros posteriores con el alérgeno producen la reticulación de IgE/Fc ϵ RI, que desencadena la desgranulación de células efectoras y la liberación de tanto mediadores previamente formados (histamina, enzimas proteolíticas y proteoglicanos) como mediadores sintetizados *de novo* (prostaglandina D₂, leucotrienos y citocinas). Juntos, estos mediadores son responsables de las manifestaciones clínicas de reacciones alérgicas, que incluyen fiebre del heno, asma y eccema, además de reacciones anafilácticas potencialmente mortales. La terapia estándar incluye corticosteroides inhalados (ICS), dipropionato de beclometasona (BDP), β -agonistas de acción prolongada (LABA) y antagonistas de receptores del leucotrieno (LTRAs).

30 La región de unión al receptor de IgE humana se mapeó previamente con la región del extremo N del dominio CH3 (Helm et al., 1988, Helm et al., 1989). Se han realizado estudios de mutagénesis dirigida al sitio para identificar los restos de aminoácidos implicados directamente en la interacción en tanto IgE (Presta et al., 1994) como Fc ϵ RI (Cook et al., 1997). Además, la estructura cristalina del complejo humano de IgE-Fc ϵ RI α se resolvió recientemente por Garman y colaboradores (Garman et al., 2000). Las regiones de aminoácido que participan en la unión al receptor están localizadas en tres bucles y se extienden sobre la mayoría del dominio C ϵ 3 (Pro-364, Arg-365, Arg-408, Ser-35 411, Lys-415, Glu-452, Arg-465 y Met-469). La unión está mediada principalmente por interacción electrostática.

La terapia anti-IgE se basa en anticuerpos que se unen a la región C ϵ 3 del dominio diana de unión al receptor de IgE, previniendo así la unión de IgE al receptor Fc ϵ RI y, por tanto, previniendo la sensibilización de mastocitos y basófilos. Sin embargo, aunque el 99 % de IgE libre se neutralizó por el anticuerpo anti-IgE, la terapia todavía fracasaría debido a que las pocas moléculas de IgE restantes serían suficientes para sensibilizar las células respectivas. Se proporciona eficacia terapéutica mediante acciones adicionales: la expresión de Fc ϵ RI está regulada por el nivel de IgE libre, de una forma que niveles reducidos de IgE libre conducen a densidades reducidas de Fc ϵ RI sobre basófilos y mastocitos y sensibilidades reducidas. Y, el anti-IgE puede conducir a la regulación por disminución de la producción de IgE por eliminación o regulación por disminución de linfocitos B que expresan IgE, quizás por reticulación de IgE unido a la membrana y causando apoptosis, anergia o lo más probablemente también por citólisis mediada por el complemento y mediada por célula. El último mecanismo no fue, sin embargo,

encontrado en ensayos clínicos realizados con Omalizumab. Para este anticuerpo monoclonal, la reducción de la producción de IgE a partir de linfocitos B (células plasmáticas) mediada por niveles de IgE reducidos solo se observó en experimentos en animales e *in vitro*.

La mayoría de los anticuerpos monoclonales terapéuticos en desarrollo pueden solo unirse a y neutralizar IgE libre o IgE asociado a linfocitos B. A diferencia, IgE unido a FcεRI no está accesible para estos anticuerpos anti-IgE. Los anticuerpos anti-IgE dirigidos contra regiones de la molécula de IgE fuera de la región de unión al receptor (tal como el dominio de unión al antígeno variable de IgE denominado el idiotipo de IgE), pueden unirse a una molécula de IgE mientras que está unida a su receptor. Esto produce la reticulación de IgE unida a receptor, causando un choque anafiláctico en animales tratados sistémicamente con tales anticuerpos. Y, lo que es más importante, excepto por mecanismos de defensa contra infecciones por parásito, parece que IgE no desempeña función en la fisiología normal y personas deficientes en IgE están sanas sin signos evidentes de patología (Levy y Chen, 1970).

Omalizumab (XOLAIR®) es un anticuerpo anti-IgE monoclonal humanizado para inmunización pasiva, y la primera terapia anti-IgE disponible/autorizada en el mercado. Se realizaron un total de 7 ensayos clínicos de fase III con este anticuerpo anti-IgE monoclonal, que se unen a la región Cε3 de IgE (para una revisión refiérase a (Bousquet et al., 2005)) sin reticulación del receptor FcεRI. Omalizumab redujo significativamente la tasa de exacerbaciones de asma el 38 % y la tasa de visitas totales a urgencias el 47 %. La eficacia de Omalizumab no se vio afectada por la edad del paciente, sexo, IgE en suero en el nivel inicial o por el programa de dosificación cada 2 o 4 semanas, aunque el beneficio en términos absolutos pareció ser el mayor en pacientes con asma más grave, definido por un valor más bajo de porcentaje de volumen espiratorio forzado predicho en 1 s (FEV₁) en el nivel inicial.

Como se ha explicado resumidamente antes, una desventaja de la inmunización pasiva con un anticuerpo monoclonal es el requisito de infusiones cada 2-4 semanas con dosis de anticuerpo relativamente altas que hace que tales terapias sean caras. Por tanto, se necesitan enfoques alternativos para el tratamiento de enfermedades alérgicas tales como alergias atópicas o asma.

Según la presente invención, este problema se resuelve por una proteína estructural de un parvovirus que comprende un epi-/mimótopo antiidiotípico de un anticuerpo anti-IgE, y/o un epi-/mimótopo de IgE insertado en el sitio de inserción I-453. Tales proteínas estructurales son preferentemente capaces de formar partículas similares a virus. Alojan epi-/mimótopos antiidiotípicos de un anticuerpo anti-IgE y/o epi-/mimótopos de IgE sobre la superficie de la envoltura de la cápsida. Por tanto, los epi-/mimótopos antiidiotípicos de un anticuerpo anti-IgE, respectivamente los epi-/mimótopos de IgE, están accesibles al sistema inmunitario humoral. Tal proteína estructural puede usarse como vacunas en pacientes con el fin de inducir específicamente una respuesta inmunitaria contra IgE, que significa que los anticuerpos reaccionan de forma cruzada con IgE (anticuerpos anti-IgE), previniendo así la unión de IgE a su receptor de alta afinidad FcεRI.

Realizaciones especialmente preferidas de la invención son proteínas estructurales de parvovirus, especialmente AAV, que contienen epítomos o mimótopos de IgE, preferentemente epítomos o mimótopos previamente conocidos insertados en el sitio de inserción I-453 que pueden usarse como vacunas. En una realización preferida, el epítomo de linfocito B es un epítomo humano. Preferentemente se inserta en I-453 y al menos un sitio de inserción adicional, preferentemente I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente en I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6.

Para muchos de los anticuerpos terapéuticos públicamente disponibles que pueden usarse como anticuerpo diana para la selección de AAV, no se conocen los epítomos. Para ser capaces de comparar los epítomos de los anticuerpos diana y los anticuerpos inducidos en, por ejemplo, ratones después de la vacunación, puede realizarse mapeo de epítomos. Por ejemplo, los epítomos reconocidos por anticuerpos anti-IgE de ratón o anti-humana pueden identificarse de matrices usando barridos de péptidos solapantes de la IgE respectiva depositados sobre membranas de nailon. Anticuerpos preferidos son aquellos con un patrón de unión similar al de Omalizumab, que puede usarse para la selección de mimótopos de la biblioteca de cápsidas de AAV. Epítomos reconocidos por anticuerpos inducidos en, por ejemplo, ratones después de la vacunación pueden identificarse a partir de matrices depositadas sobre portaobjetos de vidrio. La reactividad cruzada de anticuerpos IgE anti-humana o anticuerpos inducidos en ratones después de la vacunación con las regiones de la cadena constante de otras Ig pueden monitorizarse en experimentos de transferencia Western.

Realizaciones especialmente preferidas de la invención son proteínas estructurales de parvovirus, especialmente AAV, que contienen epítomos o mimótopos de IgE, preferentemente epítomos o mimótopos previamente conocidos. Epítomos o mimótopos de IgE preferidos pueden identificarse primero como se describe por Rudolf, Stadler, Vogel y colaboradores (Rudolf et al., 1998, Rudolf et al., 2000, Stadler et al., 1999, Vogel et al., 2000): pueden desarrollarse las llamadas vacunas de inmunización de mimótopos basadas en bibliotecas de presentación en fagos de péptidos cribadas para partículas que reconocen BSW17, un anticuerpo anti-IgE humana monoclonal de ratón. Las secuencias de péptidos mejor reconocidas por BSW17 son los epítomos/mimótopos preferidos EFCINHRGYWVCGD ("Rudolf" (Rudolf et al., 2000), (SEQ ID NO: 55)), estando G, W y V (subrayados) conservados entre todas las secuencias identificadas (los restos de cisteína (en negrita) median en una forma circular del péptido mediante

puentes de disulfuro), C4M' (Rudolf et al., 2000) y Kriccek (Kriccek et al., 1999).

Segundo, en el transcurso de la presente invención, se han identificado epítomos previamente desconocidos que son especialmente adecuados para fines de vacunación contra enfermedades alérgicas como asma que son epítomos de IgE preferidos que son epítomos de IgE preferidos: Bind2, Flex, 3DEpi1, 3DEpi2, 3DEpi3, 3DEpi4, C4E, Wang-CS, Wang y C21.

La presente invención se refiere además a epítomos de linfocitos B de IgE novedosos Bind2, Flex, 3DEpi1, 3DEpi2, 3DEpi3, 3DEpi4, C4E, Wang-CS, Wang y C21 y/o a una variante funcionalmente activa de los mismos. Una variante funcionalmente activa de estos epítomos significa un epítomo de linfocito B que genera en un experimento de vacunación de conejo según el Ejemplo 8.6 una respuesta de linfocitos B en este caso medible como el título de anticuerpos específicos que se unen a IgE humana.

Tales variantes funcionalmente activas pueden tanto ser péptidos individuales como mezclas de péptidos individuales que consisten en secuencias de péptidos de hasta 40 aminoácidos, preferentemente hasta 25 aminoácidos, más preferentemente 15 aminoácidos, especialmente 9 aminoácidos de la secuencia dada, o una fusión de tal variante funcionalmente activa con un vehículo. Se indica que tal vehículo es cualquier molécula, excepto por la proteína IgE que existe de forma natural o parte de la misma (mayor que la variante funcionalmente activa), preferentemente una partícula parvoviral, pero también una partícula de virus o bacteriófago diferente, un polímero (por ejemplo, LPH) o una proteína de fusión, capaz de generar una respuesta de linfocitos B (como se ha definido anteriormente) contra tal variante funcionalmente activa. Tal fusión con un vehículo puede, es decir, obtenerse uniendo químicamente la variante con el vehículo o preparando genéticamente proteínas de fusión o variantes de inserción.

Estas secuencias o partes y similares, por tanto, que incluyen o excluyen los restos de cisteína y pueden introducirse secuencias flanqueantes en las posiciones I-453 y otras de VP de AAV. Las partículas de AAV correspondientes pueden fabricarse (inicialmente como AAV infeccioso que contiene genoma), purificarse y caracterizarse. Aunque las cápsidas de AAV tienen una estructura conformacional diferente de los fagos, la probabilidad de que una estructura similar de la secuencia del mimótopo EFCINHRGYWVCGD (SEQ ID NO: 55) esté presente en ambos, fagos y AAV, es alta debido a los restos de cisteína que forman una estructura de bucle de la secuencia de péptidos. Para epítomos lineales tales como Kriccek (VNLTWSRASG, SEQ ID NO: 50), la intercambiabilidad también debe ser posible. Si estas partículas de AAV se unen a BSW17 (el anticuerpo anti-IgE usado para la presentación en fagos), pueden usarse como vacuna anti-IgE que puede usarse con y sin co-formulación en un adyuvante adecuado (como se describe en el presente documento).

Realizaciones especialmente preferidas de la invención son proteínas estructurales de parvovirus que contienen epi-/mimótopos de IgE que, una vez inyectados en un mamífero inmunocompetente, inducen anticuerpos anti-IgE específicos con eficacia terapéutica sin propiedades de reticulación. Propiedades de reticulación significa que en un mamífero inmunocompetente los anticuerpos anti-IgE generados son moléculas de IgE de unión de forma que la unión IgE/FcεRI todavía es posible. De tal forma, y si un anticuerpo se une a varias moléculas de IgE de una en una, el receptor FcεRI de alta afinidad se reticula sobre células efectoras que conducen a su desgranulación. Esto induciría un choque anafiláctico sistémico. Por otra parte, las proteínas estructurales de parvovirus deberían ser capaces de reticular directamente el receptor de linfocitos B respectivo (uniendo los epi-/mimótopos de IgE o el epi-/mimótopo antiidiotipo de un anticuerpo anti-IgE) para activar los linfocitos B correspondientes y para inducir la producción de anticuerpos anti-IgE independiente de una respuesta de linfocitos T.

Vacunas para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer

En general, las proteínas erróneamente plegadas que conducen a una agregación de proteínas y, por tanto, que causan enfermedades conformacionales, son buenos candidatos a diana para un enfoque de inmunización activa con vacunas de AAV. Idealmente, los epítomos de linfocitos B representados por proteínas erróneamente plegadas o agregados de proteína solo se eligen para presentación sobre partículas de AAV (para una visión general, refiérase, por ejemplo, a Uversky et al., 2006, especialmente la tabla 1-1).

Realizaciones especialmente preferidas de la invención son proteínas estructurales de parvovirus, especialmente AAV, que contienen epítomos o mimótopos de β-amiloide en el sitio de inserción I-453, preferentemente epítomos o mimótopos conocidos, que pueden usarse para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer. En el contexto de la presente invención, se insertó un epítomo de linfocito B de β-amiloide en una cápsida de parvovirus y se presentó sobre la superficie de la cápsida. En una realización preferida, el epítomo de linfocito B es un epítomo humano. Preferentemente se inserta en I-453 y al menos un sitio de inserción adicional, preferentemente I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente en I-453 y I-587, de preferentemente AAV1, AAV2 o AAV6. En una realización especialmente preferida, el epítomo de linfocito B tiene la secuencia DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 65).

Vacunas para el tratamiento de aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad que afecta a los vasos sanguíneos arteriales. Es una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias, debido en gran parte a la acumulación de glóbulos blancos de macrófagos y promovida por las lipoproteínas (proteínas plasmáticas que llevan colesterol y triglicéridos) de baja densidad (especialmente de partícula pequeña) sin eliminación adecuada de grasas y colesterol de los macrófagos por lipoproteínas de alta densidad (HDL) funcionales. Se denomina comúnmente un "endurecimiento" u "obstrucción" de las arterias. Se produce por la formación de múltiples placas dentro de las arterias. Hay una fuerte relación inversa entre la concentración plasmática de colesterol en HDL (HDL-C) y el desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria (CHD). La concentración plasmática de HDL-C es un poderoso factor pronóstico de CHD. Aunque el 33 % de los pacientes con CHD tienen bajos niveles en plasma de HDL-C como su anomalía lipídica primaria, actualmente no hay terapia eficaz para aumentar la concentración plasmática de HDL-C. La dieta y el ejercicio moderado son ineficaces, las estatinas solo proporcionan un modesto aumento del 5 % al 7 % en HDL-C, y la niacina tiene efectos secundarios y perfiles de cumplimiento que limitan su uso.

Un enfoque terapéutico que se ha sugerido para aumentar las concentraciones de HDL-C en plasma es la inhibición de la actividad de la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP). CETP es una glucoproteína plasmática de 74 kDa que facilita la transferencia de lípidos y fosfolípidos neutros entre lipoproteínas y contribuye a la regulación de la concentración plasmática de HDL-C. CETP funciona en el plasma para reducir la concentración de HDL-C moviendo los ésteres de colesterol de HDLs a VLDLs y LDLs (Rittershaus et al., 2000).

Por consiguiente, es otra realización de la invención proporcionar proteínas estructurales de parvovirus, especialmente AAV, que contienen epítomos o mimótopos de CETP en el sitio de inserción I-453 que pueden usarse como vacuna para el tratamiento de aterosclerosis. Preferentemente, el epítomo o mimótopo se inserta en I-453 y al menos un sitio de inserción adicional, preferentemente I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente en I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6. Epítomos o mimótopos adecuados son los péptidos derivados de CETP humana hTP10, hTP11, hTP12, hTP13, hTP18 y hTP20, hRitsch-1, hRitsch-2, hRitsch-3, hCETP-intern y hCETP C-Term.

La presente invención se refiere además a novedosos epítomos de linfocitos B de CETP hTP10, hTP11, hTP12, hTP13, hTP18, hTP20, hRitsch-1, hRitsch-2, hRitsch-3, hCETP-intern y hCETP C-Term y/o a una variante funcionalmente activa de los mismos.

Vacunas para el tratamiento de enfermedades tumorales

Terapias de anticuerpos tales como HERCEPTIN[®], AVASTIN[®], ERBITUX[®], OMNITARG[®], RITUXAN[®], CAMPATH[®], ZEVALIN[®], MYLOTARG[®], BEXXAR[®] o Panitumumab desempeñan una función cada vez mayor en la lucha contra diversos tipos de enfermedades tumorales. Estos anticuerpos se unen específicamente a epítomos de factores causando el crecimiento celular no controlado, tal como receptores del factor de crecimiento o factores de crecimiento. Por consiguiente, es otra realización de la presente invención proporcionar proteínas estructurales de parvovirus, especialmente AAV, que contienen epítomos de tales factores que causan el crecimiento celular no controlado.

HER2/neu (también conocido como ErbB-2, ERBB2) es una proteína que da agresividad más alta en cánceres de mama. Es un miembro de la familia de proteínas ErbB, más comúnmente conocido como la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico. HER2/neu también se ha designado CD340. HER2/neu es notable por su función en la patogénesis del cáncer de mama y como diana de tratamiento. Es una tirosina cinasa de receptor unida a la superficie de la membrana celular y normalmente participa en las vías de transducción de señales que conducen al crecimiento y la diferenciación celular. Aproximadamente el 25-35 por ciento de los cánceres de mama tienen amplificación del gen HER2/neu o expresión en exceso de su producto de proteína. La expresión en exceso también se produce en otro cáncer, tal como cáncer de ovario y cáncer de estómago. Clínicamente, HER2/neu es importante como la diana del anticuerpo monoclonal trastuzumab (comercializado como HERCEPTIN[®]).

En cuanto a un enfoque de vacunación activa, se ha mostrado que la secuencia del epítomo QMWAPQWGPD (SEQ ID NO: 123) presentada en una forma circular induce anticuerpos policlonales con eficacia terapéutica. Por tanto, puede generarse una vacuna de Her2/NEU-AAV por inserción de este péptido en AAV usando secuencias adaptadoras adecuadas (Riemer et al., 2007).

Por consiguiente, realizaciones especialmente preferidas de la invención son proteínas estructurales de parvovirus, especialmente AAV, que contienen epítomos o mimótopos de antígenos de tumor, preferentemente HER2/neu, especialmente el epítomo descrito por Riemer, en I-453, preferentemente epítomos o mimótopos conocidos. En el contexto de la presente invención, un epítomo de linfocito B de HER2/neu puede insertarse en una cápsida de parvovirus y presentarse sobre la superficie de la cápsida. En una realización preferida, el epítomo de linfocito B es un epítomo humano. Preferentemente se inserta en I-453 y al menos un sitio de inserción adicional, preferentemente

I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente en I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6.

Vacunas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias crónicas

5 Las enfermedades autoinmunitarias, además de las enfermedades inflamatorias, surgen de una respuesta inmunitaria hiperactiva del cuerpo contra sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo. En otras palabras, el cuerpo ataca a sus propias células.

10 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria que produce inflamación crónica de las articulaciones, el tejido alrededor de las articulaciones, además de otros órganos en el cuerpo afectando al 0,5-1,0 % de la población en el mundo industrializado. Comúnmente conduce a incapacidad significativa y, por consiguiente, a una reducción significativa de la calidad de vida. Si no se trata apropiadamente, la AR conduce a una reducción de la esperanza de vida (Smolen y Steiner, 2003).

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel caracterizada por el crecimiento excesivo de células epidérmicas, angiogénesis, infiltración de células inmunitarias, y elevada producción de citocinas. Activación similar de células inmunitarias y elevada producción de citocinas está asociada a enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias (crónicas) como se enumera adicionalmente más adelante.

15 Con el fin de limitar o controlar tales respuestas inmunitarias causantes/relacionadas con la enfermedad, se ha convertido en una modalidad terapéutica establecida neutralizar citocinas implicadas en la patogénesis de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Se han establecido anticuerpos (infiximab, adalimumab) y una construcción de receptor soluble que neutralizan la acción de TNF- α (etanercept) en el tratamiento de AR y otra enfermedad. Ahora hay pruebas que implican a varias citocinas novedosas, que incluyen IL-32 y IL-17, en la patogénesis de AR. Además, los presentes inventores evalúan el desarrollo de dianas existentes a medida que se mueven hacia la evaluación clínica, particularmente IL-1, IL-6, IL-15, IL-18 y la superfamilia de IL-12 (Asquith et al., 2007).

25 Por consiguiente, realizaciones preferidas de la invención son proteínas estructurales de parvovirus, especialmente AAV, que contienen epítomos o mimótopos de citocinas, preferentemente de TNF- α , IL-6 y/o IL-17, preferentemente epítomos o mimótopos conocidos, insertados en el sitio de inserción I-453, que pueden usarse como vacunas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y/o enfermedades inflamatorias crónicas, preferentemente artritis reumatoide y/o enfermedad de Crohn. En una realización preferida, el epítomo de linfocito B es un epítomo humano. En una realización preferida, el epítomo de linfocito B es un epítomo o mimótopo humano. Preferentemente se inserta en I-453 y al menos un sitio de inserción adicional, preferentemente I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente en I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6.

Epítomos de linfocitos B preferidos son los epítomos humanos:

TNF- α V1, TNF- α V2, TNF- α V3, IL-17 V1, IL-17 V2, IL-6 V1, IL-6 V2

La presente invención se refiere además a novedosos epítomos de linfocitos B de citocinas TNF- α V1, TNF- α V2, TNF- α V3, IL-17 V1, IL-17 V2, IL-6 V1 y IL-6 V2 y/o una variante funcionalmente activa de los mismos.

35 Vacunas para el tratamiento de enfermedades infecciosas

El bloqueo de la infección viral por la inducción de auto-anticuerpos contra el receptor celular del virus es un mecanismo sugerido de una vacunación preventiva o terapéutica contra virus, preferentemente para virus donde los intentos de vacunación clásicos han fracasado como el VIH usando CCR5 como el receptor diana (Chackerian, 1999).

40 Por consiguiente, realizaciones preferidas de la invención son proteínas estructurales de parvovirus, especialmente AAV, que contienen epítomos o mimótopos de receptores virales, preferentemente de CCR5, preferentemente epítomos o mimótopos conocidos, insertados en el sitio de inserción I-453 que pueden usarse como vacunas para el tratamiento de tal infección viral y enfermedades asociadas, preferentemente infección por el VIH/SIDA. En una realización preferida, el epítomo de linfocito B es un epítomo humano. En una realización preferida, el epítomo de linfocito B es un epítomo o mimótopo humano. Preferentemente se inserta en I-453 y al menos un sitio de inserción adicional, preferentemente I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente en I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6.

Epítomos de linfocitos B preferidos son HYAAAQWDFGNTMCQL (SEQ ID NO: 113), YAAQWDFGNTMCQ (SEQ ID NO: 114), RSQKEGLHYT (SEQ ID NO: 115) o una variante funcionalmente activa de los mismos

50 Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un medicamento de la invención para el tratamiento y/o prevención de

5 a) una enfermedad alérgica y/o asma, en la que en el sitio de inserción I-453, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epi-/mimótopo antiidiotípico de un anticuerpo anti-IgE, y/o un epi-/mimótopo de IgE, particularmente un mimótopo de secuencia de EFCINHRGYWVCGD (SEQ ID NO: 55), estando los primeros G, W y V conservados y restos de cisteína C que median en una forma circular del péptido mediante puentes disulfuro, VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 50) o INHRGYWV (SEQ ID NO: 95) o particularmente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en EKQRNGTLT (SEQ ID NO: 86), EDGQVMDVDLS (SEQ ID NO: 85), TYQCRVTHPHLPRALMR (SEQ ID NO: 87), RHSTTQPRKTKGSG (SEQ ID NO: 88), DSNPRGVSAYLSR (SEQ ID NO: 89), TITCLWDLAPSK (SEQ ID NO: 90), KTKGSGFFVF (SEQ ID NO: 91), THPHLPRALMRS (SEQ ID NO: 92), GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK (SEQ ID NO: 93), LPRALMRS (SEQ ID NO: 94) y una variante funcionalmente activa de los mismos;

15 b) enfermedad de Alzheimer, en la que en el sitio de inserción I-453, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epítipo o mimótopo de β -amiloide, particularmente que comprende o que tiene la secuencia DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 65) o una variante funcionalmente activa de los mismos;

20 c) aterosclerosis, en la que en el sitio de inserción I-453, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epítipo o mimótopo de CETP, particularmente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en PKTVSNLTESSESQVS (SEQ ID NO: 102), SLMGDEFKAVLET (SEQ ID NO: 103), QHSVAYTFEED (SEQ ID NO: 104), INPEIITRDG (SEQ ID NO: 105), DISLTGDPVITASYL (SEQ ID NO: 106), DISLTGDPVITA (SEQ ID NO: 107), DQSIDFEIDSA (SEQ ID NO: 108), KNVSEDLPPTFSPTLLGDS (SEQ ID NO: 109), KNVSEDLPPT (SEQ ID NO: 110), CDSGRVRTDAPD (SEQ ID NO: 111), FPEHLLVDFLQSL (SEQ ID NO: 112) y una variante funcionalmente activa de los mismos;

30 d) una enfermedad tumoral, en la que en el sitio de inserción I-453, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un antígeno de tumor, particularmente un epítipo o mimótopo de HER2/neu, especialmente el epítipo QMWAPQWGPD (SEQ ID NO: 123) o una variante funcionalmente activa de los mismos; o

35 e) una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria crónica, preferentemente artritis reumatoide y/o enfermedad de Crohn, en la que en el sitio de inserción I-453, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epítipo o mimótopo de una citocina, preferentemente de TNF- α , IL-6 y/o IL-17, especialmente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en SSRTPSDKPVAVHVVANPQAE (SEQ ID NO: 116), SRTPSDKPVAVHVVANP (SEQ ID NO: 117), SSRTPSDKP (SEQ ID NO: 118), NADGNVDYHMNSVP (SEQ ID NO: 119), DGNVDYHMNSV (SEQ ID NO: 120), RSFKEFLQSSLRALRQ (SEQ ID NO: 121), FKEFLQSSLRA (SEQ ID NO: 122) o una variante funcionalmente activa de los mismos .

45 f) una enfermedad infecciosa, preferentemente infección por VIH, en la que en el sitio de inserción I-453, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción I-261, I-534, I-570, I-573 o I-587, especialmente I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epítipo o mimótopo de un receptor viral, preferentemente de CCR5, especialmente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en HYAAAQWDFGNTMCQL (SEQ ID NO: 113), YAAQWDFGNTMCQ (SEQ ID NO: 114), RSQKEGLHYT (SEQ ID NO: 115) o una variante funcionalmente activa de los mismos .

Figuras

- Figura 1: Organización esquemática del gen cap de AAV2
- 50 Figura 2: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diversos parvovirus con un sitio de inserción I-453 recuadrado.
Para referencias para los parvovirus alineados véase la Figura 3. Pueden encontrarse parvovirus adicionales en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICNdb/lctvifs_parvo.htm#SubFamily1. Los aminoácidos correspondientes a G₄₅₃ están recuadrados.
- 55 Figura 3: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de parvovirus (AAV1, AAV6, AAV2, AAV3b, AAV7, AAV8, AAV10, AAV4, AAV11, b-AAV, AAV5, GPV, B19, MVM, FPV y CPV)
El alineamiento se hizo usando MultAlin versión 5.4.1, (Corpet, 1988). Tabla de comparación de símbolos: blosum62, peso por hueco: 12, peso por longitud de hueco: 2, niveles consenso: alto = 90 % bajo = 50 %. Símbolos

consenso: ! es uno cualquiera de IV; \$ es uno cualquiera de LM; % es uno cualquiera de FY; # es uno cualquiera de NDQEBZ. Están recuadrados los aminoácidos correspondientes a N₅₈₇ de AAV2 y el intervalo de inserción preferido para I-587.

Nombre	Longitud	Comprobación	Peso	Sec. GP-N.º
AAV1	799	4900	0,26	<u>9632548</u>
AAV6	799	5176	0,26	<u>2766607</u>
AAV2	799	2359	0,50	<u>2906023</u>
AAV3b	799	3639	0,50	<u>2766610</u>
AAV7	799	132	0,50	<u>22652859</u>
AAV8	799	3007	0,37	<u>22652862</u>
AAV10	799	4671	0,37	<u>48728343</u>
AAV4	799	7292	0,74	<u>2337940</u>
AAV11	799	2546	0,74	<u>48728346</u>
b-AAV	799	5299	0,79	<u>48696559</u>
AAV5	799	5950	1,34	<u>91134730</u>
GPV	799	3208	1,92	<u>9628653</u>
B19	799	1920	2,45	<u>4092542</u>
MVM	799	332	2,05	<u>2982110</u>
FPV	799	7156	1,61	<u>494031</u>
CPV	799	7674	1,61	<u>494746</u>
consenso	799	6436	0,00	

- 5 Figura 4: Interacción de un anticuerpo anti-CETP con el epítipo de CETP respectivo insertado en la cápsida de AAV2 en la posición I-453 y I-587
Se depositaron $5,0 \times 10^{10}$ y $1,0 \times 10^{10}$ cápsidas de las variantes AAV-CETP-453-corto y AAV-CETP-453-largo (para más detalles véase el Ejemplo 1.2) sobre una membrana de nitrocelulosa. Además, se depositaron $5,0 \times 10^{10}$ cápsidas de las variantes AAV-CETP-587-corto y AAV-CETP-587-largo sobre la misma membrana. Como control negativo se depositó wtAAV que oscilaba de $5,0 \times 10^{10}$ a $6,3 \times 10^9$ cápsidas por punto. La membrana se incubó con un anticuerpo anti-CETP policlonal dirigido contra el epítipo de CETP insertado en la cápsida de AAV. La unión del anticuerpo anti-CETP a las variantes de AAV depositadas se detectó con un conjugado anti-IgG de conejo-HRP (peroxidasa de rábano picante).
- 10 Figura 5: Detección de un epítipo de β -amiloide presentado por AAV2 en I-587 o I-453/I-587 por anticuerpo específico de β -amiloide
Se depositaron en puntos diluciones sucesivas (2×10^{11} - 2×10^8 cápsidas) de partículas de AAV purificadas que presentaban un epítipo de β -amiloide en I-587, I-453 y I-587, un epítipo de CETP en I-587 (como control negativo) y $1 \mu\text{g}$ a 1 ng del péptido de β -amiloide (aa 1 - 42, BIOSOURCE, como control positivo) sobre una membrana. El epítipo de β -amiloide se detectó usando un mAAb anti- β -amiloide 6×10^{10} (CHEMICON) y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (CALTAG). Las señales se detectaron por quimioluminiscencia.
- 15 Figura 6: Normalización de partículas de AAV2 detectadas por anticuerpo monoclonal A20
Se recubrió placa de ELISA con A20 (75 ng/pocillo, PROGEN). Después del bloqueo (PBS, 1 % de leche en polvo, 1 % de Tween) se administraron $1,00 \times 10^{10}$ partículas por pocillo. Para la detección de una RGD funcional se añadió integrina $\alpha_v\beta_3$ purificada por (100 ng/pocillo, CHEMICON) a la placa y se detectó con anticuerpo anti-integrina α_v (extremo C/intracelular, Dil. 1:1000, CHEMICON). Para la cuantificación de partículas virales en cada pocillo se usó A20 biotinilado (250 ng/pocillo, PROGEN). Se usó la relación "anti-integrina α_v ": "A20-biot" para la normalización de la cantidad de unión de $\alpha_v\beta_3$ a partículas totales.
- 20 Figura 7: Transducción independiente de HSPG
Se transdujeron células de ovario de hámster chino con el fenotipo HSPG KO con 1.000 partículas genómicas por célula del mutante indicado. El porcentaje de células transducidas se midió usando citometría de flujo.
- 25 Figura 8: Competición de la transducción con péptido soluble
Se realizó transducción de células CHO (HSPG KO) con los viriones indicados 24 h después de sembrar las células. Se eliminó el medio. Se administró 1/2 vol. de medio al pocillo que contenía péptido de competición (600 μM) o,
- 30

como en el caso de los controles, solo medio. Después de 15 min de incubación a TA se administró 1/2 medio que contenía virus a las células. MOI = 1.000 partículas genómicas por célula. 48 h después de la transducción se midió la expresión de GFP por citometría de flujo.

Figura 9: Inducción de auto-anticuerpos por vacunas basadas en AAV frente a vacunas basadas en péptido

5 Se inmunizaron conejos (n=2) con las vacunas de CETP basadas en AAV AAV-TP11, AAV-TP12, AAV-TP13 o AAV-TP18 s.c. en presencia de un adyuvante. Se compararon las vacunas de CETP basadas en AAV con las vacunas de péptido correspondientes que contenían el mismo epítipo acoplado a LPH (hemocianina de *Limulus polyphemus*). Se midió el título de auto-anticuerpos de CETP en los antiseros después de la 2ª (gris) y 3ª (negro) inmunización de refuerzo.

10 Figura 10: Inducción de auto-anticuerpos por vacunas basadas en AAV frente a vacunas basadas en péptido

Se inmunizaron conejos (n=2) con las vacunas de CETP basadas en AAV AAV-TP11, AAV-TP12, AAV-TP13 o AAV-TP18 s.c. en presencia de un adyuvante. Se compararon las vacunas de CETP basadas en AAV con las vacunas de péptido correspondientes que contenían el mismo epítipo acoplado a LPH (hemocianina de *Limulus polyphemus*). Se midió el título de auto-anticuerpos dirigidos contra el epítipo (péptido lineal) en los antiseros después de la 2ª (gris) y 3ª (negro) inmunización de refuerzo.

15 Figura 11: Inducción de auto-anticuerpos por vacunas basadas en AAV nativo y desnaturalizado por calor

Se inmunizaron conejos (n=4) con vacunas de CETP basadas en AAV nativo (gris) o desnaturalizado por calor (negro) AAV-TP11 2x o AAV-TP18 2x s.c. en presencia de un adyuvante. Se midió el título de auto-anticuerpos de CETP en los antiseros después de la 1ª inmunización de refuerzo.

20 Figura 12: Evaluación del impacto de anticuerpos anti-AAV2 sobre la inmunización con vacunas basadas en AAV2

(A) Para evaluar el impacto de anticuerpos anti-AAV2 sobre el éxito de la inmunización de vacunas basadas en AAV2, se pre-inmunizaron conejos (n=3) por dos administraciones de 4,5 µg de wtAAV2 (s.c. o i.m.). Se analizó el suero dos semanas después de la 2ª administración para el nivel de anticuerpos anti-AAV2. Un grupo de control (n=2) no se pre-inmunizó con wtAAV2.

25 (B) Tras la pre-inmunización con wtAAV2, los conejos se vacunaron con la vacuna basada en AAV2 AAV-TP18 (7,2 µg por administración). La vacuna se administró s.c. o i.m. en presencia de un adyuvante. Se analizaron los sueros dos semanas después de la 1ª vacunación de refuerzo para el nivel de auto-anticuerpos de CETP. Los resultados se compararon con la vacunación (s.c.) de animales sin pre-inmunización con wtAAV2.

Figura 13: Evaluación de diferentes pautas de sensibilización / refuerzo para vacunas basadas en AAV

30 Se evaluaron tres pautas de sensibilización / refuerzo diferentes. El grupo A recibió una administración de sensibilización y tres de refuerzo de AAV2-CETIn-2x (vacunación basada en AAV2). El grupo B recibió una inmunización de sensibilización y una de refuerzo con AAV2-CETIn-2x, seguido de dos inmunizaciones de refuerzo con el péptido CETP-intern acoplado a LPH (refuerzo con LPH-péptido). El grupo C recibió una inmunización de sensibilización y una de refuerzo con AAV2-CETIn-2x, seguido de dos inmunizaciones de refuerzo con AAV1-CETIn (cambio a vacuna basada en AAV2/AAV1). Se analizaron los antiseros para la reactividad anti-CETP (título de auto-anticuerpos de CETP) dos semanas después de la 2ª (gris) y 3ª inmunización de refuerzo (negro).

Figura 14: Vacunación contra IgE humana

40 Se inmunizaron conejos (n=2) con partículas de AAV2 que llevaban un epítipo de IgE humana ("Kricek") en la posición I-587. En un grupo de control se inmunizaron conejos con el mismo epítipo de IgE acoplado a LPH (LPH-Kricek). Se analizaron los antiseros para la reactividad anti-IgE dos semanas después de la 1ª (blanca), 2ª (gris) y 3ª (negra) inmunización de refuerzo. n. d.: no determinado.

Ejemplos

45 Los siguientes ejemplos ejemplifican la invención para AAV, especialmente para AAV2. Debido a las similitudes generales dentro de las estructuras de virus adeno-asociados y otros parvovirus, la invención puede transferirse fácilmente a otros parvovirus.

1. Generación de variantes de AAV modificadas por inserción de secuencias de epi- o mimótopo en la posición I-453 de la cápsida de AAV por manipulación genética

50 El enfoque descrito más adelante se usa para la inserción de epi- o mimótopos en la cápsida de AAV en la posición I-453 usando una estrategia de clonación definida. Esta estrategia incluye la generación de un sitio de restricción NotI y Ascl dentro del gen cap por mutagénesis dirigida al sitio que permite la inserción de fragmentos de ADN que codifican epi- o mimótopo en la posición I-453 de cap de AAV flanqueados por una secuencia de adaptador de alanina corto o largo.

1.1. Creación de sitios de restricción NotI y Ascl singulares en el vector pCI-VP2

55 Se creó el vector pCI-VP2 por amplificación por PCR del gen VP-2 de AAV2 mutando el codón de iniciación ACG menor en un ATG y clonando el producto de PCR respectivo en la secuencia de policonector de pCI (PROMEGA). El sitio NotI en el nucleótido 18 de pCI-VP2 (nucleótido 1099 de pCI) se destruyó por mutagénesis dirigida al sitio usando los cebadores

mutashe-3 5'-GAG TCG ACC CGG GCA GCC GCT TCG AGC-3'
(SED ID NO: 44)

y

5 mutashe-4 5'-GCT CGA AGC GGC TGC CCG GGT CGA CTC-3'
(SEQ ID NO: 45)

junto con el kit QUIKCHANGE II SITE-DIRECTED MUTAGENESIS (STRATAGENE) según las instrucciones del fabricante. El vector resultante se denominó pCI-VP2-ΔNot18. Para introducir un sitio de restricción NotI y Ascl que permitiera la clonación de secuencias de epítipo o mimótopo en la posición 1-453 de la cápsida de AAV, el vector pCI-VP2-ΔNot18 se modificó por mutagénesis dirigida al sitio usando los cebadores

10 mutashe-5 5'-CA AAC ACT CCA AGT GGA GGG CGC GCC GCT ACC
ACC ACG CAG TC-3' (SEQ ID NO: 46)

y

mutashe-6 5'-GA CTG CGT GGT GGT AGC GGC GCG CCC TCC ACT
TGG AGT GTT TG-3' (SEQ ID NO: 47)

15 para introducir el sitio Ascl primero, además de los cebadores

mutashe-7 5'-CA AAC ACT CCA AGT GGA GCG GCC GCA GGG CGC
GCC GCT AC-3' (SEQ ID NO: 48)

y

20 mutashe-8 5'-GT AGC GGC GCG CCC TGC GGC CGC TCC ACT TGG
AGT GTT TG-3' (SEQ ID NO: 49)

para introducir el sitio NotI, posteriormente.

Se realizó mutagénesis específica de sitio usando el kit QUIKCHANGE II SITE-DIRECTED MUTAGENESIS (STRATAGENE) según las instrucciones del fabricante. El vector resultante se denomina pCIVP2-1453-NotI-Ascl.

1.2. Clonación de secuencias de epítipo o mimótopo en pCIVP2-1453-NotI-Ascl

25 Para clonar secuencias de epi- o mimótopo en pCIVP2-1453-NotI-Ascl, se diseñaron oligonucleótidos directos e inversos que codificaban las secuencias de epi- o mimótopo respectivas con una secuencia de adaptador de alanina corto o largo y contienen una extensión del sitio 5'. La extensión del sitio 5' de los oligonucleótidos se diseñó de manera que la hibridación de los oligonucleótidos directo e inverso produjera un ADNbc con nucleótidos protuberantes del sitio 5' y del sitio 3' compatibles con nucleótidos protuberantes generados por restricción de NotI y Ascl del plásmido pCIVP2-1453-NotI-Ascl. Las secuencias de los oligonucleótidos y las secuencias de epi- o mimótopo respectivas que incluyen los adaptadores de alanina se resumen en la Tabla 8. Cada una de las secuencias de epi- o mimótopo insertadas está flanqueada por un adaptador corto o largo según el siguiente esquema (X_n representa la secuencia de mimótopo o epítipo):

35 adaptador de Ala corto: $(A)_3-X_n-R-(A)_2$ (A corto)
adaptador de Ala largo: $(A)_5-X_n-(A)_2-R-(A)_2$ (A largo)
adaptador de Gly largo: $(A)_2-(G)_5-X_n-(G)_5-R-(A)_2$ (G largo)

Tabla 8: Oligonucleótidos usados para clonar de secuencias de epi- o mimótopo en la posición I-453

Nombre / sec. de péptido	Tipo	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido inverso	Adaptador
Kricek VNL TWSRASG SEQ ID NO: 50	Epítipo	5'-ggccgcagtgaaacctgac ctggagcagagcctccggc-3' SEQ ID NO: 51	5'-cgcgccggaggctctgct ccaggtaggtcactgic-3' SEQ ID NO: 52	A corto
		5'-ggccgcagccgcagtgaa cctgacctggagcagagcctcc ggcggca-3' SEQ ID NO: 53	5'-cgcgccggaggctctgct gctctctccaggtaggtcact gcgctgc-3' SEQ ID NO: 54	A largo
Rudolf EFCINHRGYWVCGD SEQ ID NO: 55	Mimótopo	5'-ggccgcagaaatctgcata aacccaggggatactgggtgt gcggagac-3' SEQ ID NO: 56	5'- cgggctctccgcacaccc agtatcccctggttatgcaga attctgc -3' SEQ ID NO: 57	A corto
		5'-ggccgcagccgcagaatc tgcataaacccaggggatact gggtgtcggagacgcggca- 3' SEQ ID NO: 58	5'-cgcgccggaggctctcgcga caccagatcccctgggtttat gcagaattcggcgcgc-3' SEQ ID NO: 59	A largo
CETP-intern CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 60	Epítipo	5'-ggccgcagccgcagctgg cagftgcgccaatgcacca gac -3' SEQ ID NO: 61	5'-cgcgctcggctgcatggig cgcacactgccagcgtcgca tgc -3' SEQ ID NO: 62	A corto
		5'-ggccgcagccgcagctgca cgtggcagctgctgcaaccaat gcaccagcgcggca -3' SEQ ID NO: 63	5'-cgcgccggaggctctgctg atggcgcacactgcccagc gtcgcagcgcgcgc -3' SEQ ID NO: 64	A largo

Nombre / sec. de péptido	Tipo	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido inverso	Adaptador
β-amiloide DAEFRHDSG SEQ ID NO: 65	Epítipo	5'-ggcggcggaggcggggg ggacgccgaattcagacacga cagcggcggaggcgggtggag gg-3' SEQ ID NO: 66	5'-cggccctccaccgctcc gccgtgctgctgaattcgg cgtcccaccgctccgccc-3' SEQ ID NO: 67	G largo

5 Para hibridar los oligonucleótidos, se mezclaron 50,0 µg del oligonucleótido directo y 50,0 µg del oligonucleótido inverso en un volumen total de 200 µl de 1x tampón de PCR (QIAGEN) y se incubaron durante 3 min a 95 °C en una termomezcladora. Después de 3 min a 95 °C, la termomezcladora se apagó y los tubos se dejaron en la estufa de incubación durante 2 h adicionales para permitir la hibridación de los oligonucleótidos durante el enfriamiento de la estufa de incubación. Para clonar los oligonucleótidos hibridados en pCIVP2-I453-NotI-Ascl, el vector se linealizó por restricción con NotI y Ascl y la reacción de clonación se realizó usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche). Brevemente, los oligonucleótidos hibridados se diluyeron 10 veces en 1x tampón de dilución de ADN y se incubaron durante 5 min a 50 °C. Se usaron 100 ng de estos oligonucleótidos hibridados y 50 ng del vector linealizado pCIVP2-I453-NotI-Ascl en la reacción de ligación, que se realizó según las instrucciones del fabricante del kit Rapid DNA Ligation (Roche). Se transformaron XL1 blue de *E. coli* con una alícuota de la reacción de ligación y se dispusieron sobre placas de agar LB-Amp. Se prepararon plásmidos según procedimientos convencionales y se analizaron por secuenciación.

1.3. Subclonación de secuencias de epítipo o mimótopo de pCIVP2 en pUCAV2

15 Para la producción de partículas de AAV recombinantes que llevan una inserción de mimo- o epítipo en la posición I-453, se subclonó el fragmento BsiWI/XmaI de pCI-VP2-453-NotI-Ascl que codifica un fragmento de VP-2 que contiene el epítipo o mimótopo en la posición I-453 en pUCAV2, que se modificó como se describe más adelante.

La clonación del vector pUCAV2 se describe en detalle en el documento US 6.846.665. Básicamente, este vector contiene el genoma de AAV completo (fragmento Bgl II) derivado de pAV2 (Laughlin et al., 1983) clonado en BamHI de pUC19.

20 Se usa pUCAV2 para la producción de las partículas de AAV modificadas. Como hay tres sitios XmaI en pUCAV2 no es posible usar el sitio XmaI de pUCAV2 para subclonar el fragmento BsiWI/XmaI de pCI-VP2-453-NotI-Ascl. Por tanto, se introdujo un nuevo sitio AgeI en pUCAV2 que es compatible con XmaI y no está presente en pUCAV2. Para introducir el sitio AgeI, se linealizó pUCAV2 por SnaBI, se desfosforiló y posteriormente se ligaron los extremos romos con un adaptador de oligonucleótidos ds corto que contenía un sitio AgeI interno. El adaptador de oligonucleótidos ds se generó hibridando un oligonucleótido

sentido 5'-GTA GCC CTG GAA ACT AGA ACC GGT GCC TGC GCC-3'
(SEQ ID NO: 68)

y

30 antisentido 5'-GGG GCA GGC ACC GGT TCT AGT TTC CAG GGC TAC-3'
(SEQ ID NO: 69)

que contenía un sitio de restricción AgeI como se ha descrito anteriormente. Los oligonucleótidos hibridados se ligaron con el pUCAV2 desfosforilado linealizado con SnaBI usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche) como se ha descrito anteriormente. El vector resultante se denomina pUCAV2-AgeI. Se linealizó pUCAV2-AgeI con BsiWI y AgeI y se ligó con el fragmento BsiWI/XmaI de pCI-VP2-453-NotI-Ascl que codifica el fragmento de VP-2 que contiene el epítipo o mimótopo respectivo en la posición I-453.

2. Generación de variantes de AAV modificadas por inserción de secuencias de epítipo en la posición I-587 de la cápsida de AAV por manipulación genética

40 Se usa el enfoque descrito a continuación para la inserción de epi- o mimótopos en la cápsida de AAV en la posición I-587 usando una estrategia de clonación definida. Esta estrategia incluye la generación de un sitio de restricción NotI y Ascl dentro del gen cap por mutagénesis dirigida al sitio que permite la inserción de fragmentos de ADN que codifica epi- o mimótopo en la posición I-587 de cap de AAV flanqueado por una secuencia de adaptador de alanina corto o largo.

2.1. Creación de sitios de restricción NotI y Ascl singulares en el vector pCI-VP2 en el sitio de inserción I-587

45 Se creó el vector pCI-VP2 por amplificación por PCR del gen VP-2 de AAV2 mutando el codón de iniciación ACG menor en un ATG y clonando el producto de PCR respectivo en la secuencia de policonector de pCI (PROMEGA). El sitio NotI en el nucleótido 18 de pCI-VP2 (nucleótido 1099 de pCI) se destruyó por mutagénesis dirigida al sitio como se ha descrito anteriormente. El vector resultante se denominó pCI-VP2-ΔNot18. Para introducir un sitio de restricción NotI y Ascl que permitiera la clonación de secuencias de epítipo o mimótopo en la posición I-587 de la cápsida de AAV, el vector pCI-VP2-ΔNot18 se modificó por mutagénesis dirigida al sitio usando los cebadores

50 pCI-VP2-ΔNotI-587-durante 5' -CC AAC CTC CAG AGA GGC AAC GCG GCC
GCA AGG CGC GCC AAG CAG CTA CCG CAG-3'
(SEQ ID NO: 70)

y

pCI-VP2-ΔNot-I587-reV 5'-CTG CGG TAG CTG CTT GGC GCG CC TT GCG
GCC GCG TTG CCT CTC TGG AGG TTG G-3'.
(SEQ ID NO: 71)

5 Se realizó mutagénesis específica de sitio usando el kit QUIKCHANGE II SITE-DIRECTED MUTAGENESIS (STRATAGENE) según las instrucciones del fabricante. El vector resultante se denomina pCIVP2-I587-NotI-Ascl.

2.2. Clonación de secuencias de epítipo en pCIVP2-I587-NotI-Ascl

10 Para clonar una secuencia de epítipo de CETP en pCIVP2-I587-NotI-Ascl se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido que codificaban el epítipo de CETP con una secuencia de adaptador de alanina corto o largo y contenían extensiones del sitio 5'. La extensión del sitio 5' de los oligonucleótidos se diseñó de manera que la hibridación de los oligonucleótidos sentido y antisentido produjera un ADNbc con nucleótidos protuberantes del sitio 5' y sitio 3' compatibles con nucleótidos protuberantes generados por restricción de NotI y Ascl del plásmido pCIVP2-I587-NotI-Ascl. Las secuencias de los oligonucleótidos y la secuencia del epítipo de CETP codificada que incluye los adaptadores de alanina se resumen en la Tabla 9. La secuencia del epítipo de CETP insertada está flanqueada por un adaptador de alanina corto o largo según el siguiente esquema (X_n representa la secuencia del epítipo de CETP):

adaptador de Ala corto: $(A)_3-X_n-(A)_2$ (A corto)
adaptador de Ala largo: $(A)_5-X_n-(A)_5$ (A largo)
adaptador de Gly largo: $(A)_3-(G)_5-X_n-(G)_5-(A)_2$ (G largo)

Tabla 9: Oligonucleótidos usados para clonar secuencias de epítipo en la posición I-587

Nombre / sec. de péptido	Tipo	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Adaptador
CETP-intern CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 60	Epítipo	5' GGCCGCATGCGACG CTGGCAGTGTGCGCACC AATGCACCAGACGCGG 3' SEQ ID NO: 72	5' CGCGCCGCGTCTGGT GCATTGGTGCACACTG CCAGCGTCGCATGC 3' SEQ ID NO: 73	A corto
		5' GGCCGCAGCGGCGT GCGACGCTGGCAGTGTG CGCACCAATGCACCAGA CGCGCGGCGGCGG 3' SEQ ID NO: 74	5' CGCGCCGCCGCCGCC GCGTCTGGTGCATTGGTG CGCACACTGCCAGCGTCG CACGCCGCTGC 3' SEQ ID NO: 75	A largo
β-amiloide DAEFRHDSG SEQ ID NO: 65	Epítipo	5' GGCCGCAGGCGGAG GGGAGGGCGACGCCGAG TTCAGACACGACAG CGCGCGGCGGAGGGGAG GCGCGG 3' SEQ ID NO: 76	5' CGCGCCGCGCCTCCC CCTCCGCCGCCGCTGTCG TGTCTGAACTCGGCGTCG CCTCCCCCTCCGCTGC 3' SEQ ID NO: 77	G largo

20 Se hibridaron los oligonucleótidos sentido y antisentido como se ha descrito anteriormente (1.2). Para clonar los oligonucleótidos hibridados en pCIVP2-I587-NotI-Ascl, el vector se linealizó por restricción con NotI y Ascl y la reacción de clonación se realizó usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche). Brevemente, los oligonucleótidos hibridados se diluyeron 10 veces en 1x tampón de dilución de ADN y se incubaron durante 5 min a 50 °C. Se usaron 100 ng de estos oligonucleótidos hibridados y 50 ng del vector linealizado pCIVP2-I587-NotI-Ascl en la reacción de ligación, que se realizó según las instrucciones del fabricante del kit Rapid DNA Ligation (Roche). Se transformaron XL1 blue de *E. coli* con una alícuota de la reacción de ligación y se sembraron en placas de agar LB-Amp. Se prepararon plásmidos según procedimientos convencionales y se analizaron por secuenciación.

2.3. Subclonación de epítomos de pCIVP2 en pUCAV2 en la posición I-587

Para la producción de partículas de AAV recombinantes que llevan la inserción del epítomo de CETP en la posición I-587, el fragmento BsiWI/XmaI de pCI-VP2-587-NotI-Ascl que codifica un fragmento de VP-2 que contiene el epítomo o mimótopo en la posición I-587 se subclonó en pUCAV2, que se modificó como se ha descrito anteriormente (1.3).

- 5 El pUCAV2 modificado se denomina pUCAV2-Agel. Se linealizó pUCAV2-Agel con BsiWI y Agel y se unió con el fragmento BsiWI/XmaI de pCI-VP2-587-NotI-Ascl que codifica el fragmento de VP-2 que contiene el epítomo de CETP en la posición I-587.

3. Producción y purificación de variantes de AAV

3.1. Plásmido colaborador AdV

- 10 Se usó un plásmido colaborador AdV que codifica E2, E4 y VAI-VAII de AdV para la fabricación de AAV en células HEK 293-T. Se construyó el plásmido colaborador pUCAdvE2/E4-VAI-VAII subclonando el fragmento de restricción BamHI que codifica el adenovirus E2 y E4-ORF6 de pAdEasy-1 en el sitio BamHI de pUC19. El plásmido resultante se denomina pUCAdvE2/E4. El fragmento VAI-VAII de pAdvantage se amplificó por PCR usando los cebadores

XbaI-VAI-780-3': 5'-TCT AGA GGG CAC TCT TCC GTG GTC TGG TGG-
3' SEQ ID NO: 78

- 15 y

XbaI-VAII-1200-5' 5'-TCT AGA GCA AAA AAG GGG CTC GTC CCT GTT
TCC-3' SEQ ID NO: 79,

se clonó en pTOPO y entonces se subclonó en el sitio XbaI de pUCAdvE2/E4. El plásmido resultante pUCAdvE2/E4-VAI-VAII se evaluó en experimentos de co-transfección para la producción de AAV como se describe más adelante. Se analizó la formación de partículas de AAV usando ELISA de A20.

- 20 3.2. Producción de variantes de AAV por co-transfección de células HEK 293-T

Para la producción de partículas de AAV se co-transfectaron células HEK 293-T con el plásmido de vector pUCAV2 que contenía el epítomo subclonado (en I-453 y/o I-587) y el plásmido colaborador pUCAdv (descrito anteriormente).

- 25 Para la co-transfección, se sembraron $7,5 \times 10^6$ células 293-T en cada placa de cultivo celular de 015 cm en un volumen total de 17,5 ml de medio (DMEM que contiene 10 % de FCS, L-Gln 5 mM y ABAM) 24 h antes de la transfección y se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Para la co-transfección del plásmido de vector pUCAV2 que contiene el epítomo (en I-453 o I-587) y pUCAdv se eligió una relación molar de los plásmidos de 1:1. Para la transfección con fosfato de calcio de una placa de cultivo con células 293-T usando el protocolo de transfección con fosfato de calcio como se ha desvelado en el documento US 2004/0053410, se mezclaron 12,0 µg de pUCAV2 (que contiene el epítomo en I-453 o I-587) y 24,0 µg de pUCAdv en 875 µl de CaCl₂
- 30 270 mM. En resumen, se añadieron 875 µl de 2x BBS (BES 50 mM (pH 6,95), NaCl 280 mM y Na₂HPO₄ 1,5 mM) a la mezcla y la solución resultante se mezcló cuidadosamente por pipeteado. La solución se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y a continuación se añadió gota a gota a la placa de cultivo celular. Las células se incubaron a 35 °C, 3 % de CO₂ en una atmósfera humidificada durante 18 h. Después de 18 h a 35 °C y 3 % de CO₂, las células se cultivaron durante 3 d adicionales a 37 °C, 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada.

- 35 Se recogieron las células 293-T con un filtro de células, se transfirieron a tubos de plástico de 50 ml (Falcon) y se centrifugaron a 3000 g a 4 °C durante 10 min. El sedimento de células se resuspendió en 1,0 ml de tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 8,5) y se sometió a tres rondas de ciclos de congelación y descongelación. El lisado se trató con 100 U/ml de benzonasa (MERCK) a 37 °C durante 30 min. El lisado celular se aclaró por dos etapas de centrifugación (3700 g, 4 °C, 20 min) y el sobrenadante que contenía AAV se usó para más purificación.

- 40 Se determinó el título de cápsidas de AAV del lisado usando un ELISA comercialmente disponible (ELISA de valoración de AAV, PROGEN).

3.3. Purificación de partículas de AAV por centrifugación en gradiente de densidad usando iodixanol

Se purificaron partículas de AAV por centrifugación en gradiente de iodixanol. El lisado celular que contenía el virus se aclaró por centrifugación (3700 g, 4 °C, 20 min) y el lisado aclarado se transfirió a tubos de ultracentrifugación QUICKSEAL (26 x 77 mm, BECKMAN). Se dispusieron en capas soluciones de iodixanol (SIGMA) de diferentes concentraciones debajo del lisado que contenía el virus. Mediante esto se creó un gradiente de iodixanol compuesto de 6,0 ml de 60 % en el fondo, 5,0 ml 40 %, 6,0 ml 25 % y 9,0 ml 15 % de iodixanol con la solución de virus encima. El gradiente se centrifugó en una ultracentrífuga a 416.000 g durante 1 h a 18 °C. El 40 % de la fase que contenía las partículas de AAV se extrajo entonces con una cánula perforando el tubo debajo de la fase del 40 % y dejando que la solución goteara en un tubo de recogida hasta que se llegó a la fase del 25 %. Se determinó el título de cápsidas de AAV de la fase del 40 % usando un ELISA comercialmente disponible (ELISA de valoración de AAV, PROGEN).

4. Variantes de AAV que llevan un epítipo de CETP en la posición I-453 o I-587 de la cápsida de AAV2

Se introdujo un epítipo (CDAGSVRTNAPD; SEQ ID NO: 60) de CETP de conejo (proteína de transferencia de éster de colesterol) en la posición I-453 o I-587 de AAV2 por los enfoques de clonación descritos anteriormente. En ambos sitios de inserción, el epítipo está flanqueado por un adaptador de alanina corto o largo. Para la producción de variantes de AAV se co-transfectaron células HEK 293-T con el plásmido de vector pUCAV2 que contenía la secuencia del epítipo de CETP subclonada en la posición I-453 o I-587, y el plásmido colaborador pUCAdV como se ha descrito anteriormente. Se purificaron variantes de AAV por centrifugación en gradiente de iodixanol como se ha descrito anteriormente.

Se analizaron variantes de la cápsida de AAV AAV-CETP-453-corto, AAV-CETP-453-largo, AAV-CETP-587-corto y AAV-CETP-587-largo por experimentos de transferencia puntual (Figura 4). Se depositaron 5×10^{10} o 1×10^{10} partículas de AAV purificadas AAV-CETP-453-corto y AAV-CETP-453-largo sobre una membrana de nitrocelulosa usando un dispositivo de vacío. Asimismo, se depositaron 5×10^{10} partículas de AAV purificadas AAV-CETP-587-corto y AAV-CETP-587-largo sobre la misma membrana. Como control negativo, se depositó wtAAV que osciló de $5,0 \times 10^{10}$ a $6,3 \times 10^9$ cápsidas por punto. Después de bloquear la membrana con tampón de bloqueo (5 % de leche polvo en PBS que contiene 0,05 % de Tween-20), la membrana se incubó con un suero anti-CETP policlonal generado inmunizando conejos con el epítipo de CETP acoplado a KLH. Después de lavar la membrana con PBS/0,05 % de Tween-20, la unión de los anticuerpos anti-CETP a las variantes de AAV depositadas se detectó con un conjugado anti-IgG de conejo-HRP (CALTAG). Después de lavar, las señales se detectaron por quimioluminiscencia usando el sistema de ECL (AMERSHAM BIOSCIENCE).

El resultado demuestra que hay una detección específica del epítipo de CETP insertado en la cápsida de AAV en la posición I-453 o I-587 por el anticuerpo dirigido contra CETP respectivo, demostrando que el epítipo se presenta sobre la superficie de la partícula de AAV.

5. Inserción doble de un epítipo de β -amiloide en la posición I-453 y I-587 de la cápsida de AAV

Se usó el enfoque de clonación descrito más adelante para la inserción doble de una secuencia de epi- o mimótopo en la cápsida de AAV en la posición I-453 y I-587 usando una estrategia de clonación definida.

5.1. Inserción de un sitio de restricción FseI en pCIVP2

Se insertó un sitio de restricción FseI en los vectores pCIVP2-I587-NotI-Ascl y pCIVP2-I453-NotI-Ascl localizados entre I-453 y I-587 por mutagénesis dirigida al sitio usando el kit QUIKCHANGE II SITE-DIRECTED MUTAGENESIS (STRATAGENE) y los oligonucleótidos

mutashe-9 5'-GGT GAA TCC GGG GCC GGC CAT GGC AAG C-3'
(SEQ ID NO: 80)
y
mutashe-10 5'-GCT TGC CAT GGC CGG CCC CGG ATT CAC C-3'
(SEQ ID NO: 81).

5.2. Clonación de un epítipo de β -amiloide en la posición I-587 de pUCAV2

Se clonó el epítipo de β -amiloide DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 65) (aa 1 - 9 de β -amiloide humano) en el sitio de restricción NotI/Ascl del vector pCIVP2-I587-NotI-Ascl (modificado como se describe en 5.1) usando los oligonucleótidos sentido y antisentido

β -amiloide-for 5' -GGC CGC AGG CGG AGG GGG AGG CGA CGC CGA GTT
CAG ACA CGA CAG CGG CGG CGG AGG GGG AGG CGC GG-3'

(SEQ ID NO: 76)

y

β-amiloide-rev 5' -CGC GCC GCG CCT CCC CCT CCG CCG CCG CTG TCG
TGT CTG AAC TCG GCG TCG CCT CCC CCT CCG CCT GC-3'

5 (SEQ ID NO: 77)

Los oligonucleótidos codifican el epítipo de β-amiloide con una secuencia de adaptador de glicina:

(A)₃-(G)₅-DAEFRHDSG-(G)₅-(A)₂ (SEQ ID NO: 82)

La clonación se realizó como se ha descrito anteriormente (2.2).

10 Se subclonó el fragmento BsiWI/XmaI de pCI-VP2-587-NotI-Ascl que codifica un fragmento de VP-2 que contiene el epítipo de β-amiloide en la posición I-587 en pUCAV2-Agel como se ha descrito anteriormente (2.3). El vector resultante se denominó pUCAV2-amiloide-587

5.3. Clonación de un epítipo de β-amiloide en la posición I-453 de pCIVP2

15 El epítipo de β-amiloide (DAEFRHDSG, SEQ ID NO: 65) se clonó en el sitio de restricción NotI/Ascl en el sitio de inserción I-453 del vector pCIVP2-I453-NotI-Ascl (modificado como se describe en 5.1) usando los oligonucleótidos sentido y antisentido

Amiloide 453for 5' -G GCC GGC GGA GGC GGT GGG GAC GCC GAA TTC

AGA CAC GAC AGC GGC GGA GGC GGT GGA GGG-3'

(SEQ ID NO: 66)

20 Amiloide 453rev 5' -C GCG CCC TCC ACC GCC TCC GCC GCT GTC GTG

TCT GAA TTC GGC GTC CCC ACC GCC TCC GCC-3'

(SEQ ID NO: 67)

Los oligonucleótidos codifican el epítipo de β-amiloide con una secuencia de adaptador de glicina:

(A)₂-(G)₅-DAEFRHDSG-(G)₅-R-(A)₂

(SEQ ID NO: 83)

25 La clonación se realizó como se ha descrito anteriormente (1.2).

5.4. Clonación de un epítipo de β-amiloide en la posición I-453 y I-587 de pUCAV2

30 Para la producción de partículas de AAV recombinantes que llevan el epítipo de β-amiloide en la posición I-587 y I-453, el vector pUCAV2-amiloide-587 se cortó con BsiW/FseI y se unió con el fragmento BsiW/FseI de 0,6 kb de pCI-VP2-453-NotI-Ascl. El fragmento BsiW/FseI de pCI-VP2-453-NotI-Ascl codifica el fragmento de VP-2 que contiene el epítipo de β-amiloide en la posición I-453. El vector resultante se denominó pUCAV2-amiloide-453-587.

5.5. Producción, purificación y evaluación de partículas de AAV que llevan un epítipo de β-amiloide en I-453 y I-587

35 Para la producción de partículas de AAV recombinantes que llevan el epítipo de β-amiloide en la posición I-587 y I-453, se transfectaron células 293 con el vector pUCAV2-amiloide-453-587 y el plásmido colaborador pUCAdV como se ha descrito anteriormente (3.2 y 3.3). Las partículas de AAV correspondientes se denominaron AAV-amiloide-453-587.

Para la producción de partículas de AAV recombinantes que llevan el epítipo de β-amiloide en la posición I-587, se transfectaron células 293 con el vector pUCAV2-amiloide-587 y el plásmido colaborador pUCAdV como se ha descrito anteriormente. Las partículas de AAV correspondientes se denominaron AAV-amiloide-587. Todas las partículas de AAV se purificaron como se ha descrito anteriormente

40 Para evaluar la expresión del epítipo de β-amiloide en la superficie de la cápsida de AAV, se depositaron en puntos diluciones sucesivas de partículas de AAV purificadas AAV-amiloide-453-587 y AAV-amiloide-587 sobre una membrana (Figura 5). Como control negativo se depositaron en puntos partículas de AAV que llevaban un epítipo de CETP en la posición I-587. Como control positivo se depositó en puntos péptido β-amiloide (aa 1 - 42) (BIOSOURCE). Después de bloquear la membrana con tampón de bloqueo (5 % de leche en polvo en PBS que
45 contiene 0,05 % de Tween-20), el epítipo de β-amiloide se detectó usando un mAb anti-β-amiloide 6E10 (CHEMICON) (Figura 5). Se usó el mAb anti-β-amiloide a una concentración de 1,0 μg/ml en PBS / 1 % de leche en polvo / 0,05 % de Tween-20. La unión del mAb anti-β-amiloide se detectó usando un anticuerpo anti-IgG de ratón

marcada con peroxidasa (CALTAG). Después de lavar, las señales se detectaron por quimioluminiscencia usando SUPERSIGNAL WEST PICO CHEMOLUMINESCENT SUBSTRATE (PIERCE).

5 Estos datos demuestran que la inserción doble del epítipo en los sitios de inserción I-453 y I-587 que produce densidad de epítipos más alta en la superficie de la cápsida que la inserción del epítipo singular en la posición I-587 conduce a una afinidad al menos 2 veces más alta del mutante de inserción doble al anticuerpo de β -amiloides en comparación con el mutante de inserción de I-587- solo.

6. Generación de variantes de AAV2 modificadas por inserción de una secuencia de direccionamiento de integrina $\alpha_v\beta_3$ en la posición I-453 de la cápsida de AAV por manipulación genética

6.1. Determinación de títulos

10 Con el fin de generar varios mutantes de inserción que se dirigen a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, se insertó el péptido de direccionamiento RGD-4C con su secuencia

ACDCRGDCFCA (SEQ ID NO: 84)

15 entre G₄₅₃ y T₄₅₄ de las proteínas estructurales de AAV2 VP-1, VP-2 y VP-3 de AAV2 (mutante llamado RGD4C 453). Esta inserción de direccionamiento se combinó adicionalmente con las dos mutaciones puntuales R_{585A} y R_{588A} con el fin de disminuir la unión al receptor natural de AAV2, HSPG (llamado RGD4C 453 A2). El péptido de direccionamiento idéntico se insertó en el sitio de inserción previamente descrito I-587 (llamado RGD4C 587) y el mutante R_{585A} / R_{588A} correspondiente (llamado RGD4C 587 A2). Además, el péptido de direccionamiento idéntico se insertó en ambos sitios de inserción I-453 y I-587 (llamado RGD4C 453 y 587) y el mutante R_{585A} / R_{588A} correspondiente (llamado RGD4C 453 y 587 A2).

20 Todos los mutantes se generaron por mutagénesis dirigida al sitio usada para encapsidar scGFP y se valoraron del siguiente modo: se sembraron células 293 al 80 % de confluencia y se co-transfectaron por fosfato de calcio con un total de 37,5 μ g de plásmido de vector pAAV/EGFP, plásmido colaborador de encapsidación (que codifica Rep y Cap) y plásmido adenoviral pXX6 (Xiao et al., 1998) a una relación 1:1:1. 48 h después de la transfección, las células se recogieron y se sedimentaron por centrifugación a baja velocidad. Las células se resuspendieron en NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), se congelaron-descongelaron varias veces y se trataron con benzonasa durante 25 30 min a 37 °C. El residuo celular se centrifugó a 3.700 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se cargó sobre un gradiente de iodixanol discontinuo. Se recogió la fase del 40 % que contenía el vector y se valoró.

Se determinaron títulos genómicos de soluciones madre de vector por PCR cuantitativa (Theiss et al., 2003). Para esto, se aisló ADN viral de soluciones madre de vector según el protocolo del kit DNeasy (QIAGEN).

30 Se determinaron títulos de cápsidas de las soluciones madre de vector por ELISA de A20 como se ha descrito previamente (Girod et al., 1999).

35 Se determinaron títulos de transducción de células HeLa de transducción con la scGFP que expresa mutante o no mutante de AAV respectivo. Entonces se contaron las células transducidas por análisis de FACS estándar. En resumen, se sembraron 7×10^4 células HeLa en cada pocillo de una placa de 12 pocillos y se incubaron durante 24 h. Se añadieron diluciones sucesivas del virus respectivo a las células y se incubaron durante 48 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se tripsinaron, se transfirieron a tubos de FACS y se analizaron por condiciones estándar por citometría de flujo (FACS Becton-Dickinson) con el fin de calcular la cantidad de partículas de transducción por ml.

40 La cantidad de cápsida por partículas genómicas en cada preparación viral mostró, comparando con no mutante, que todos los mutantes se parecieron a cápsidas y encapsidaron eficientemente genomas virales (Tabla 10, columnas Cap/ml y GenP/ml). La determinación de partículas de transducción (tP) depende de todas las etapas de transducción viral que incluyen unión, captación, escape lisosomal y activación de la expresión génica. Todos los mutantes probados, excepto los mutantes de dos inserciones AAV2 RGD4C 453 & 587 y AAV2 RGD4C 453 y 587 A2, tuvieron títulos de transducción considerablemente altos de al menos 10^7 partículas de transducción por ml. Los títulos de transducción de ambos mutantes de inserción doble estuvieron por debajo del límite de detección, aunque 45 pudo determinarse una unión de células satisfactoria.

45 La relación de cápsidas por partículas genómicas proporciona información sobre las eficiencias de encapsidación y así permite determinar si una modificación de cápsida interfiere con la encapsidación de genomas de vector en las cápsidas de AAV previamente formadas. Todos los mutantes probados fueron capaces de encapsidar eficazmente genomas virales (Cap/GenP). Por consiguiente, el péptido RGD4C puede insertarse satisfactoriamente en I-453. Los mutantes probados muestran formación de cápsida y encapsidación eficiente de genomas virales.

La relación de partículas genómicas por partículas de transducción (GenP/tP) es un indicador de la capacidad de un

mutante que contiene un genoma viral para transducir satisfactoriamente una célula y expresar su gen indicador. Por consiguiente, cuanto más alta sea la relación, más baja será la actividad de transducción del mutante para la línea celular específica.

5 La inserción del péptido RGD-4C en tanto I-453 como I-587 condujo, en comparación con no mutante, a una mayor relación GenP/tP. Por tanto, el péptido de direccionamiento insertado interfirió de alguna forma con la actividad de transducción de las células HeLa. Los dos mutantes de inserción doble AAV2 RGD4C 453 y 587 y AAV2 RGD4C 453 y 587 A2 fueron completamente incapaces de transducir células HeLa. Esto es sorprendente, ya que se sabe que $\alpha_v\beta_5$, otra molécula diana informada de RGD-4C, está presente en células HeLa y se sabe además que es un receptor secundario de AAV2 (Summerford et al., 1999).

10 Como era de esperar, las dos mutaciones puntuales R₅₈₅A y R₅₈₈A (mutante A2 de AAV) condujeron a una reducción de 3 logaritmos de la actividad de transducción de las cápsidas mutantes sobre células HeLa. La inserción de un péptido de direccionamiento en I-453 o I-587 restauró de algún modo la capacidad de los mutantes A2 de transducir células HeLa, que puede explicarse por el hecho de que $\alpha_v\beta_5$ se expresa sobre células HeLa y que, por tanto, $\alpha_v\beta_5$ puede compensar la unión de HSPG reducida.

15 **Tabla 10: Títulos de direccionamiento de integrinas $\alpha_v\beta_3$**

Virus	Cap/ml	GenP/ml	tP/ml	Cap/GenP	GenP/tP
wtAAV2	1,09E+13	7,07E+11	6,84E+10	15	10
wtAAV2 \bar{F}	9,50E+12	1,25E+12	4,34E+10	8	29
AAV2 A2	1,00E+13	1,11E+12	2,75E+07	9	40364
AAV2 RGD4C 453	1,12E+12	4,97E+11	1,63E+08	2	3049
AAV2 RGD4C 453 A2	1,54E+12	6,12E+11	2,55E+08	3	2400
AAV2 RGD4C 587	1,17E+12	4,73E+11	1,22E+08	3	3877
AAV2 RGD4C 587 A2	2,83E+12	2,42E+11	6,45E+08	12	375
AAV2 RGD4C 453 y 587	1,34E+12	1,55E+11	-	9	-
AAV2 RGD4C 453 y 587 A2	5,02E+11	2,25E+11	-	2	-

(Cap = cápsidas; GenP = partículas genómicas; tP = partículas de transducción)

6.2. Unión de cápsidas a integrina $\alpha_v\beta_3$

Se analizó la unión de los mutantes de inserción RGD-4C de AAV2 a su molécula receptora integrina $\alpha_v\beta_3$ como se ha descrito previamente (Shi y Bartlett, 2003) y se normalizó a la cantidad de partículas de AAV2 detectadas por A20. En resumen, se recubrió una placa de ELISA con A20 (75 ng/pocillo, PROGEN). Después del bloqueo (PBS, 1 % de leche en polvo, 1 % de Tween) se administraron $1,00 \times 10^{10}$ partículas por pocillo. Para la detección de una RGD funcional se añadió integrina $\alpha_v\beta_3$ purificada (100 ng/pocillo, CHEMICON) a la placa y se detectó con anticuerpo anti-integrina α_v (extremo C/intracelular, Dil. 1:1.000, CHEMICON). Para la cuantificación de partículas virales en cada pocillo se usó A20 biotinilado (250 ng/pocillo). La relación "anti-integrina α_v " : "A20-biot" se usó para la normalización de la cantidad de $\alpha_v\beta_3$ que se une a partículas totales.

Tanto el no mutante como el mutante de A2 no mostraron unión de $\alpha_v\beta_3$ (Figura 6). Los mutantes con un único péptido de direccionamiento insertado tanto en I-453 como en I-587 (RGD4C 453 y RGD4C 587) mostraron unión claramente detectable de $\alpha_v\beta_3$. Una vez las dos argininas R₅₈₅ y R₅₈₈ se sustituyeron por alanina, estos mutantes de A2 mostraron unión mucho mejor de $\alpha_v\beta_3$ en el ELISA, mientras que RGD4C 453 fue incluso superior a RGD4C 587. La mutación de inserción doble RGD4C 453 y 587 también mostró actividad de unión muy buena para $\alpha_v\beta_3$. El mutante de sustitución doble de inserción doble RGD4C 453 y 587 A2 no mostró un aumento adicional en comparación con RGD4C A2. Sin embargo, si se compara con el mutante RGD4C 587 A2, la inserción adicional en I-453 aumentó claramente su actividad de unión.

Por consiguiente, el sitio de inserción I-453 es muy apto para la inserción de péptidos, ya que el péptido RGD4C se presenta sobre la superficie de la cápsida y es accesible a anticuerpos y, por tanto, lo más probablemente a los receptores celulares correspondientes. Su combinación con las mutaciones R₅₈₅A y R₅₈₈A aumentó sus actividades de unión aproximadamente 50 veces, sugiriendo que los mutantes R₅₈₅A y/o R₅₈₈A potencian la accesibilidad del inserto a un anticuerpo y/o receptor.

Considerando los datos del Ejemplo 6.1, concretamente que los mutantes de inserto doble, AAV2 RGD4C 453 y 587 y AAV2 RGD4C 453 & 587 A2 no mostraron ninguna actividad de transducción sobre las células HeLa, mientras que estos mutantes de inserto doble presentan muy eficientemente el péptido sobre la superficie y se unen fuertemente a $\alpha_v\beta_3$, puede explicarse por las siguientes hipótesis: (i) podría haber una diferencia tanto si se usa el receptor unido a la membrana como en el Ejemplo 6.1 como el receptor $\alpha_v\beta_3$ soluble en este ELISA. Mientras que los péptidos insertados son perfectamente accesibles a receptores solubles pequeños, el alto número de modificaciones sobre la superficie de la cápsida puede impedir estéricamente la unión de un receptor más grande fijado a la membrana; (ii) aunque el mutante de inserto doble se une al receptor unido a la membrana, la captación del virus o el procesamiento intracelular se previene de manera que no tiene lugar la transducción. Por ejemplo, es razonable creer que el conocido mecanismo de acidificación endosómica que desencadena cambios conformacionales de la cápsida viral podría ser alterado si los epítomos se presentan en un modo demasiado denso.

6.3. Transducción independiente de HSPG

Se probó la transducción independiente de HSPG usando una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) con un fenotipo inactivado en HSPG (ATCC No.: CRL-2242) que probablemente expresa integrina $\alpha_v\beta_3$ como puede concluirse a partir de la Figura 8, donde la adición del péptido RGD soluble inhibe la transducción. De hecho, AAV2 no mutante tuvo una eficiencia de transducción muy baja que incluso se redujo en el mutante A2 (Figura 7). La inserción del péptido RGD-4C en I-453 solo no conduce a velocidades de transducción significativas, sin embargo, si se combina con las mutaciones puntuales de A2 (RGD4C 453 A2 en la Figura 7), la transducción es incluso superior a los mutantes de inserción de I-587, sugiriendo una dependencia conformacional para la transducción de células.

Esta transducción podría inhibirse mediante la adición del péptido RGD soluble, pero solo débilmente por el péptido RGE no específico (Figura 8), demostrando que la transducción por este mutante llegó a ser dependiente de RGD-4C. La eficiencia de transducción de estas células CHO HSPG KO aumentó un factor de aproximadamente cuatro en relación con las no mutantes (Figura 7).

Los mutantes de inserción única en la posición I-587 (RGD4C 587 y RGD4C 587 A2) también mostraron una elevada velocidad de transducción en comparación con los no mutantes, pero no tan fuerte como para RGD4C 453 A2 (Figura 7). La transducción de RGD4C 587 también se inhibió por el péptido RGD soluble que indica su dependencia sobre la interacción de RGD-4C con la integrina $\alpha_v\beta_3$.

El mutante de inserción doble (RGD4C 453 y 587 y RGD4C 453 y 587 A2) no fue nuevamente capaz de transducir eficientemente células (Figura 7) como ya se ha mostrado para las células HeLa (Tabla 10) a pesar de la eficiente unión a $\alpha_v\beta_3$ soluble (Figura 6). Nuevamente, esto podría explicarse por tanto impedimento estérico de las secuencias de direccionamiento demasiado densas como por la ineficiente captación y/o el procesamiento intracelular del virus.

7. Generación de variantes de AAV adicionales

7.1. Inserción de epítomos de CETP en la cápsida de AAV2 en la posición I-453

Se clonaron los siguientes epítomos derivados de CETP de conejo en la posición I-453 de la cápsida de AAV2 usando oligonucleótidos hibridados como se ha descrito anteriormente. Cada una de las secuencias de epítomo insertadas en el esqueleto de AAV2 en I-453 está flanqueada por los siguientes adaptadores de alanina/glicina según el siguiente esquema (Xn representa la secuencia del epítomo):

Tipo I Adaptador de Ala/Gly: (Ala)₂-(Gly)₃-Xn-(Gly)₄-Arg-(Ala)₂

Tipo II Adaptador de Ala/Gly: (Ala)₃-(Gly)₃-Xn-(Gly)₄-Arg-(Ala)₂

Tabla 11: Epítopos derivados de CETP de conejo en I-453

Nombre / sec. de péptido	Tipo	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Adaptador
CETP TP10 AKAVSNL TESRSESLQS SEQ ID NO: 96	Epítopo	5' GGCCGGCGGTGGAGCCA AGCCGTGAGCAACCTGAC CGAGAGCAAGCCGAGAGC CTGCAGAGCGGTGGCGGTG GA 3' SEQ ID NO: 128	5' CGCGTCCACCGCCACC GCTCTGAGGCTCTCGCT TCTGCTCTCGGTCAAGTT GCTCACGGCCTTGGCTCC ACCGCC 3' SEQ ID NO: 129	Tipo Ala/Gly
CETP TP11 SLTGDEFKVKLET SEQ ID NO: 97	Epítopo	5' GGCCGGCGGTGGAGGCC TGACCCGGCAGCAATTCAA GAAGTGTCTGGAGACCGGT GGCGGTGGA 3' SEQ ID NO: 130	5' CGCGTCCACCGCCACC GGTCTCAGCACCTTCTTT GAATTGCTGCGCGGTCCAG GCTTCCACCGCC 3' SEQ ID NO: 131	Tipo Ala/Gly
CETP TP12 REAVAYRFEED SEQ ID NO: 98	Epítopo	5' GGCCGGCGGTGGAGAG AGCCGTGGCTACAGATT CGAAGAGGACGGTGGCGGT GGA 3' SEQ ID NO: 132	5' CGCGTCCACCGCCACC GTCTCTCGAATCTGTA GGCCACGGCCTCTCTTCC ACCGCC 3' SEQ ID NO: 133	Tipo Ala/Gly
CETP TP13 INPEITLDG SEQ ID NO: 99	Epítopo	5' GGCCGGCGGTGGAAATCA ACCCGAGATCATCACCT GGACGGCGGTGGCGGTGGA 3' SEQ ID NO: 134	5' CGCGTCCACCGCCACC GCCGTCCAGGGTGATGAT CTCGGGGTGATTCACC GCC 3' SEQ ID NO: 135	Tipo Ala/Gly
CETP TP18 DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 100	Epítopo	5' GGCCGGCGGTGGAGACA TCAGCGTACCCTGGTGCACC CGTGATCACCGCCACCTAC CTGGTGGCGGTGGA 3' SEQ ID NO: 136	5' CGCGTCCACCGCCACC CAGGTAGTGGCGGTGAT CACGGTGCACCGGTTCAC GCTGATGCTCCACCGCC 3' SEQ ID NO: 137	Tipo Ala/Gly

Nombre / sec. de péptido	Tipo	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Adaptador
CETP TP20 DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 101	Epitopo	5' GGCCGGGGTGGAGACA TCAGCGTGACCGGTGCACC CGTGATCACCGCCGGTGGC GGTGGA 3' SEQ ID NO: 138	5' CGCGTCCACCCGCCACC GGCGGTGATCACGGGTGC ACCGGTCACGCTGATGTC TCCACGCC 3' SEQ ID NO: 139	Tipo Ala/Gly
Ritsch-1 DQSVDFEIDSA SEQ ID NO: 127	Epitopo	5' GGCCGGGGTGGAGACC AGAGCGTGGACTTCGAGAT CGACAGCCCGGTGGCGGT GGA 3' SEQ ID NO: 140	5' CGCGTCCACCCGCCACC GGCGGTGTCGATCTCGAA GTCCACGCTCTGGTCTCC ACCGCC 3' SEQ ID NO: 141	Tipo Ala/Gly

7.2. Inserción de epítomos de CETP en la cápsida de AAV2 en la posición I-453 y I-587

Usando la estrategia de clonación descrita anteriormente, se produjeron las siguientes variantes de la cápsida de AAV2 que llevan epítomos de CETP de conejo en la posición I-453 y I-587:

Tabla 12: Mutantes de inserción doble de CETP

Nombre	Epítomo en I-453	Epítomo en I-587
AAV-TP10-2x	AKAVSNLTESRSESLQS SEQ ID NO: 96	AKAVSNLTESRSESLQS SEQ ID NO: 96
AAV-TP11-2x	SLTGDEFKVKVLET SEQ ID NO: 97	SLTGDEFKVKVLET SEQ ID NO: 97
AAV-TP12/13	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 98	INPEIITLDG SEQ ID NO: 99
AAV-TP12-2x	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 98	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 98
AAV-TP13-2x	INPEIITLDG SEQ ID NO: 99	INPEIITLDG SEQ ID NO: 99
AAV-TP18-2x	DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 100	DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 100
AAV-TP20-2x	DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 101	DISVTGAPVITA SEQ ID NO: 101
AAV-Ritsch1-2x	DQSVDFEIDSA SEQ ID NO: 127	DQSVDFEIDSA SEQ ID NO: 127
AAV2-CETin-2x	CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 60	CDAGSVRTNAPD SEQ ID NO: 60

5

7.3. Inserción de epítomos de citocina en la cápsida de AAV2 en la posición I-453

Se clonaron los siguientes epítomos derivados de citocinas murinas en la posición I-453 de la cápsida de AAV2 usando oligonucleótidos hibridados como se ha descrito anteriormente. Cada una de las secuencias de epítomo insertadas en el esqueleto de AAV2 en I-453 está flanqueada por los adaptadores de alanina/glicina según esta Sección 7 para I-453 anterior.

10

Tabla 13: Epítopos derivados de citocina murina en I-453

Nombre / sec. de péptido	Tipo	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Adaptador
mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVV/ANHQVE SEQ ID NO: 142	Epítipo	5' GGCCGCCGGTGGAGGCA GCAGCCAGAACAGACGCGA CAAGCCCGTGGCCACGCTG GTGGCTAACCAACCAGGTGG AGGCGGTGGAGGG 3' SEQ ID NO: 145	5' CGCGCCCTCCACCGCC CTCCACCTGGTGGTTAGC CACCACGTGGCCACCGGG CTTGCTGCTGCTGTTCTG GCTGCTGCCTCCACCGGC 3' SEQ ID NO: 148	Tipo II Ala/Gly
mIL-17-V1 NAEGKLDHMMNSVL SEQ ID NO: 143	Epítipo	5' GGCCGCCGGTGGAGGCA ACGCCGAGGGCAAGCTTGA CCACCACATGAACAGCGCTG CTGGCGGTGGAGGG 3' SEQ ID NO: 146	5' CGCGCCCTCCACCGCC CAGCACGCTGTTTCATGTG GTGGTCAAGCTTGCCCTC GGCGTTGCCTCCACCGGC 3' SEQ ID NO: 149	Tipo II Ala/Gly
mIL-6-V2 LEEFKLVTLRS SEQ ID NO: 144	Epítipo	5' GGCCGCCGGTGGAGGCC TGGAGGAAATTCCTGAAGGT GACCCGTGAGAAGCGGCGGT GGAGGG 3' SEQ ID NO: 147	5' CGCGCCCTCCACCGCC GCTTCTCAGGGTCACCTT CAGGAATTCCTCCAGGCC TCCACCGGC 3' SEQ ID NO: 150	Tipo II Ala/Gly

Las siguientes secuencias, que son homólogas a las secuencias de citocina murinas correspondientes, pueden integrarse en la cápsida de AAV2 en la posición I-453 según los métodos descritos anteriormente:

Tabla 14: Epítomos derivados de citocina humana en I-453

Citocina	epítomo murino	epítomo humano
TNF-α V1	SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 142	SSRTPSDKPVAHWANPQAE SEQ ID NO: 116
TNF-α V2	SQNSSDKPVAHWANH SEQ ID NO: 151	SRTPSDKPVAHWANP SEQ ID NO: 117
TNF-α V3	SSQNSSDKP SEQ ID NO: 152	SSRTPSDKP SEQ ID NO: 118
IL-17 V1	NAEGKLDHMHMNSVL SEQ ID NO: 143	NADGNVDYHMNSVP SEQ ID NO: 119
IL-17 V2	EGKLDHMHMNSV SEQ ID NO: 153	DGNVDYHMNSV SEQ ID NO: 120
IL-6 V1	KSLEEFKLVTLRSTRQ SEQ ID NO: 154	RSFKEFLQSSLRALRQ SEQ ID NO: 121
IL-6 V2	LEEFKLVTLRS SEQ ID NO: 144	FKEFLQSSLRA SEQ ID NO: 122

5 7.4. Inserción de epítomos de citocina en la cápsida de AAV2 en la posición I-453 y I-587

Usando la estrategia de clonación descrita anteriormente, pueden generarse las siguientes variantes de AAV que llevan diferentes epítomos de citocina en la posición I-453 y I-587 (vacunas bivalentes):

Tabla 15: Variantes de inserción doble para epítomos derivados de citocina

combinación	Epítomo en I-453	Epítomo en I-587
TNF-α / IL-17	mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 142	mIL-17-V1 NAEGKLDHMHMNSVL SEQ ID NO: 143
TNF-α / IL-6	mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 142	mIL-6-V2 LEEFKLVTLRS SEQ ID NO: 144
IL-17 / TNF-α	mIL-17-V1 NAEGKLDHMHMNSVL SEQ ID NO: 143	mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 142
IL-6/ TNF-α	mIL-6-V2 LEEFKLVTLRS SEQ ID NO: 144	mTNFα-V1 SSQNSSDKPVAHVVANHQVE SEQ ID NO: 142
IL-17 / IL-6	mIL-17-V1 NAEGKLDHMHMNSVL SEQ ID NO: 143	mIL-6-V2 LEEFKLVTLRS SEQ ID NO: 144
IL-6 / IL-17	mIL-6-V2 LEEFKLVTLRS SEQ ID NO: 144	mIL-17-V1 NAEGKLDHMHMNSVL SEQ ID NO: 143

8. Inmunización de conejos con vacunas basadas en AAV

8.1. Producción y purificación de vacunas basadas en AAV2 para experimentos de inmunización

Para la producción de partículas de AAV se co-transfectaron células HEK 293-T con el plásmido de vector pUCAV2 que contiene el epítipo subclonado (en I-453 y/o I-587) y el plásmido colaborador pUCAdV como se ha descrito anteriormente. Para la producción a gran escala se sembraron 30 - 60 placas de cultivo celular de 015 cm con $7,5 \times 10^6$ células 293-T y se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. La co-transfección de las células con el plásmido de vector pUCAV2 que contiene el epítipo (en I-453 o I-587) y pUCAdV se realizó como se ha descrito anteriormente. 72 h después de la transfección, se recogieron las células 293-T y el medio y se centrifugaron a 3000 g a 4 °C durante 15 min. El sedimento de células se resuspendió en 15 - 30 ml de tampón de lisis (HEPES 50 mM, NaCl 200 mM, MgCl₂ 2,5 mM; pH 6,8) y se sometió a tres rondas de ciclos de congelación y descongelación. El sobrenadante de cultivo celular aclarado se concentró por TFF (filtración de flujo tangencial) usando el sistema SARTOFLOW[®] Slice 200 Benchtop Cross-flow usando un casete SARTOCON[®] Slice 200 (membrana Hydrosart). El concentrado de TFF del sobrenadante de cultivo celular (aproximadamente 35 ml) se reunió con el lisado en bruto aclarado y posteriormente se trató con 1667 U/ml de benzonasa (MERCK) a 37 °C durante 2 h - 4 h. Después del tratamiento con benzonasa, el conjunto de lisado en bruto y el concentrado de TFF se centrifugó a 3600 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante que contenía AAV se separó mediante una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se realizó SEC usando una columna XK50/20 rellena con perlas de resina SUPERDEX 200[®] y tampón de electroforesis de SEC (HEPES 50 mM, NaCl 400 mM, MgCl₂ 2,5 mM; pH 6,8). Las fracciones de SEC se analizaron por ELISA de AAV2. Se reunieron las fracciones que contenían AAV y se sometieron a centrifugación en gradiente de iodixanol. Se dispusieron en capas soluciones de iodixanol de diferentes concentraciones debajo de la fracción de SEC que contenía el conjunto de virus en tubos de centrifugación QUICKSEAL[®] (25 x 89 mm; BECKMAN). Mediante esto se creó un gradiente de iodixanol compuesto de 4,0 ml de 60 % en el fondo, 5,0 ml 40 %, 4,0 ml 25 % y 5,5 ml 15 % de iodixanol con la solución de virus encima. El gradiente se centrifugó usando un rotor de ángulo fijo (rotor Ti 70.1, BECKMAN) a 65000 rpm durante 1 h a 18 °C. La fase de 40 % que contenía las partículas de AAV se extrajo entonces con una cánula perforando el tubo debajo de la fase del 40 % y dejando que la solución goteara en tubos de recogida. Se recogieron fracciones de aproximadamente 0,5 ml hasta que se llegó a la fase del 25 %. El título de cápsidas de AAV de las fracciones se determinó usando un ELISA comercialmente disponible (ELISA de valoración de AAV, PROGEN). La pureza de las fracciones que contenían AAV se determinó por SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie coloidal. Se reunieron fracciones con alta pureza de partículas de AAV y el título de cápsidas del conjunto final se determinó por ELISA de valoración de AAV2.

8.2. Rotura de la auto-tolerancia por vacunas basadas en AAV

Se generó un panel de vacunas basadas en AAV que llevan epítopos derivados de CETP de conejo como se ha descrito anteriormente. Se compararon las vacunas de CETP basadas en AAV con las vacunas de péptido correspondientes que contenían el mismo epítipo acoplado a LPH (hemocianina de *Limulus polyphemus*) como proteína transportadora. Los péptidos se sintetizaron químicamente con un resto de cisteína del extremo C o N que se usó para acoplar los péptidos a LPH. La síntesis y acoplamiento de los péptidos se realizó por BIOGENES (Berlín, Alemania).

Las vacunas descritas en la Tabla 16 se usaron para la inmunización de conejos:

40

Tabla 16: Vacunas usadas para la inmunización de conejos

Nombre de la vacuna	Vehículo de vacuna	Sitio de inserción	Epítipo	Dosis (µg)
V-TP11	AAV2	I-587	SLTGDEFKVVLET SEQ ID NO: 97	10,9
AAV-TP12	AAV2	I-587	REAVAYRFEED SEQ ID NO: 98	14,1
AAV-TP13	AAV2	I-587	INPEIITLDG SEQ ID NO: 99	13,3
AAV-TP18	AAV2	I-587	DISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 100	7,2
LPH-TP11	LPH	N/A	CSLTGDEFKVVLET SEQ ID NO: 155	véase el texto

Nombre de la vacuna	Vehículo de vacuna	Sitio de inserción	Epítipo	Dosis (μ g)
LPH-TP12	LPH	N/A	CREAVAYRFEED SEQ ID NO: 156	véase el texto
LPH-TP13	LPH	N/A	CINPEITLDG SEQ ID NO: 157	véase el texto
LPH-TP18	LPH	N/A	CDISVTGAPVITATYL SEQ ID NO: 158	véase el texto

5 Para cada enfoque de vacunación se inmunizaron s.c. dos conejos con las vacunas mostradas en la tabla anterior cuatro veces (una inmunización de sensibilización y tres de refuerzo). La primera inmunización de refuerzo se realizó 2 semanas después de una inmunización de sensibilización inicial. Los conejos se reforzaron otras dos veces con las vacunas a intervalos de 3 semanas. Se preparó suero de los animales inmunizados dos semanas después de cada inmunización de refuerzo.

10 Las vacunas basadas en AAV purificadas se mezclaron con un volumen igual de tampón de formulación (PBS con 1 % de sorbitol, 0,2 % de Tween-20, 25 % de propilenglicol, NaCl 200 mM y MgCl₂ 2,5 mM) para la estabilización de las partículas y se guardaron a -80 °C hasta la administración. Si fuera necesario, el volumen de las vacunas basadas en AAV se ajustó a 0,3 ml con tampón de formulación directamente antes de la administración. Las vacunas se administraron s.c. en presencia de 0,7 ml de adyuvante (volumen total 1 ml). El adyuvante se proporcionó por BIOGENES y contuvo, entre otros, 0,01 % de lipopolisacárido derivado de Phormidium, 95 % de aceite de parafina, 2,4 % de Tween-40 y 0,1 % de colesterol.

15 Se administraron s.c. los péptidos acoplados a LPH (en 0,3 ml de TBS) en presencia de 0,7 ml del adyuvante proporcionado por BIOGENES. Se administró 1 mg del conjugado de LPH-péptido para la inmunización de sensibilización. Se usaron 0,5 mg del conjugado para la 1^a inmunización de refuerzo y se usaron 0,25 mg del conjugado para la 2^a y 3^a inmunización de refuerzo.

20 La inducción de auto-anticuerpos anti-CETP en los animales vacunados se determinó por ELISA usando CETP de conejo recombinante como antígeno. Para la producción de CETP de conejo, el ADNc de CETP se amplificó por RT-PCR usando los cebadores

rCETP-uni 5'- GGG GAA TTC ATG TCC CAA AGG CGC CTC CTA CG-3'
(SEQ ID NO: 159)

y

rCETP-rev 5'- GGG GGA TCC CTA GCT CAG GCT CTG GAG GAA ATC C-3'
(SEQ ID NO: 160)

30 y poliA⁺ ARN de hígado de conejo (CLONTECH) como molde. Se clonó el ADNc de CETP en el sitio EcoRI / BamHI del vector p3XFLAG-CMV-8 (SIGMA). El vector resultante codifica la secuencia de CETP madura con una marca FLAG[®] del extremo C y una secuencia conductora de preprotipsina del extremo N para la secreción de la proteína recombinante. Para la expresión de CETP de conejo recombinante, se transfectaron células 293T con el vector por transfección con fosfato de calcio como se ha descrito anteriormente. Se purificó CETP a partir del sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de afinidad usando perlas de agarosa anti-FLAG[®] M2 (SIGMA). La pureza de la CETP de conejo recombinante se analizó por SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie coloidal. Se determinó la actividad de CETP usando un ensayo de actividad de CETP comercialmente disponible (ROAR).

35 Para la valoración de auto-anticuerpos de CETP de conejo en el antisuero, se recubrió una placa MAXISORP de 96 pocillos (NUNC) con CETP de conejo recombinante purificado (100 ng/pocillo) durante 1 h a 37 °C. Después del recubrimiento, los pocillos se lavaron con tampón de lavado (PBS / 0,1 % de Tween-20) y posteriormente se incubaron con tampón de bloqueo (5 % de leche desnatada en tampón de lavado) durante 1 h a 37 °C. Después de bloquear los pocillos, se incubó CETP inmovilizado con diluciones sucesivas de los antisueros en tampón de dilución (tampón de lavado con 1 % de leche desnatada y 1 % de BSA) durante 1 h a 37 °C. Sueros pre-inmunes de conejo o sueros de conejo de vacunaciones sin relacionar sirvieron de controles negativos. Después de lavar, se detectó la unión de IgG de conejo a la CETP inmovilizada usando un anticuerpo anti-IgG de conejo marcada con HRP (H+L) (DAKO; 1:2500 en tampón de dilución). Las señales (DO) se detectaron usando TMB (KEMENTEC) como sustrato.

45 Se determinaron auto-títulos de anticuerpos de CETP por dilución del punto final. El título del antisuero se corresponde con el punto de intersección de la curva de valoración de los antisueros con el límite de detección del ensayo.

El límite de detección (LOD) del ensayo se calculó del siguiente modo:

$$DO \text{ media (sueros no específicos) } + 3,3 \times \text{ desviación estándar de la DO (sueros no específicos)}$$

Además de los títulos de auto-anticuerpos de CETP, se analizaron los títulos anti-péptido de los antisueros. Los péptidos libres (correspondientes a los epítopos integrados en la cápsida de AAV o acoplados a LPH) se inmovilizaron covalentemente en una placa de 96 pocillos (unión a amina de REACTI-BIND™, placas activadas con anhídrido maleico; PIERCE). Para la inmovilización del péptido, la placa de 96 pocillos se incubó con 1 µg de péptido por pocillo en un volumen total de 50 µl de PBS durante al menos 1 h a 37 °C. Después del recubrimiento con los péptidos, los pocillos se bloquearon con 200 µl / pocillo de tampón de bloqueo (PBS / 5 % de leche desnatada / 0,1 % de Tween-20) durante 1 h a 37 °C. Después del bloqueo de los pocillos, los péptidos inmovilizados se incubaron con diluciones sucesivas de los antisueros en tampón de dilución (PBS con 1 % de leche desnatada, 1 % de BSA, 0,1 % de Tween-20) durante 1 h a 37 °C. Sueros pre-inmunes de conejo o sueros de conejo de vacunaciones sin relacionar sirvieron de controles negativos. Después de lavar, la unión de IgG de conejo a la CETP inmovilizada se detectó usando un anticuerpo anti-IgG de conejo marcada con HRP (DAKO; 1:2500 en tampón de dilución). Las señales (DO) se detectaron usando TMB (KEMENTEC) como sustrato. Los títulos de anticuerpos se determinaron como se ha descrito anteriormente.

Excepto por un animal vacunado con AAV-TP13, los datos demuestran que la vacunación con vacunas basadas en AAV induce altos títulos de auto-anticuerpos específicos de diana que no se obtienen usando vacunas basadas en péptido. Por consiguiente, las vacunas basadas en AAV son capaces de romper la auto-tolerancia e inducir altos niveles de auto-anticuerpos (Figura 9). Las propiedades inmunogénicas de las vacunas basadas en péptido se reflejan por los altos títulos de anticuerpos específicos de péptido inducidos por las vacunas de péptido (Figura 10). Sin embargo, estos anticuerpos muestran solo una débil reacción con CETP de conejo nativa (Figura 9), sugiriendo que las vacunas basadas en péptido - aunque inmunogénicas - solo tienen un potencial limitado para romper la auto-tolerancia e inducir bajos niveles de auto-anticuerpos.

8.3. La estructura de cápsida de AAV es esencial para romper de auto-tolerancia e inducción de auto-anticuerpos

Para demostrar que la estructura de la cápsida y la presentación repetitiva estructurada de epítopos dentro de la cápsida de AAV son esenciales para romper la auto-tolerancia del sistema inmunitario y la inducción de auto-anticuerpos, se inmunizaron conejos con partículas AAV-TP11-2x o AAV-TP18-2x desnaturalizadas por calor. Los resultados se compararon con vacunaciones usando las partículas nativas correspondientes. La variante de AAV AAV-TP11-2x lleva el epítipo TP11 de CETP (SLTGDEFKVKVLET, SEQ ID NO: 97) en las posiciones I-453 y I-587. La variante de AAV AAV-TP18-2x lleva el epítipo TP18 de CETP (DISVTGAPVITATYL, SEQ ID NO: 100) en las posiciones I-453 y I-587. Para la desnaturalización por calor, las partículas se mezclaron con un volumen igual de tampón de formulación (PBS con 1 % de sorbitol, 0,2 % de Tween-20, 25 % de propilenglicol, NaCl 200 mM y MgCl₂ 2,5 mM) y se incubaron a 90 °C durante 15 min. La destrucción de la conformación de partículas se analizó por ELISA de valoración de AAV2 que reconoce un epítipo conformacional dentro de la cápsida nativa. La concentración de proteína de las partículas desnaturalizadas por calor se determinó por ensayo Micro BCA (Pierce) y se analizó por transferencia Western usando un anticuerpo anti-AAV2 policlonal generado por inmunización de conejos con proteína purificada VP3 de AAV2 (datos no mostrados).

Se inmunizaron conejos con partículas AAV-TP11-2x desnaturalizadas por calor (5,7 µg por administración) o partículas AAV-TP18-2x (1,8 µg por administración) s.c. en presencia de un adyuvante proporcionado por BIOGENES como se ha descrito anteriormente. 2 semanas después de una inmunización de sensibilización inicial, los conejos se reforzaron con las partículas desnaturalizadas por calor. El suero de los animales se analizó 2 semanas después de la inmunización de refuerzo para niveles de auto-anticuerpos de CETP como se ha descrito anteriormente. En un grupo de control, los conejos se vacunaron con partículas AAV-TP11-2x o AAV-TP18-2x nativas usando la misma pauta que para las partículas desnaturalizadas por calor.

El análisis del título de auto-anticuerpos de CETP en los sueros de los animales inmunizados demuestra que la destrucción de la conformación de cápsida nativa produce una inducción fuertemente alterada de anticuerpos de CETP en comparación con la vacuna nativa (Figura 11) que muestra que la estructura de cápsida nativa y la presentación estructurada de los epítopos dentro de la cápsida son esenciales para romper la auto-tolerancia.

8.4. Evaluación del impacto de anticuerpos anti-AAV2 sobre la inmunización con vacunas basadas en AAV2

Los experimentos de inmunización demostraron que las vacunas basadas en AAV inducen altos títulos de anticuerpos anti-cápsida de AAV, además de los anticuerpos específicos diana (datos no mostrados). Sin embargo, la mayoría de los seres humanos son positivos para AAV2, que significa que estas personas tienen títulos de anticuerpos anti-AAV2 que podrían afectar posiblemente los resultados de la vacunación usando partículas basadas en AAV2. Para evaluar el impacto de anticuerpos anti-AAV2 sobre el éxito de la inmunización de vacunas basadas en AAV2, se pre-inmunizaron conejos por dos administraciones de wtAAV2 (4,5 µg por administración), antes de

empezarse la inmunización (inmunizaciones de sensibilización y dos de refuerzo) con una vacuna de CETP basada en AAV2 (AAV-TP18). Se administraron s.c. o i.m. partículas de wtAAV2 en presencia de un adyuvante proporcionado por BIOGENES como se ha descrito anteriormente. 2 semanas después de una inmunización de sensibilización inicial con wtAAV2, los conejos se reforzaron una vez más con wtAAV2. Se analizó el suero dos semanas después de la inmunización de sensibilización y la 1ª de refuerzo para el nivel de anticuerpos anti-AAV2. El título de anticuerpos anti-AAV2 se determinó por ELISA usando partículas de wtAAV2 inmovilizadas como se describe más adelante. Los datos demuestran que altos niveles de anticuerpos anti-wtAAV2 son detectables después de dos administraciones de wtAAV2 para tanto administración s.c. como i.m. (Figura 12A).

3 semanas después de la inmunización de refuerzo con wtAAV2, los conejos recibieron la primera inmunización de sensibilización con la vacuna basada en AAV2 AAV-TP18 (7,2 µg por administración). La vacuna se administró s.c. o i.m. en presencia de adyuvante proporcionado por BIOGENES como se ha descrito anteriormente. Los conejos se reforzaron con las vacunas 2 semanas después de la vacunación de sensibilización. Los sueros se analizaron 2 semanas después de la vacunación de refuerzo para el nivel de auto-anticuerpos de CETP (Figura 12B). Los títulos de auto-anticuerpos de CETP se determinaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados se compararon con vacunación (s.c.) de animales no pre-inmunizados con wtAAV2.

Los datos demuestran que la pre-inmunización con wtAAV2 produce altos títulos de anticuerpos anti-cápsida de AAV2. Sin embargo, estos altos anticuerpos anti-cápsida de AAV2 no alteran el éxito de la inmunización de una vacuna basada en AAV2, considerando en este caso la inducción de auto-anticuerpos anti-CETP. Por consiguiente, se llegó a la conclusión de que los seres humanos sero-positivos para AAV2 son igualmente elegibles para la vacunación con partículas de AAV2 como los seres humanos sero-negativos y que la sero-conversión de un ser humano vacunado durante un protocolo de vacunación no altera el éxito de la vacunación.

Determinación de títulos de anticuerpos anti-wtAAV2: Se determinó el título de anticuerpos anti-AAV2 por ELISA usando partículas de wtAAV2 inmovilizadas. Brevemente, se inmovilizaron 5×10^{09} partículas de wtAAV2 en cada pocillo de una placa MAXISORP de 96 pocillos (NUNC) en un volumen total de 50 µl de PBS por pocillo. La placa se incubó a 37 °C durante 1 h. Después de bloquear los pocillos con PBS / 5 % de leche desnatada / 0,1 % de Tween-20, se incubaron partículas de wtAAV2 inmovilizadas con diluciones sucesivas de los antisueros en tampón de dilución (PBS con 1 % de leche desnatada, 1 % de BSA, 0,1 % de Tween-20) durante 1 h a 37 °C. Sueros pre-inmunes de conejo o sueros de conejo de vacunaciones sin relacionar sirvieron de controles negativos. Después de lavar, la unión de IgG de conejo a AAV2 inmovilizado se detectó usando un anticuerpo anti-IgG de conejo marcada con HRP y TMB como sustrato. Los títulos de anticuerpos se determinaron como se ha descrito anteriormente.

8.5. Pauta de sensibilización / refuerzo para vacunas basadas en AAV

Se administraron 16,4 µg de partículas de AAV2 que llevan el epítipo CETP-intern (CDAGSVRTNAPD, SEQ ID NO: 60) en la posición I-453 y I-587 (AAV2-CETIn-2x) i.m. en cada sensibilización o inmunización de refuerzo junto con el adyuvante proporcionado por BIOGENES como se ha descrito anteriormente.

Se evaluaron tres pautas diferentes. El grupo A recibió una sensibilización y tres administraciones de refuerzo de AAV2-CETIn-2x (vacunación basada en AAV2). El grupo B recibió una inmunización de sensibilización y una de refuerzo con AAV2-CETIn-2x, seguido de dos inmunizaciones de refuerzo con el péptido CETP-intern acoplado a LPH (refuerzo de LPH-péptido). El grupo C recibió una inmunización de sensibilización y una de refuerzo con AAV2-CETIn-2x, seguido de dos inmunizaciones de refuerzo con AAV1-CETIn (partícula AAV1 que lleva el epítipo CETP-intern en la posición I-588; 11,7 µg/administración). En cada grupo se realizó la primera inmunización de refuerzo dos semanas después de la inmunización de sensibilización. La 2ª y 3ª inmunización de refuerzo se realizó tres semanas después de la vacunación de refuerzo precedente.

Se analizaron los antisueros para reactividad anti-CETP (título de auto-anticuerpos de CETP) dos semanas después de la 1ª, 2ª y 3ª inmunización de refuerzo como se ha descrito anteriormente (Figura 13).

Los datos resultantes demuestran que altos niveles de auto-anticuerpos de CETP son detectables en animales vacunados con AAV2-CETIn-2x solo (grupo A). No se observa aumento de auto-anticuerpos de CETP en el grupo de animales reforzados con péptido CETP acoplado a LPH (grupo B). Además, los datos demuestran que la conmutación del serotipo del esqueleto de AAV (grupo C) tiene la posibilidad de aumentar la respuesta inmunitaria a un auto-antígeno en comparación con reforzar vacunaciones con un serotipo de AAV individual.

8.6. Inmunización contra IgE humana usando vacunas basadas en AAV

Se generó un panel de vacunas basadas en AAV que llevan epítipos derivados de IgE humana como se ha descrito anteriormente. Se compararon vacunas de IgE basadas en AAV con las vacunas de péptido correspondientes que contenían el mismo epítipo acoplado a LPH como proteína transportadora. Los péptidos se sintetizaron químicamente con un resto de cisteína del extremo C o N que se usó para el acoplamiento de los péptidos a LPH.

Se usaron las siguientes vacunas para la inmunización de conejos:

Tabla 17: Vacunas basadas en AAV y LPH usadas para la inmunización contra IgE humana

Nombre de la vacuna	Vehículo de la vacuna	Sitio de inserción	Epítipo	Dosis (µg)	Adm.
AV-Kricek	AAV2	I-587	Kricek	3,1	s.c.
AAV-3DEpi3	AAV2	I-587	3DEpi3	4,4	s.c.
AAV-Flex	AAV2	I-587	Flex	16,3	i.m.
AAV-Bind2	AAV2	I-587	Bind2	5,1	i.m.
LPH-Kricek	LPH	N/A	VNLTWSRASGC SEQ ID NO: 161	Véase el texto	i.m.
LPH-3DEpi3	LPH	N/A	CDSNPRGVSAAYLSR SEQ ID NO: 162	Véase el texto	i.m.
LPH-Flex	LPH	N/A	CEDGQVMDVDLS SEQ ID NO: 163	Véase el texto	i.m.
LPH-Bind2	LPH	N/A	CEKQRNGTLT SEQ ID NO: 164	Véase el texto	i.m.

5 Para cada enfoque de vacunación se inmunizaron dos conejos con las vacunas mostradas en la tabla anterior cuatro veces (una inmunización de sensibilización y tres de refuerzo). La primera inmunización de refuerzo se realizó 2 semanas después de una inmunización de sensibilización inicial. Los conejos se reforzaron otras dos veces con las vacunas a intervalos de 3 semanas.

10 Las vacunas purificadas basadas en AAV se mezclaron con un volumen igual de tampón de formulación (PBS con 1 % de sorbitol, 0,2 % de Tween-20, 25 % de propilenglicol, NaCl 200 mM y MgCl₂ 2,5 mM) para la estabilización de las partículas y se guardaron a -80 °C hasta la administración. Si fuera necesario, el volumen de la vacuna se ajustó a 0,3 ml - 0,5 ml con tampón de formulación directamente antes de la administración. Las vacunas basadas en AAV se administraron s.c. o i.m. junto con el adyuvante BIOGENES (volumen total 1 ml).

15 Los péptidos acoplados a LPH (en 0,3 ml de TBS) se administraron i.m. en presencia de 0,7 ml del adyuvante proporcionado por BIOGENES. Se administró 1 mg del conjugado de LPH-péptido para la inmunización de sensibilización. Se usaron 0,5 mg del conjugado para la 1ª inmunización de refuerzo y se usaron 0,25 mg del conjugado para la 2ª y 3ª inmunización de refuerzo.

20 La inducción de anticuerpos anti-IgE humana en los animales vacunados se determinó por ELISA usando IgE humana (DIATEC, Oslo, Noruega) como antígeno. Se recubrió una placa MAXISORP de 96 pocillos (NUNC) con IgE humana (1 µg/pocillo) durante 1 h a 37 °C. Después del recubrimiento, los pocillos se lavaron con tampón de lavado (PBS / 0,1 % de Tween-20) y posteriormente se incubaron con tampón de bloqueo (5 % de leche desnatada en tampón de lavado) durante 1 h a 37 °C. Después de bloquear los pocillos, se incubó IgE humana inmovilizada con diluciones sucesivas de los antisueros en tampón de dilución (tampón de lavado con 1 % de leche desnatada y 1 % de BSA) durante 1 h a 37 °C. Sueros pre-inmunes de conejo o sueros de conejo de vacunaciones sin relacionar sirvieron de controles negativos. Después de lavar, se detectó la unión de IgG de conejo a la IgE inmovilizada usando un anticuerpo anti-IgG de conejo marcada con HRP (DAKO; 1:2500 en tampón de dilución). Las señales (DO) se detectaron usando TMB (KEMENEC) como sustrato.

30 Además de los títulos de IgE, se analizaron los títulos anti-péptido de los antisueros. Los péptidos libres (correspondientes a los epitopos integrados en la cápsida de AAV o acoplado a LPH) se inmovilizaron covalentemente en una placa de 96 pocillos (unión de amina REACTI-BIND™, placas activadas con anhídrido maleico; PIERCE) como se ha descrito anteriormente. Después del bloqueo de los pocillos, los péptidos inmovilizados se incubaron con diluciones sucesivas de los antisueros en tampón de dilución (PBS con 1 % de leche desnatada, 1 % de BSA, 0,1 % de Tween-20) durante 1 h a 37 °C. Sueros pre-inmunes de conejo o sueros de conejo de vacunaciones sin relacionar sirvieron de controles negativos. Después de lavar, se detectó la unión de IgG de conejo a la CETP inmovilizada usando un anticuerpo anti-IgG de conejo marcada con HRP (DAKO; 1:2500 en tampón de dilución). Las señales (DO) se detectaron usando TMB (KEMENEC) como sustrato. Los títulos de anticuerpos se determinaron como se ha descrito anteriormente

Los títulos de los antisueros anti-IgE se resumen en la Tabla 18 a continuación:

Tabla 18: Título medio de anti-IgE de inmunizaciones con vacunas de IgE basadas en AAV frente a LPH

Vacuna	Título anti-IgE 1º Refuerzo	Título anti-IgE 2º Refuerzo	Título anti-IgE 3º Refuerzo
AAV-Kricek	4750	20150	25460
AAV-Kricek*	n.d.	7950	27000
AAV-3DEpi3*	5000	18200	30140
AAV-Bind2	575	3075	7750
AAV-Flex	17200	40300	38100
LPH-Kricek	n.d.	1300	400
LPH-3DEpi3	705	1400	1600
LPH-Flex	15000	14000	23250
LPH-Bind2	0	0	0

* se usaron vacunas basadas en AAV para la inmunización de sensibilización y la 1ª de refuerzo; se realizaron la 2ª y 3ª inmunización de refuerzo con el péptido acoplado a LPH correspondiente

De forma interesante, la vacunación de conejos con LPH-Kricek, LPH-3DEpi3 o LPH-Bind2 dejó de inducir niveles significativos de anticuerpos contra IgE humana. Las propiedades inmunogénicas de las vacunas basadas en péptido se reflejan por los altos títulos de anticuerpos específicos de péptido inducidos por las vacunas de péptido (datos no mostrados). Sin embargo, estos anticuerpos no muestran reacción o solo una débil reacción con IgE humana nativa. Solo LPH-Flex indujo títulos razonablemente altos de anticuerpos específicos para IgE humana nativa. Esto es en clara contraposición a los resultados obtenidos con las vacunas basadas en AAV correspondientes como AAV-Kricek (Figura 14) que generan títulos de anticuerpos específicos de IgE humana considerablemente más altos en comparación con las construcciones de fusión de LPH correspondientes. Esto indica que la conformación fija de los epítopos de IgE correspondientes en la cápsida de AAV2 se parece a la estructura de la secuencia dentro de la molécula de IgE de una mejor forma que los péptidos acoplados a LPH. Debe observarse que la generación de anticuerpos anti-IgE humana en este modelo animal con conejos no vence la tolerancia del sistema inmunitario a auto-antígenos.

15 Bibliografía

- Arnold, G. S., Sasser, A. K., Stachler, M. D. y Bartlett, J. S. (2006) *Mol Ther*, 14, 97-106.
- Asokan, A. y Samulski, R. J. (2006) *Nat Biotechnol*, 24, 158-60.
- Asquith, D. L. y I. B. McInnes (2007). "Emerging cytokine targets in rheumatoid arthritis." *Curr Opin Rheumatol* 19(3): 246-51.
- Aumailley, M., Gerl, M., Sonnenberg, A., Deutzmann, R. y Timpl, R. (1990) *FEBS Lett*, 262, 82-6.
- Barassi, C., E. Soprana, et al. (2005). *J Virol* 79(11): 6848-58.
- Bousquet, J., Cabrera, P., Berkman, N., Buhl, R., Holgate, S., Wenzel, S., Fox, H., Hedgcock, S., Blogg, M. y Cioppa, G. D. (2005) *Allergy*, 60, 302-8.
- Chackerian, B., Lowy, D. R. et al. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2373-8.
- Chackerian, B., Lowy, D. R. y Schiller, J. T. (2001) *J Clin Invest*, 108, 415-23.
- Chatterjee, M. B., Foon, K. A. y Kohler, H. (1994) *Cancer Immunology Immunotherapy*, 38, 75-82.
- Cook, J. P., Henry, A. J., McDonnell, J. M., Owens, R. J., Sutton, B. J. y Gould, H. J. (1997) *Biochemistry*, 36, 15579-88.
- Corpet, F. (1988) *Nucleic Acids Res*, 16, 10881-90.
- Dean, D. A., Strong, D. D. y Zimmer, W. E. (2005) *Gene Ther*, 12, 881-90.
- Gamsjaeger, R., C. K. Liew, et al. (2007). *Trends Biochem Sci* 32(2): 63-70.
- Garman, S. C., Wurzburg, B. A., Tarchevskaya, S. S., Kinet, J. P. y Jardetzky, T. S. (2000) *Nature*, 406, 259-66.
- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G. y Hallek, M. (1999) *Nat Med*, 5, 1438.
- Grifman, M., Trepel, M., Speece, P., Gilbert, L. B., Arap, W., Pasqualini, R. y Weitzman, M. D. (2001) *Mol Ther*, 3, 964-75.
- Helm, B., Kebo, D., Vercelli, D., Glovsky, M. M., Gould, H., Ishizaka, K., Geha, R. y Ishizaka, T. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 9465-9.
- Helm, B., Marsh, P., Vercelli, D., Padlan, E., Gould, H. y Geha, R. (1988) *Nature*, 331, 180-3.
- Huttner, N. A., Girod, A., Perabo, L., Edbauer, D., Kleinschmidt, J. A., Buning, H. y Hallek, M. (2003) *Gene Ther*,

- 10, 2139-47.
 Jefferis, R. (1993) *Immunol Today*, 14, 119-21.
 Jerne, N. K. (1974) *Ann Immunol (Paris)*, 125C, 373-89.
 Jerne, N. K., Roland, J. y Cazenave, P. A. (1982) *Embo J*, 1, 243-7.
 5 Kay, M. A., Glorioso, J. C. y Naldini, L. (2001) *Nat Med*, 7, 33-40.
 Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, O. J., Wobus, C. E., Bettinger, K., Von der Lieth, C. W., King, J. A. y Kleinschmidt, J. A. (2003) *J Virol*, 77, 11072-81.
 Klenerman, P., Tolfvenstam, T., Price, D. A., Nixon, D. F., Broliden, K. y Oxenius, A. (2002) *Pathol Biol (Paris)*, 50, 317-25.
 10 Kricek, F., Ruf, C., Rudolf, M. P., Effenberger, F., Mayer, P. y Stadler, B. M. (1999) *Int Arch Allergy Immunol*, 118, 222-3.
 Laity, J. H., B. M. Lee, et al. (2001). *Curr Opin Struct Biol* 11(1): 39-46.
 Laughlin, C. A., Tratschin, J. D., Coon, H. y Carter, B. J. (1983) *Gene*, 23, 65-73.
 Levy, D. A. y Chen, J. (1970) *N Engl J Med*, 283, 541-2.
 15 Li, Q., Cao, C., Chackerian, B., Schiller, J., Gordon, M., Ugen, K. E. y Morgan, D. (2004) *BMC Neurosci*, 5, 21.
 Lieber, A. (2003) *Nat Biotechnol*, 21, 1011-3.
 Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Goldnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D. M., Finke, S., Hallek, M. y Buning, H. (2005) *J Virol*, 79, 11776-87.
 Maheshri, N., Koerber, J. T., Kaspar, B. K. y Schaffer, D. V. (2006) *Nat Biotechnol*, 24, 198-204.
 20 Misumi, S., D. Nakayama, et al. (2006). *J Immunol* 176(1): 463-71.
 Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B. A., Snyder, R. O., McArthur, J. G. y Patel, S. D. (2000) *J Virol*, 74, 1761-6.
 Muller, O. J., Kaul, F., Weitzman, M. D., Pasqualini, R., Arap, W., Kleinschmidt, J. A. y Trepel, M. (2003) *Nat Biotechnol*, 21, 1040-6.
 25 Nicklin, S. A., Buening, H., Dishart, K. L., de Alwis, M., Girod, A., Hacker, U., Thrasher, A. J., Ali, R. R., Hallek, M. y Baker, A. H. (2001) *Mol Ther*, 4, 174-81.
 Nygren, P. A. y Skerra, A. (2004) *J Immunol Methods*, 290, 3-28.
 Opie, S. R., Warrington, K. H., Jr., Agbandje-McKenna, M., Zolotukhin, S. y Muzyczka, N. (2003) *J Virol*, 77, 6995-7006.
 30 Parker, K. C., M. A. Bednarek, et al. (1994). *J Immunol* 152(1): 163-75.
 Perabo, L. (2003) In *Institut für BiochemieLMU, München*, pp. 1-121.
 Perabo, L., Buning, H., Kofler, D. M., Ried, M. U., Girod, A., Wendtner, C. M., Enssle, J. y Hallek, M. (2003) *Mol Ther*, 8, 151-7.
 Perabo, L., Endell, J., King, S., Lux, K., Goldnau, D., Hallek, M. y Buning, H. (2006a) *J Gene Med*, 8, 155-62.
 35 Perabo, L., Goldnau, D., White, K., Endell, J., Boucas, J., Humme, S., Work, L. M., Janicki, H., Hallek, M., Baker, A. H. y Buning, H. (2006b) *J Virol*, 80, 7265-9.
 Pfeifer, A. y Verma, I. M. (2001) *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2, 177-211.
 Presta, L., Shields, R., O'Connell, L., Lahr, S., Porter, J., Gorman, C. y Jardieu, P. (1994) *J Biol Chem*, 269, 26368-73.
 40 Ried, M. U., Girod, A., Leike, K., Buning, H. y Hallek, M. (2002) *J Virol*, 76, 4559-66.
 Riemer, A. B., Untersmayr, E., Knittelfelder, R., Duschl, A., Pehamberger, H., Zielinski, C. C., Scheiner, O. y Jensen-Jarolim, E. (2007) *Cancer Res*, 67, 3406-11.
 Rittershaus, C. W., Miller, D. P., Thomas, L. J., Picard, M. D., Honan, C. M., Emmett, C. D., Pettey, C. L., Adari, H., Hammond, R. A., Beattie, D. T., Callow, A. D., Marsh, H. C. y Ryan, U. S. (2000) *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 2106-12.
 45 Rudolf, M. P., Vogel, M., Kricek, F., Ruf, C., Zurcher, A. W., Reuschel, R., Auer, M., Miescher, S. y Stadler, B. M. (1998) *J Immunol*, 160, 3315-21.
 Rudolf, M. P., Zuercher, A. W., Nechansky, A., Ruf, C., Vogel, M., Miescher, S. M., Stadler, B. M. y Kricek, F. (2000) *J Immunol*, 165, 813-9.
 50 Ruffing, M., Heid, H. y Kleinschmidt, J. A. (1994) *J Gen Virol*, 75 (Pt 12), 3385-92.
 Shi, W., Arnold, G. S. y Bartlett, J. S. (2001) *Hum Gene Ther*, 12, 1697-711.
 Shi, W. y Bartlett, J. S. (2003) *Mol Ther*, 7, 515-25.
 Shi, X., Fang, G., Shi, W. y Bartlett, J. S. (2006) *Hum Gene Ther*, 17, 353-61.
 Smolen, J. S. y Steiner, G. (2003) *Nat Rev Drug Discov*, 2, 473-88.
 55 Stachler, M. D. y Bartlett, J. S. (2006) *Gene Ther*, 13, 926-31.
 Stadler, B. M., Zurcher, A. W., Miescher, S., Kricek, F. y Vogel, M. (1999) *Int Arch Allergy Immunol*, 118, 119-21.
 Summerford, C., Bartlett, J. S. y Samulski, R. J. (1999) *Nat Med*, 5, 78-82.
 Theiss, H. D., Kofler, D. M., Buning, H., Aldenhoff, A. L., Kaess, B., Decker, T., Baumert, J., Hallek, M. y Wendtner, C. M. (2003) *Exp Hematol*, 31, 1223-9.
 60 Uversky V.N., Fernández A. y Fink A. L. (2006) capítulo 1, 1-20 in: *Protein Reviews Volume 4*, editor: M. Zouhair Atassi: *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Disease, Part A: Protein Aggregation and Conformational Disease*; Springer.
 Varela, F. J. y Coutinho, A. (1991) *Immunol Today*, 12, 159-66.
 Vogel, M., Miescher, S., Kuhn, S., Zurcher, A. W., Stadler, M. B., Ruf, C., Effenberger, F., Kricek, F. y Stadler, B. M. (2000) *J Mol Biol*, 298, 729-35.
 65 Vogel, M., Tschopp, C., Bobrzynski, T., Fux, M., Stadler, M. B., Miescher, S. M. y Stadler, B. M. (2004) *J Mol Biol*,

- 341, 477-89.
Warrington, K. H., Jr., Gorbatyuk, O. S., Harrison, J. K., Opie, S. R., Zolotukhin, S. y Muzyczka, N. (2004) *J Virol*, 78, 6595-609.
- 5 Waterkamp, D. A., Muller, O. J., Ying, Y., Trepel, M. y Kleinschmidt, J. A. (2006) *J Gene Med*, 8, 1307-19.
White, S. J., Nicklin, S. A., Buning, H., Brosnan, M. J., Leike, K., Papadakis, E. D., Hallek, M. y Baker, A. H. (2004) *Circulation*, 109, 513-9.
- Work, L. M., Buning, H., Hunt, E., Nicklin, S. A., Denby, L., Britton, N., Leike, K., Odenthal, M., Drebber, U., Hallek, M. y Baker, A. H. (2006) *Mol Ther*, 13, 683-93.
- 10 Work, L. M., Nicklin, S. A., Brain, N. J., Dishart, K. L., Von Seggern, D. J., Hallek, M., Buning, H. y Baker, A. H. (2004) *Mol Ther*, 9, 198-208.
- Wu, P., Xiao, W., Conlon, T., Hughes, J., Agbandje-McKenna, M., Ferkol, T., Flotte, T. y Muzyczka, N. (2000) *J Virol*, 74, 8635-47.
- Wu, Z., Asokan, A., Grieger, J. C., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M. y Samulski, R. J. (2006) *J Virol*, 80, 11393-7.
- 15 Xiao, X., Li, J. y Samulski, R. J. (1998) *J Virol*, 72, 2224-32.

REIVINDICACIONES

1. Una estructura multimérica que comprende una proteína estructural de parvovirus que comprende una inserción de aminoácido en la que la inserción de aminoácido es directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, y en la que la proteína estructural con la inserción tiene capacidad de formación de partículas, y en la que la inserción
- (a) tiene una longitud de 4 a 30 aminoácidos, y/o
 (b) es un epítopo.
2. La estructura multimérica de la reivindicación 1,
- a) en la que la inserción está localizada sobre la superficie de la cápsida formada por las proteínas estructurales;
 b) en la que el parvovirus es un virus adeno-asociado, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en AAV-1, AAV-2, AAV-3b, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 y b-AAV, especialmente seleccionado del grupo que consiste en AAV-1, AAV-2, AAV-5 y AAV-8;
 c) en la que el parvovirus está seleccionado del grupo que consiste en virus de la panleucopenia felina (FPV), parvovirus canino (CPV), B19, parvovirus del ganso (GPV) y virus mínimo de ratones (MVM), especialmente FPV, CPV y B19;
 d) en la que la inserción de aminoácido tiene una longitud de 5 a 20, lo más preferentemente 5 a 15 aminoácidos; y/o
 e) en la que la inserción de aminoácido es un epítopo.
3. La estructura multimérica de la reivindicación 2,
- a) en la que el epítopo es un epítopo de linfocito B;
 b) en la que la inserción es un epítopo derivado de tolerógeno;
 c) en la que la inserción es una parte de una proteína seleccionada del grupo que consiste en un antígeno de tumor, una proteína erróneamente plegada, una proteína del suero, una proteína de membrana, un receptor viral, un miembro de la familia de TNF y una interleucina; y/o
 d) en la que el epítopo derivado de tolerógeno se deriva de una proteína del grupo que consiste en CETP, CD20, receptores de acetilcolina, IL13R, EGFR, IgE, Melan A, HMW MAA, CA125, Her2/NEU, CCR5, molécula de adhesión a células L1, VEGF, EGFR, CD20, TNF- α , IL-6, IL9, IL-13, IL-17 y β -amiloides, particularmente en la que el epítopo derivado de tolerógeno está seleccionado del grupo que consiste en VNLTWSRASG, EFCINHRGYWVCGD, EDGQVMDVDLS, EKQRNGTLT, TYQCRVTHPHLPRALMR, RHSTTQPRKTKGSG, DSNPRGVSAYLSR, TITCLVVDLAPSK, KTKGSGFFVF, THPHLPRALMRS, GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK, LPRALMRS, INHRGYWV, CDAGSVRTNAPD AKAVSNLTESRSESLQS, SLTGDEFKVKLET, REAVAYRFEED, INPEIITLDG, DISVTGAPVITATYL, DISVTGAPVITA, PKTVSNLTESSESVSQS, SLMGDEFKAVLET, QHSVAYTFEED, INPEIITRDG, DISLTGDPVITASYL, DISLTGDPVITA, DQSIDFEIDSA, KNVSEDLPLPTFSPTLLGDS, KNVSEDLPLPT, CDSGRVRTDAPD, FPEHLLVDFLQSL, DAEFRHDSG, HYAAAQWDFGNTMCQL, YAAQWDFGNTMCQ, RSQKEGLHYT, SSRTPSDKPVAHVANPQAE, SRTPSDKPVAHVANP, SSRTPSDKP, NADGNVDYHMNSVP, DGNVDYHMNSV, RSFKEFLQSSLRALRQ; FKEFLQSSLRA y QMWAPQWGPD.
4. La estructura multimérica de la reivindicación 1 o 2,
- a) en la que la inserción de aminoácido provoca un aumento en la actividad de transducción del parvovirus, particularmente
- i) en la que la inserción de aminoácido media en la unión de la proteína estructural a un receptor de la membrana celular,
 ii) en la que la inserción de aminoácido es un ligando para un receptor dado, y/o
 iii) en la que la inserción de aminoácido contiene un motivo RGD, especialmente en la que la inserción de aminoácido es ACDCRGDCFCA;
- b) en la que la inserción de aminoácido provoca una alteración en una propiedad cromatográfica de la proteína estructural, particularmente en la que la inserción de aminoácido es una marca útil para unirse a un ligando; y/o
 c) en la que la inserción tiene un conector del extremo C, preferentemente en la que la secuencia conectora se selecciona para formar un dedo de cinc (dedo de Zn) tal como C₂H₂, C₄ y C₂HC, particularmente en la que el conector comprende al menos una Cys del extremo N y al menos una Cys del extremo C de la inserción.

5. La estructura multimérica de la reivindicación 1 a 4, en la que la proteína estructural de parvovirus comprende una o más mutación (mutaciones) adicional(es) en un sitio diferente del sitio directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, seleccionado independientemente de una mutación puntual, una delección interna, una delección del extremo N, una inserción y una sustitución, preferentemente una inserción adicional.
- 5
6. La estructura multimérica de la reivindicación 5,
- a) en la que la mutación adicional es una inserción definida en analogía a la primera inserción de la reivindicación 2a), 2d), 3a) a 3d) y/o 4a), y/o en la que la proteína estructural con la inserción adicional tiene capacidad de formación de partículas y/o en la que la inserción tiene una longitud de 4 a aproximadamente 30 aminoácidos y/o
- 10 b) en la que la mutación adicional es una inserción de un epítipo de linfocito B o un epítipo de linfocito T citotóxico.
7. La estructura multimérica de la reivindicación 5, en la que la mutación adicional reduce la actividad de transducción de la partícula para una célula diana dada al menos el 50 %, preferentemente al menos el 80 %, especialmente al menos el 95 %, particularmente en la que la mutación adicional es una mutación que inactiva el sitio de unión HSPG localizado en la proximidad de la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (sitio I-587), en particular en la que la mutación adicional es una delección o sustitución de R₅₈₅ y/o R₅₈₈ de AAV-2 o los aminoácidos correspondientes de otros parvovirus, preferentemente sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en R₄₈₄A, R₄₈₇A, R₄₈₇G, K₅₃₂A, K₅₃₂A, K₅₃₂D, R₅₈₅A, R₅₈₅S, R₅₈₅Q, R₅₈₈A y R₅₈₈T, especialmente R₅₈₅A y R₅₈₈A para AAV-2, y K₅₃₁A y K₅₃₁E para AAV-6.
- 15
8. La estructura multimérica de la reivindicación 5, en la que la mutación adicional reduce la capacidad para inducir una respuesta de linfocitos B contra un epítipo y/o mimótopo específico de parvovirus.
- 20
9. Una biblioteca de proteínas estructurales, en la que la biblioteca comprende un conjunto de diferentes proteínas estructurales parvovirales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, particularmente en la que la biblioteca se acopla y/o particularmente en la que la biblioteca de la presente invención tiene una multiplicidad de mutantes parvovirales superior a 10³, preferentemente superior a 10⁵, más preferentemente superior a 10⁶, especialmente superior a 10⁷.
- 25
10. La estructura multimérica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la estructura multimérica es un capsómero, una partícula similar a virus o un virus y/o particularmente en la que la estructura es un agregado de al menos aproximadamente 5, preferentemente al menos aproximadamente 10, más preferentemente al menos aproximadamente 30, lo más preferentemente al menos aproximadamente 60 proteínas estructurales.
- 30
11. Un ácido nucleico que codifica una proteína estructural de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
12. Un vector que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 11.
13. Una biblioteca de vectores, en la que la biblioteca comprende un conjunto de diferentes vectores según la reivindicación 12, particularmente en la que se acoplan el genotipo y el fenotipo de partículas de virión.
- 35
14. Un virus que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 11 o un vector de la reivindicación 12.
15. Una célula aislada que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 11 o un vector de la reivindicación 12.
16. Un método para alterar el tropismo de un parvovirus, comprendiendo el método las etapas de:
- a) co-expresar las funciones de colaborador parvoviral y de vector, en el que la función de colaborador expresa una proteína estructural parvoviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en condiciones que permiten la formación de parvovirus, y
- 40 b) aislar el parvovirus
17. Un método para presentar un epítipo sobre la superficie de un parvovirus, comprendiendo el método las etapas de:
- a) expresar el ácido nucleico según la reivindicación 11 bajo condiciones adecuadas, y
- 45 b) aislar la proteína estructural expresada de la etapa a).
18. Medicamento que comprende al menos una proteína estructural de parvovirus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y/o un ácido nucleico según la reivindicación 11, preferentemente al menos una estructura

multimérica según la reivindicación 10.

19. Medicamento de la reivindicación 18 para su uso como una vacuna o como un vector de transferencia génica.

20. Uso de al menos una proteína estructural de parvovirus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y/o un ácido nucleico según la reivindicación 11, preferentemente al menos una estructura multimérica según la reivindicación 10 para la fabricación de una vacuna o un vector de transferencia génica.

21. El medicamento de la reivindicación 18 o 19 para el tratamiento y/o prevención de

a) una enfermedad alérgica y/o asma, en la que en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia YKQIS₂₆₁ SQSGA (I-261), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia EEKFF₅₃₄ PQSGV (I-534), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia RTTNP₅₇₀ VATEQ (I-570), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia NPVAT₅₇₃ EQYGS (I-573) o directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), especialmente en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus y directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epi-/mimótopo antiidiotípico de un anticuerpo anti-IgE, y/o un epi-/mimótopo de IgE, particularmente un mimótopo de secuencia de EFCINHRGYWVCGD, estando los primeros G, W y V conservados y restos de cisteína C que median en una forma circular del péptido mediante puentes disulfuro, VNLTWSRASG o INHRGYWV o particularmente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en EKQRNGTLT, EDGQVMDVDLS, TYQCRVTHPHLPRALMR, RHSTTQPRKTKGSG, DSNPRGVSAAYLSR, TITCLWDLAPSK, KTKGSGFFVF, THPHLPRALMRS, GETYQCRVTHPHLPRALMRSTTK, LPRALMRS y una variante funcionalmente activa de los mismos;

b) enfermedad de Alzheimer, en la que en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia YKQIS₂₆₁ SQSGA (I-261), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia EEKFF₅₃₄ PQSGV (I-534), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia RTTNP₅₇₀ VATEQ (I-570), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia NPVAT₅₇₃ EQYGS (I-573) o directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), especialmente en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus y directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epítipo o mimótopo de β-amiloide, particularmente que comprende o que tiene la secuencia DAEFRHDSG o una variante funcionalmente activa de los mismos;

c) aterosclerosis, en la que en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia YKQIS₂₆₁ SQSGA (I-261), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia EEKFF₅₃₄ PQSGV (I-534), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia RTTNP₅₇₀ VATEQ (I-570), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia NPVAT₅₇₃ EQYGS (I-573) o directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), especialmente en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus y directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), especialmente I-453 y I-587, preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epítipo o mimótopo de CETP, particularmente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en PKTVSNLTISSSESVQS, SLMGDEFKAVLET, QHSVAYTFEED, INPEIITRDG, DISLTGDPVITASYL, DISLTGDPVITA, DG2SIDFEIDSA, KNVSEDLPPTFSPTLLGDS, KNVSEDLPPT, CDSGRVRTDAPD, FPEHLLVDFLQSL y una variante funcionalmente activa de los mismos;

d) una enfermedad tumoral, en la que en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia YKQIS₂₆₁ SQSGA (I-261), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia EEKFF₅₃₄ PQSGV (I-534), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia RTTNP₅₇₀ VATEQ (I-570), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia NPVAT₅₇₃ EQYGS (I-573) o directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), especialmente en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus y directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), preferentemente

de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un antígeno de tumor, particularmente un epítipo o mimótopo de HER2/neu, especialmente el epítipo QMWAPQWGPD o una variante funcionalmente activa de los mismos;

- 5 e) una enfermedad autoinmunitaria y/o una enfermedad inflamatoria crónica, preferentemente artritis reumatoide y/o enfermedad de Crohn, en la que en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia YKQIS₂₆₁ SQSGA (I-261), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia EEKFF₅₃₄ PQSGV (I-534), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia RTTNP₅₇₀ VAIEQ (I-570), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia NPVAT₅₇₃ EQYGS (I-573) o directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), especialmente en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus y directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epítipo o mimótopo de una citocina, preferentemente de TNF- α , IL-6 y/o IL-17, especialmente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en SSRTPSDKPVAHVVANPQAE, SRTPSDKPVAHVVANP, SSRTPSDKP, NADGNVDYHMNSVP, DGNVDYHMNSV, RSFKEFLQSSLRALRQ, FKEFLQSSLRA o una variante funcionalmente activa de los mismos,
- 10
15
20
25
30
- f) una enfermedad infecciosa, preferentemente una infección por VIH, en la que en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus, y preferentemente en al menos un sitio de inserción adicional, más preferentemente en el sitio de inserción directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia YKQIS₂₆₁ SQSGA (I-261), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia EEKFF₅₃₄ PQSGV (I-534), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia RTTNP₅₇₀ VAIEQ (I-570), directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia NPVAT₅₇₃ EQYGS (I-573) o directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), especialmente en la inserción de aminoácido directamente en el extremo C del aminoácido G₄₅₃ en la secuencia de AAV-2 o el aminoácido correspondiente de cualquier otro parvovirus y directamente en el extremo N o C de un aminoácido en la secuencia LQRGN₅₈₇ RQAAT (I-587), preferentemente de AAV1, AAV2 o AAV-6, la proteína estructural de un parvovirus comprende un epítipo o mimótopo de un receptor viral, preferentemente de CCR5, especialmente un epítipo seleccionado del grupo que consiste en HYAAAQWDFGNTMCQL, YAAQWDFGNTMCQ, RSQKEGLHYT o una variante funcionalmente activa de los mismos.

Fig. 1

AAV-2

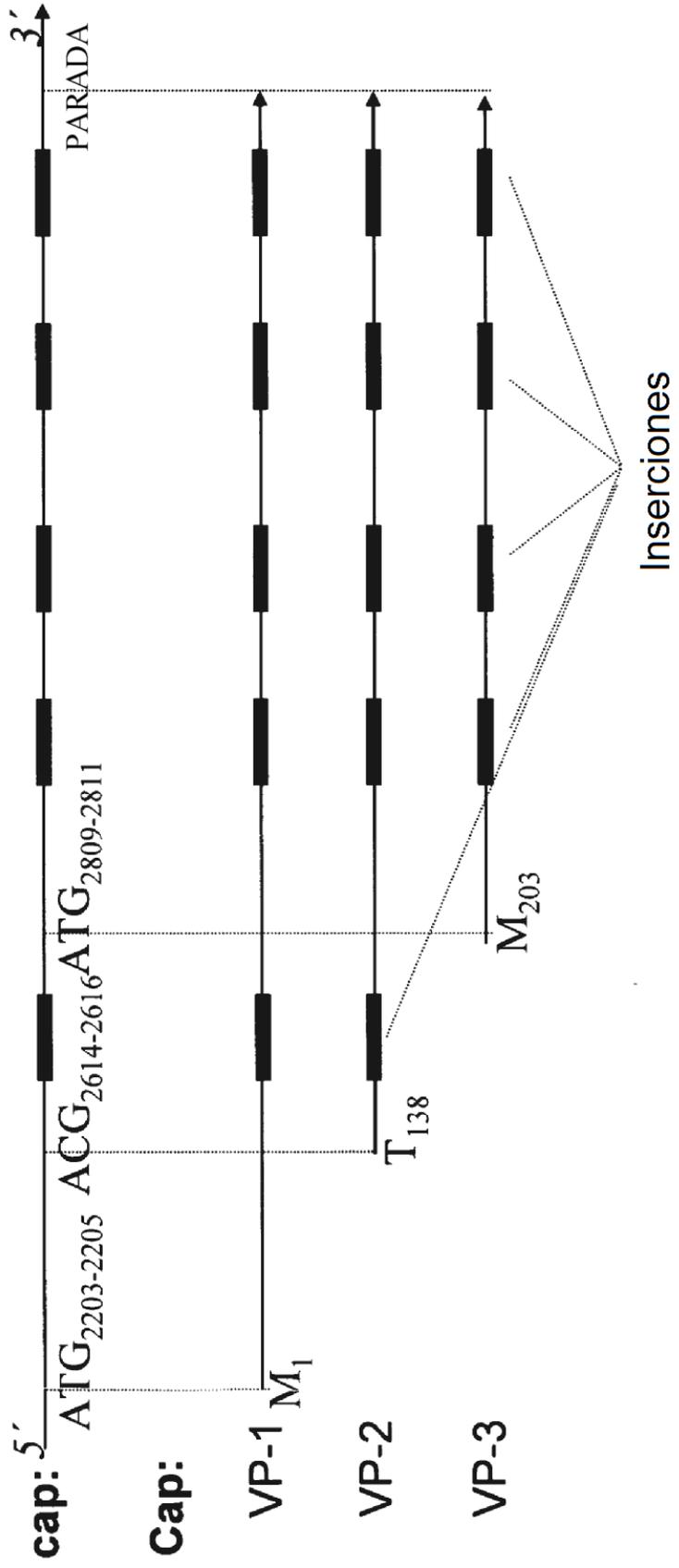


Fig. 2

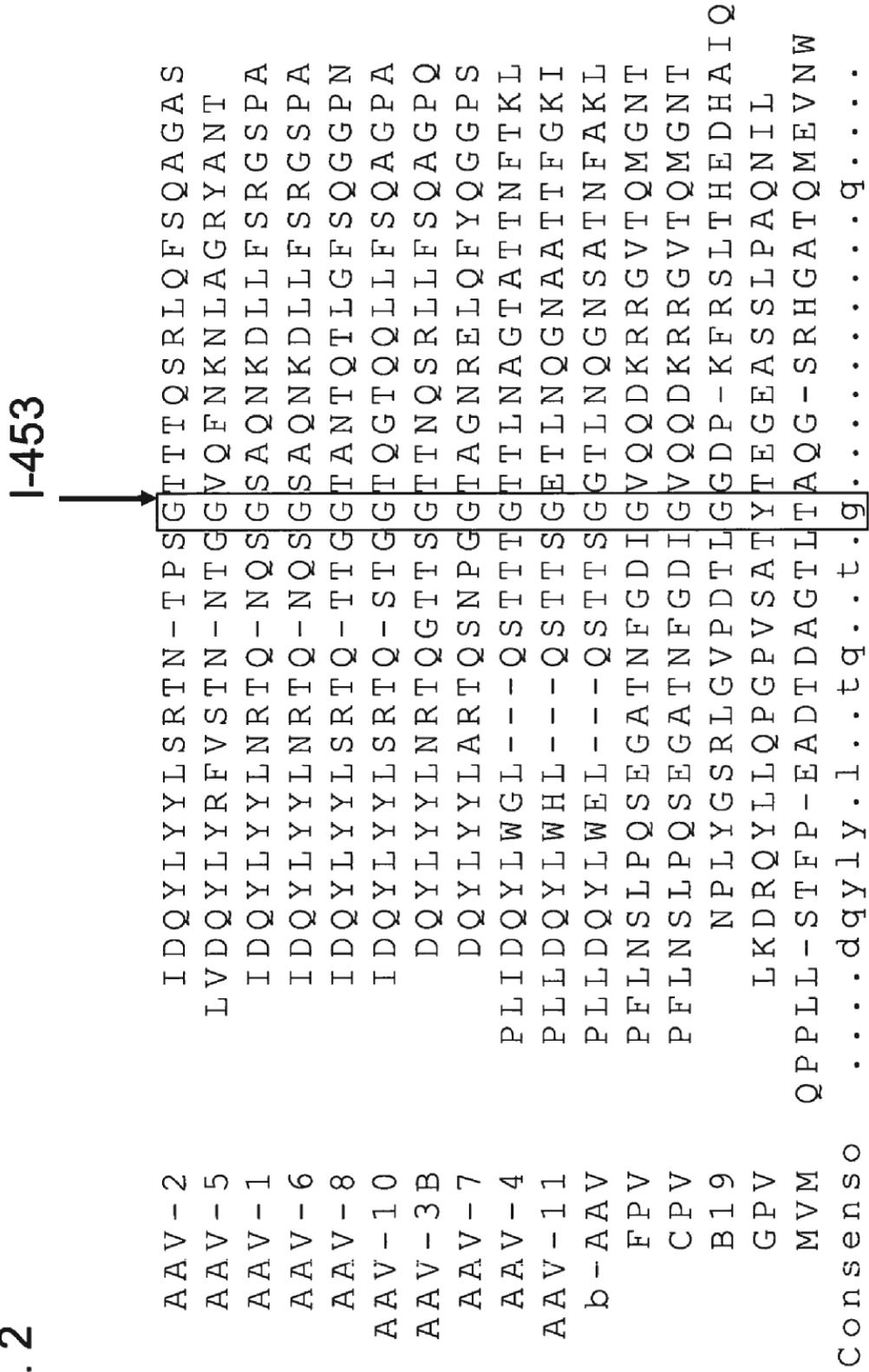


Fig. 3-1

	1				50
AAV-1	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWDDLKPGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPGY
AAV-6	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWDDLKPGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPGY
AAV-2	MAADGYLPDW	LEDTLSEGIR	QWWKLKPGPP	PPKPAERHKD	DSRGLVLPGY
AAV-3B	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWWALKPGVP	QPKANQQHQD	NRRGLVLPGY
AAV-7	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWDDLKPGAP	KPKANQQKQD	NGRGLVLPGY
AAV-8	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWWALKPGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPGY
AAV-10	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWDDLKPGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPGY
AAV-4	MTDGYLPDW	LEDNLSEGVV	EWVALQPGAP	KPKANQQHQD	NARGLVLPGY
AAV-11	MAADGYLPDW	LEDNLSEGIR	EWDDLKPGAP	KPKANQQKQD	DGRGLVLPGY
b-AAV	MSFVDHPPDW	LE-SIGDGFR	EFLGLEAGPP	KPKANQQKQD	NARGLVLPGY
AAV-5	MSFVDHPPDW	LEE-VGEGLR	EFLGLEAGPP	KPKPNQQHQD	QARGLVLPGY
	GPV				
	B19				
	MVM				
	FPV				
	CPV				
Consenso
	51				100
AAV-1	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LRYNHADAEF
AAV-6	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LRYNHADAEF
AAV-2	KYLGPFNGLD	KGEPVNEADA	AALEHDKAYD	RQLDSGDNPY	LKYNHADAEF
AAV-3B	KYLGPNGLD	KGEPVNEADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LKYNHADAEF
AAV-7	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LRYNHADAEF
AAV-8	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLQAGDNPY	LRYNHADAEF
AAV-10	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LRYNHADAEF
AAV-4	KYLGPNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LKYNHADAEF
AAV-11	KYLGPFNGLD	KGEPVNAADA	AALEHDKAYD	QQLKAGDNPY	LRYNHADAEF
b-AAV	KYLGPNGLD	KGDPVNFAD	VAREHDLISYQ	KQLEAGDNPY	LKYNHADAEF
AAV-5	NYLGPNGLD	RGEPVNRAD	VAREHDISYN	EQLEAGDNPY	LKYNHADAEF
	GPV				
	B19				
	MVM				
	FPV				
	CPV				
Consenso
	101				150
AAV-1	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEGAKTAP	G-KKRPVEQS
AAV-6	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPFG	LVEEGAKTAP	G-KKRPVEQS
AAV-2	QERLKEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEPVKTAP	G-KKRPVEHS
AAV-3B	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRILEPLG	LVEEAAKTAP	G-KKRPVDQS
AAV-7	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEGAKTAP	A-KKRPVEPS
AAV-8	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEGAKTAP	G-KKRPVEPS
AAV-10	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEAAKTAP	G-KKRPVEPS
AAV-4	QORLQGDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEQAGETAP	G-KKRPLIES
AAV-11	QERLQEDTSF	GGNLGRAVFQ	AKKRVLEPLG	LVEEGAKTAP	G-KKRPL-ES
b-AAV	QEKLASDTSF	GGNLGKAVFQ	AKKRILEPLG	LVETPKDTAP	AAKKRPLEQS
AAV-5	QEKLADDTSF	GGNLGKAVFQ	AKKRVLEPFG	LVEEGAKTAP	TGKR-----I
	GPV				
	B19				
	MVM				
	FPV				
	CPV				
Consenso

Fig. 3-2

	151				200
AAV-1	PQE-PDSSSG	IGKTGQQPAK	KRLNFGQTGD	SESVDPQPPL	GEPPATPAAV
AAV-6	PQE-PDSSSG	IGKTGQQPAK	KRLNFGQTGD	SESVDPQPPL	GEPPATPAAV
AAV-2	PVE-PDSSSG	TGKAGQQPAR	KRLNFGQTGD	ADSVDPQPPL	GQPPAAPSGL
AAV-3B	PQE-PDSSSG	VGKSGKQPAR	KRLNFGQTGD	SESVDPQPPL	GEPPAAPSTL
AAV-7	PQRSPDSSTG	IGKKGQQPAR	KRLNFGQTGD	SESVDPQPPL	GEPPAAPSSV
AAV-8	PQRSPDSSTG	IGKKGQQPAR	KRLNFGQTGD	SESVDPQPPL	GEPPAAPSGV
AAV-10	PQRSPDSSTG	IGKKGQQPAK	KRLNFGQTGE	SESVDPQPI	GEPPAGPSGL
AAV-4	PQQ-PDSSSTG	IGKKGKQPAK	KKLVF----E	DETGAGDGPP	-EGSTSGAMS
AAV-11	PQE-PDSSSG	IGKKGKQPAR	KRLNF----E	EDTGAGDGPP	-EGSDTSAMS
b-AAV	PQE-PDSSSG	VGKKGKQPAR	KRLNF----D	DEPGAGDGPP	PEGPSSGAMS
AAV-5	DDHFPKRKKA	RTEEDSKPST	SS-----D	AEAGPSGSQQ	LQIPAQPASS
GPV					
B19					
MVM				MSDGTSQPD	GNAVHSAAR
FPV				MSDGAVQPD	GGQP---AVR
CPV					
Consensop.
	201				250
AAV-1	-GPTTMASGG	GAPMADNNEG	ADGVGNASGN	WHCDSTWLGD	RVITTSTRTW
AAV-6	-GPTTMASGG	GAPMADNNEG	ADGVGNASGN	WHCDSTWLGD	RVITTSTRTW
AAV-2	-GTNTMATGS	GAPMADNNEG	ADGVGNSSGN	WHCDSTWMGD	RVITTSTRTW
AAV-3B	-GSNTMASGG	GAPMADNNEG	ADGVGNSSGN	WHCDSQWLGD	RVITTSTRTW
AAV-7	-GSGTVAAGG	GAPMADNNEG	ADGVGNASGN	WHCDSTWLGD	RVITTSTRTW
AAV-8	-GPNTMAAGG	GAPMADNNEG	ADGVGSSSGN	WHCDSTWLGD	RVITTSTRTW
AAV-10	-GSGTMAAGG	GAPMADNNEG	ADGVGSSSGN	WHCDSTWLGD	RVITTSTRTW
AAV-4	-DDSEMRAAA	GGAAVEGGQG	ADGVGNASGD	WHCDSTWSEG	HVTTTSTRTW
AAV-11	-SDIEMRAAP	GGNAVDAGQG	SDGVGNASGD	WHCDSTWSEG	KVTTTSTRTW
b-AAV	-TETEMRAAA	GGNGGDAGQG	AEGVGNASGD	WHCDSTWSES	HVTTTSTRTW
AAV-5	LGADTMSAGG	GGPLGDNNQG	ADGVGNASGD	WHCDSTWMGD	RVVTKSTRTW
GPV	MAEGG	GGAMGDSSGG	ADGVGNASGN	WHCDSQWMGN	TVITKTRTW
B19	MTSV	NSAEASTGAG	GGSNPVKSM	WSEGATFSAN	SVTCTFSRQF
MVM	VERAADGPGG	SGGGGSGG-G	GVGVSTGSYD	NQTHYRFLGD	GWVEITALAT
FPV	NERATGSGNG	SGGGGGGGSG	GVGISTGTFN	NQTEFKFLEN	GWVEITANSS
CPV			GVGISTGTFN	NQTEFKFLEN	GWVEITANSS
Consensogg	gg.....g.g	..Gvg..sg.	whcdstw.g.	.v.t..trtw
	251				300
AAV-1	ALPTYNNHLY	KQISSASTG-	ASND-----	---NHYFGYS	TPWGYFDFNR
AAV-6	ALPTYNNHLY	KQISSASTG-	ASND-----	---NHYFGYS	TPWGYFDFNR
AAV-2	ALPTYNNHLY	KQISSQS-G-	ASND-----	---NHYFGYS	TPWGYFDFNR
AAV-3B	ALPTYNNHLY	KQISSQS-G-	ASND-----	---NHYFGYS	TPWGYFDFNR
AAV-7	ALPTYNNHLY	KQISSETAG-	STND-----	---NTYFGYS	TPWGYFDFNR
AAV-8	ALPTYNNHLY	KQISNGTSGG	ATND-----	---NTYFGYS	TPWGYFDFNR
AAV-10	ALPTYNNHLY	KQISNGTSGG	STND-----	---NTYFGYS	TPWGYFDFNR
AAV-4	VLPTYNNHLY	KRLGE-----	SLQS-----	---NTYNGFS	TPWGYFDFNR
AAV-11	VLPTYNNHLY	LRLGT-----	TSSS-----	---NTYNGFS	TPWGYFDFNR
b-AAV	VLPTYNNHLY	LRLGS-----	SNAS-----	---DTFNGFS	TPWGYFDFNR
AAV-5	VLPSYNNHQY	REIKSGSVD-	GSNA-----	---NAYFGYS	TPWGYFDFNR
GPV	VLPSYNNHIY	KAITSGTS--	QDAN-----	---VQYAGYS	TPWGYFDFNR
B19	LIPYDPEHHY	KVFSPAASSC	HNASGKEAKV	CTISPIMGYS	TPWRYLDFNA
MVM	RLVHLNMPKS	ENYCRIRVHN	TTDTSVKGNM	AKDDAHEQIW	TPWSLVDANA
FPV	RLVHLNMPES	ENYKRVVVNN	MDKTAVKGNM	ALDDIHVEIV	TPWSLVDANA
CPV	RLVHLNMPES	ENYRRVVVNN	MDKTAVNGNM	ALDDIHAQIV	TPWSLVDANA
Consenso	.lp.ynnh.ygys	TPWgyfDfNr

Fig. 3-3

	301				350
AAV-1	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTTN	DGV-TT---I
AAV-6	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTTN	DGV-TT---I
AAV-2	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLNFKLF	NIQVKEVTQN	DGT-TT---I
AAV-3B	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLSFKLF	NIQVKEVTQN	DGT-TT---I
AAV-7	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLRFKLF	NIQVKEVTTN	DGV-TT---I
AAV-8	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLSFKLF	NIQVKEVTQN	EGT-KT---I
AAV-10	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGF	RPKRLSFKLF	NIQVKEVTQN	EGT-KT---I
AAV-4	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGM	RPKAMRVKIF	NIQVKEVTTS	NGE-TT---V
AAV-11	FHCHFSPRDW	QRLINNNWGL	RPKAMRVKIF	NIQVKEVTTS	NGE-TT---V
b-AAV	FHCHFSPRDW	QRLINNHWGL	RPKSMQVRI	NIQVKEVTTS	NGE-TT---V
AAV-5	FHSHWSPRDW	QRLINNYWGF	RPKSLRVKIF	NIQVKEVTQ	DST-TT---I
GPV	FHCHFSPRDW	QRLINNHWGI	RPKSLKFKIF	NVQVKEVTTQ	DQT-KT---I
B19	LNLFSPLEF	QHLIENYGS	APDALVTIS	EIAVKDVTDK	TGGGVQ---V
MVM	WGVWLQPSDW	QYICNTMSQL	NLVSLDQEIF	NVVLKTVTEQ	DSGGQAIKIY
FPV	WGVWFNPGDW	QLIVNTMSEL	HLVSFEQEIF	NVVLKTVSES	ATQPPT-KVY
CPV	WGVWFNPGDW	QLIVNTMSEL	HLVSFEQEIF	NVVLKTVSES	ATQPPT-KVY
Consenso	fh.hfsPr#w	Qrli#n.wg.	rp.sl...if	#!qvKeVt..t....
	351				400
AAV-1	ANNLTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGCL	PPFPADVEMI	PQYGYLTLN-
AAV-6	ANNLTSTVQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGCL	PPFPADVEMI	PQYGYLTLN-
AAV-2	ANNLTSTVQV	FTDSEYQLPY	VLGSAHQGCL	PPFPADVEMI	PQYGYLTLN-
AAV-3B	ANNLTSTVQV	FTDSEYQLPY	VLGSAHQGCL	PPFPADVEMV	PQYGYLTLN-
AAV-7	ANNLTSTIQV	FSDSEYQLPY	VLGSAHQGCL	PPFPADVEMI	PQYGYLTLN-
AAV-8	ANNLTSTIQV	FTDSEYQLPY	VLGSAHQGCL	PPFPADVEMI	PQYGYLTLN-
AAV-10	ANNLTSTIQV	FTDSEYQLPY	VLGSAHQGCL	PPFPADVEMI	PQYGYLTLN-
AAV-4	ANNLTSTVQI	FADSSYELPY	VMDAGQEGSL	PPFPNDVEMV	PQYGYCGLV-
AAV-11	ANNLTSTVQI	FADSSYELPY	VMDAGQEGSL	PPFPNDVEMV	PQYGYCGLV-
b-AAV	SNNLTSTVQI	FADSTYELPY	VMDAGQEGSL	PPFPNDVEMV	PQYGYCGLV-
AAV-5	ANNLTSTVQV	FTDDDYQLPY	VVGNGTEGCL	PAFPPQVFTL	PQYGYATLN-
GPV	ANNLTSTIQV	FTDDEHQLPY	VLGSATEGTM	PPFPSDVYAL	PQYGYCTMH-
B19	TDSTTGRLCM	LVDHEYKYPY	VLGQGDQDTLA	PELPIWVYFP	PQYAYLTVGD
MVM	NNDLTACMMV	AVDSNNILPY	TPAANSMETL	GFYPWKPTIA	SPYRYFQVD
FPV	NNDLTASLMV	ALDSNNTMPF	TPAAMRSETL	GFYPWKPTIP	TPWRYFQWD
CPV	NNDLTASLMV	ALDSNNTMPF	TPAAMRSETL	GFYPWKPTIP	TPWRYFQWD
Consenso	.#nlTst.qv	f.Ds.y.lP%	v.g....g.l	p.fP..v...	pqyGY.t...
	401				450
AAV-1	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-TF
AAV-6	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-TF
AAV-2	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-TF
AAV-3B	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-QF
AAV-7	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-EF
AAV-8	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-QF
AAV-10	-----NGS-	--QAVG----	-----RSSFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-EF
AAV-4	-----TGNT	SQQQTD----	-----RNAFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-EI
AAV-11	-----TGE-	NQNQTD----	-----RNAFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-EM
b-AAV	-----TGS-	SQNQTD----	-----RNAFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-EM
AAV-5	-----RDN-	TENPTE----	-----RSSFF	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-EF
GPV	-----TNQN	GARFND----	-----RSFY	CLEYF-PSQM	LRTGNMF-EF
B19	VNTQGISGDS	KKLASE----	-----ESAFY	VLEHS-SFQL	LGTGGTA-TM
MVM	RDLSTYENQ	EGTIEHNVGM	TPKGMNSQFF	TIENTQQITL	LRTGDEFATG
FPV	RTLIPSHTGT	SGTPTNVYHG	TDPD-DVQFY	TIENSVPVHL	LRTGDEFATG
CPV	RTLIPSHTGT	SGTPTNIYHG	TDPD-DVQFY	TIENSVPVHL	LRTGDEFATG
Consensors.F%	clEyf.psq\$	LrTGnnf.t.

Fig. 3-4

	451				500
AAV-1	SYTFEEDVPPFH	SSYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LYYLNRTQ-N	QSGSAQNKDL
AAV-6	SYTFEDVPPFH	SSYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LYYLNRTQ-N	QSGSAQNKDL
AAV-2	SYTFEDVPPFH	SSYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LYYLSRTN-T	PSGTTTQSRL
AAV-3B	SYTFEDVPPFH	SSYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LYYLNRTQGT	TSGTTNQSRL
AAV-7	SYSFEDVPPFH	SSYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LYYLARTQSN	PGGTAGNREL
AAV-8	TYTFEDVPPFH	SSYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LYYLSRTQTT	-GGTANTQTL
AAV-10	SYTFEDVPPFH	SSYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LYYLSRTQST	-GGTQGTQQL
AAV-4	TYSFEKVPFH	SMYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LWGLQSTTTG	TTLNAGTATT
AAV-11	AYNFEEKVPFH	SMYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LWHLQSTTSG	ETLNQGNAAAT
b-AAV	VYKFENVPFH	SMYAHSQSLD	RLMNPLIDQY	LWELQSTTSG	GTLNQGNASAT
AAV-5	TYNFEEVPPFH	SSFAPSQNLF	KLANPLVDQY	LYRFVSTN--	-----NTGGV
GPV	TFDFEEDVPPFH	SMFAHSQDL	RLMNPLVDQY	LWNFNEVD--	-----SSRNA
B19	SYKFPVPVPE	NLEGCSQHFY	EMYNPLYGSR	LGVPDTL---	-----GGDP
MVM	TYYFDTNPVK	LHTWQTNRQ	LGQPPLSTF	PEAD--TDAG	TL-TAQGSRH
FPV	TFFFDCCKPCR	LHTWQTNRA	LGLPFLNSL	PQSEGATNFG	DIGVQDKRR
CPV	TFFFDCCKPCR	LHTWQTNRA	LGLPFLNSL	PQSEGATNFG	DIGVQDKRR
Consenso	t%.Fe.vPfh	s..a.sq.l.	.l.nPl.dqy	l.....t...
	501				550
AAV-1	LFSRGS PAMG	SVQPKNWLP	PCYRQQRVSK	TKTDN-----	NNSNFTWTGA
AAV-6	LFSRGS PAMG	SVQPKNWLP	PCYRQQRVSK	TKTDN-----	NNSNFTWTGA
AAV-2	QFSQAGASDI	RDQSRNWLP	PCYRQQRVSK	TSADN-----	NNSEYSWTGA
AAV-3B	LFSQAGPQSM	SLQARNWLP	PCYRQQRVSK	TANDN-----	NNSNFPWTAA
AAV-7	QFYQGGPSTM	AEQAKNWLP	PCFRQQRVSK	TLDQN-----	NNSNFAWTGA
AAV-8	GFSQGGPNTM	ANQAKNWLP	PCYRQQRVST	TTGQN-----	NNSNFAWTAG
AAV-10	LFSQAGPANM	SAQAKNWLP	PCYRQQRVST	TLSQN-----	NNSNFAWTGA
AAV-4	NFTKLRPTNF	SNFKKNWLP	PSIKQQGFSK	TANQNYKIPA	TGSDSLIKYE
AAV-11	TFGKIRSGDF	AFYRKNWLP	PCVKQQREFSK	TASQNYKIPA	SGGNALLKYD
b-AAV	NFAKLTKTNF	SGYRKNWLP	PMMKQQREFSK	TASQNYKIPQ	GRNNSLLHYE
AAV-5	QFNKNLAGRY	ANTYKNWFP	PMGRTQGWNL	GSGVN-----	RASVSAFATT
GPV	QFKKAVKGAY	GTMGRNWLP	PKFLDQVRVA	YTGGT---DN	YANWNIWSNG
B19	QFRSLTHEDH	AIQPQNFMP	PLVNSVSTKE	GDSFN-----	TGAGKALTGL
MVM	GATQM-EVNW	VSEAIRTRPA	QVGFCQPHND	FEASR-----	AGPFAAPKVP
FPV	GVTQMGNTDY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEAST-----	QGPFKTPIAA
CPV	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEAST-----	QGPFKTPIAA
Consenso	.f.....nw.Pg	p.....q....n.....	.g.....
	551				600
AAV-1	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEDKFF	PMSGVMI FGK	ESAGASNTAL
AAV-6	SKYNLNGRES	IINPGTAMAS	HKD-DEDKFF	PMSGVMI FGK	ESAGASNTAL
AAV-2	TKYHLNGRDS	LVNPGPAMAS	HKD-DEEKFF	PQSGVLI FGK	QGSEKTNVDI
AAV-3B	SKYHLNGRDS	LVNPGPAMAS	HKD-DEEKFF	PMHGNI LFGK	EGTTASNAEL
AAV-7	TKYHLNGRNS	LVNPGVAMAT	HKD-DEDRFF	PSSGVLI FGK	TGAT-NKTTL
AAV-8	TKYHLNGRNS	LANPGIAMAT	HKD-DEERFF	PSNGILI FGK	QNAARDNADY
AAV-10	TKYHLNGRDS	LVNPGVAMAT	HKD-DEERFF	PSSGVLMFGK	QGAGRDNVDY
AAV-4	THSTLDGRWS	ALTPGPPMAT	AGP-ADSKF-	SNSQLI FAGP	KQNGNTATVP
AAV-11	THYTLNRRWS	NIAPGPPMAT	AGP-SDGDF-	SNAQLI FPGP	SVTGNTTTSA
b-AAV	TRTTLDGRWS	NFAPGTAMAT	AAN-DATDF-	SOAQLI FAGP	NITGNTTTDA
AAV-5	NRMELEGASY	QVPPQPNGMT	NNL-QGSNTY	ALENTMI FNS	QPANPGTTAT
GPV	NKVNLIKDRQY	LLQPQPVSAT	YTE-GEASSL	PAQNILGIAK	DPYRSGSTTA
B19	STGTSQNTRI	SLRPGPVSQP	YHHWDTDKYV	TGINAISHGQ	TTYGNAEDKE
MVM	ADVTQGM DRE	--ANGSVRYS	YGKQHG ENWA	AHGPAPERYT	WDET NFGSGR
FPV	GRGGAQTDEN	QAADGDPRYA	FGRQH GQKTT	TTGETPERFT	YI-AHQDTGR
CPV	GRGGAQTDEN	QAADGNPRYA	FGRQH GQKTT	TTGETPERFT	YI-AHQDTGR
Consensol.....	...pGp....t..

Fig. 3-5

	601			I-587		650
AAV-1	---DNVMITD	EEEIKATNPV	ATERFGTVAV	NFQSSSTDP	A	TGDDVHAMGAL
AAV-6	---DNVMITD	EEEIKATNPV	ATERFGTVAV	NLQSSSTDP	A	TGDDVHVMGAL
AAV-2	---EKVMITD	EEEIRTTNPV	ATEQYGSVST	NLQRGNRQAA		TADVNTQGVV
AAV-3B	---DNVMITD	EEEIRTTNPV	ATEQYGTVAN	NLOSSNTAPT		TRTVNDQCAL
AAV-7	---ENVLMTN	EEEIRPTNPV	ATEEYGIVSS	NLQAAANTAAQ		TQVNNQCAL
AAV-8	---SDVMLTS	EEEIKTTNPV	ATEEYGIVAD	NLQQQNTAPQ		IGTVNSQCAL
AAV-10	---SSVMLTS	EEEIKTTNPV	ATEQYGVVAD	NLQQANTGPI		VGNVNSQCAL
AAV-4	---GTLIFTS	EEELAATNAT	DTDMWGNLPG	GDQSNLPT		VDRLTALGAV
AAV-11	---NNLLFTS	EEEIAATNPR	DTDMFGQIAD	NNQNTTAPI		TGNVTAMGVL
b-AAV	---NNLMFTS	EDELRAATNPR	DTDLFGLHAT	NQNAITVPT		VDDVDGQGVY
AAV-5	YLEGNMLITS	ESETQPVNRV	AYNVGGQMAT	NNQSSITAPA		TGTYNLQEIV
GPV	GI-SDIMVTE	EQEVAPTNGV	GWKPYGRTVT	NEQNTITAPT		SSDLDLVGLAL
B19	YQGGVGRFPN	EKE-----QL	KQLQGLNMHT	YFPNKCTQOY		TDQIE-RPLM
MVM	DTRDGFQISA	PLVV-----PP	PLNGILTAN	PIGTKNDIHF		SNVFNQSYGPL
FPV	YPEGDWIQNI	NFNL-----PV	TNDNVLLPTD	PIGGKIGINY		TNIFNTYGP
CPV	YPEGDWIQNI	NFNL-----PV	TNDNVLLPTD	PIGGKIGINY		TNIFNTYGP
Consensot.	e.e.....npvg....	. .q .tt . .		t....n..g.l

	651					700
AAV-1	PGMVWQDRDV	YLQGPWAKI	PHTDGHFHPS	-PLMGGFGLK		NPPPQILIKN
AAV-6	PGMVWQDRDV	YLQGPWAKI	PHTDGHFHPS	-PLMGGFGLK		HPPPQILIKN
AAV-2	PGMVWQDRDV	YLQGPWAKI	PHTDGHFHPS	-PLMGGFGLK		HPPPQILIKN
AAV-3B	PGMVWQDRDV	YLQGPWAKI	PHTDGHFHPS	-PLMGGFGLK		HPPPQIMIKN
AAV-7	PGMVWQNRDV	YLQGPWAKI	PHTDGNFHPS	-PLMGGFGLK		HPPPQILIKN
AAV-8	PGMVWQNRDV	YLQGPWAKI	PHTDGNFHPS	-PLMGGFGLK		HPPPQILIKN
AAV-10	PGMVWQNRDV	YLQGPWAKI	PHTDGNFHPS	-PLMGGFGLK		HPPPQILIKN
AAV-4	PGMVWQNRDI	YYQGPWAKI	PHTDGHFHPS	-PLIGGFGLK		HPPPQIFIKN
AAV-11	PGMVWQNRDI	YYQGPWAKI	PHADGHFHPS	-PLIGGFGLK		HPPPQIFIKN
b-AAV	PGMVWQDRDI	YYQGPWAKI	PHTDGHFHPS	-PLIGGFGLK		SPPPQIFIKN
AAV-5	PGSVWMERDV	YLQGPWAKI	PETGAHFHPS	-PAMGGFGLK		HPPPMMLIKN
GPV	PGMVWQNRDI	YLQGPWAKI	PKTDGKFHPS	-PNLGGFGLH		NPPPQVFIKN
B19	VGSVWNRAL	HYESQLWSKI	PNLDDSFKTQ	FAALGGWGLH		QPPPQIFLKI
MVM	TTFS-HPSPV	YPQGQIWDK-	-ELDLEHKPR	LHITAPFVCK		NNAPGQMLVR
FPV	TALN-NVPPV	YPNGQIWDK-	-EFDTDLKPR	LHINAPFVCK		NNCPGQLFVK
CPV	TALN-NVPPV	YPNGQIWDK-	-EFDTDLKPR	LHVNAFVCK		NNCPGQLFVK
Consenso	pg.vw..rdv	y.#gpiwaKi	p..D..fhps	.p..ggfglk		.ppPq..ikn

	701					750
AAV-1	TPVPANPPAE	FSATKFASFI	TQYSTGQVSV	EIEWEL-QKE		NSKRWNPEVQ
AAV-6	TPVPANPPAE	FSATKFASFI	TQYSTGQVSV	EIEWEL-QKE		NSKRWNPEVQ
AAV-2	TPVPANPSTT	FSAAKFASFI	TQYSTGQVSV	EIEWEL-QKE		NSKRWNPEIQ
AAV-3B	TPVPANPPTT	FSPAKFASFI	TQYSTGQVSV	EIEWEL-QKE		NSKRWNPEIQ
AAV-7	TPVPANPPEV	FTPAKFASFI	TQYSTGQVSV	EIEWEL-QKE		NSKRWNPEIQ
AAV-8	TPVPADPPTT	FNQSKLNSFI	TQYSTGQVSV	EIEWEL-QKE		NSKRWNPEIQ
AAV-10	TPVPADPPTT	FSQAKLASFI	TQYSTGQVSV	EIEWEL-QKE		NSKRWNPEIQ
AAV-4	TPVPANPATT	FSSTPVNSFI	TQYSTGQVSV	QIDWEI-QKE		RSKRWNPEVQ
AAV-11	TPVPANPATT	FTAARVDSFI	TQYSTGQVAV	QIEWEI-EKE		RSKRWNPEVQ
b-AAV	TPVPANPATT	FSPARINSFI	TQYSTGQVAV	KIEWEI-QKE		RSKRWNPEVQ
AAV-5	TPVPGN-ITS	FSDVPVSSFI	TQYSTGQVTV	EMEWEL-KKE		NSKRWNPEIQ
GPV	TPVPADPPVE	YVHQWNSYI	TQYSTGQCTV	EMVWEL-RKE		NSKRWNPEIQ
B19	--LPQSGPIG	GIKSMGTTTL	VQYAVGIMTV	TMTFKLGRK		ATGRWNPPQG
MVM	LGNLTDQYD	PNG-ATLSRI	VTYGTFFWKG	KLTMRA-KLR		ANTTWNPIVQ
FPV	VAPNLTNQYD	PDASANMSRI	VTYSDFWFKG	KLVFKA-KLR		ASHTWNPIQQ
CPV	VAPNLTNQYD	PDASANMSRI	VTYSDFWFKG	KLVFKA-KLR		ASHTWNPIQQ
Consenso	tpvp.....s.i	tqYstgq..v	...wel..ke		.skrWNPe.q

Fig. 3-6

	751				799
AAV-1	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-6	YTSNYAKSAN	V---DFTVDN	NGLYTEPRPI	GTRYLTRPL	
AAV-2	YTSNYNKS VN	V---DFTVDT	NGVYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV-3B	YTSNYNKS VN	V---DFTVDT	NGVYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV-7	YTSNFEKQTG	V---DFAVDS	QGVYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV-8	YTSNYYKSTS	V---DFAVNT	EGVYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV-10	YTSNYYKSTN	V---DFAVNT	EGTYSEPRPI	GTRYLTRNL	
AAV-4	FTSNYGQQNS	L---LWAPDA	AGKYTEPRAI	GTRYLTHHL	
AAV-11	FTSNYGNQSS	M---LWAPDT	TGKYTEPRVI	GSRYLTNHL	
b-AAV	FTSNYGAQDS	L---LWAPDN	AGAYKEPRAI	GSRYLTNHL	
AAV-5	YTNNYNDPQF	V---DFAPDS	TGEYRTTRPI	GTRYLTRPL	
GPV	FTSNFESNRTS	I---MFAPNE	TGGYVEDRLI	GTRYLTQNL	
B19	VYPPHAAGHL	P---YVLYDP	TATDAKQHHR	HGYEKPEELW	TAKSRVHPL
MVM	VSVEDNGNSY	MSVTKWLPTA	TGN-MQSVPL	ITRPVARNTY	
FPV	MSINVDNQF-	----NYVPNN	IGA-MKIVYE	KSQLAPRKLY	
CPV	MSINVDNQF-	----NYVPSN	IGG-MKIVYE	KSQLAPRKLY	
Consenso	.t.n.....pd.	tg.y...r.i	gtryltr.l.

Fig. 4

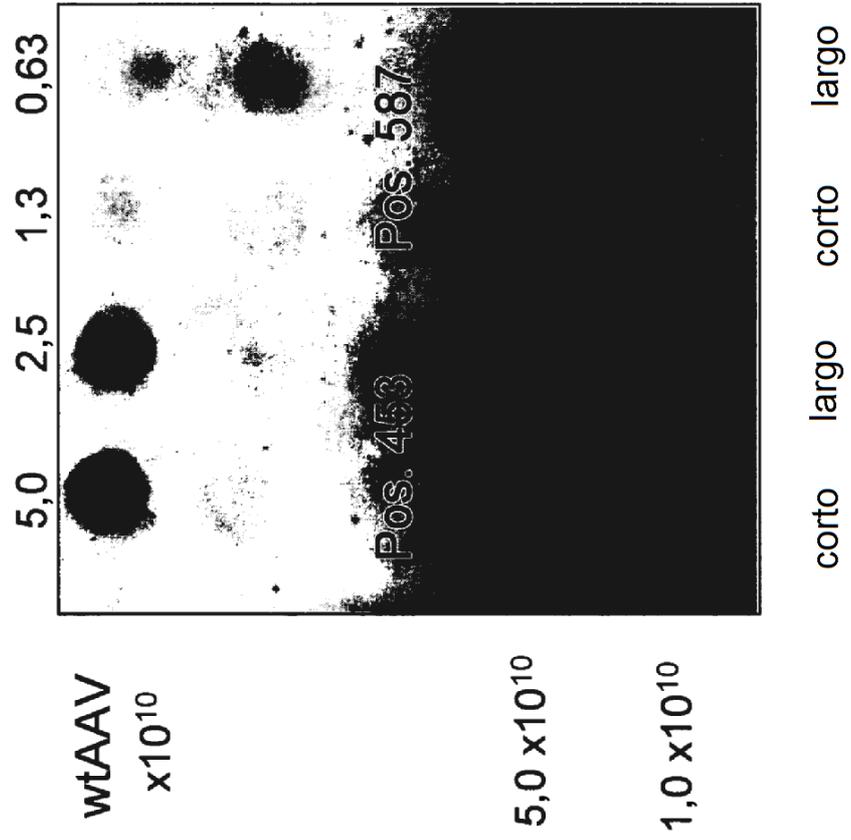
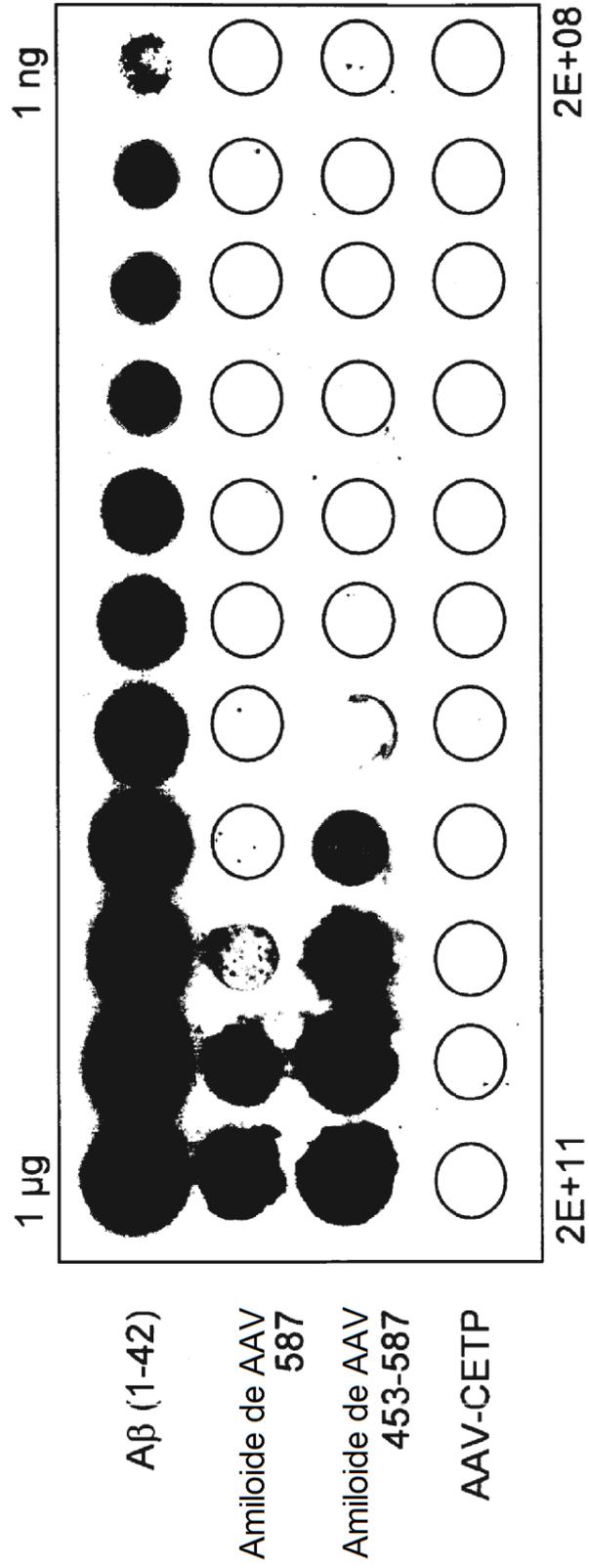


Fig. 5



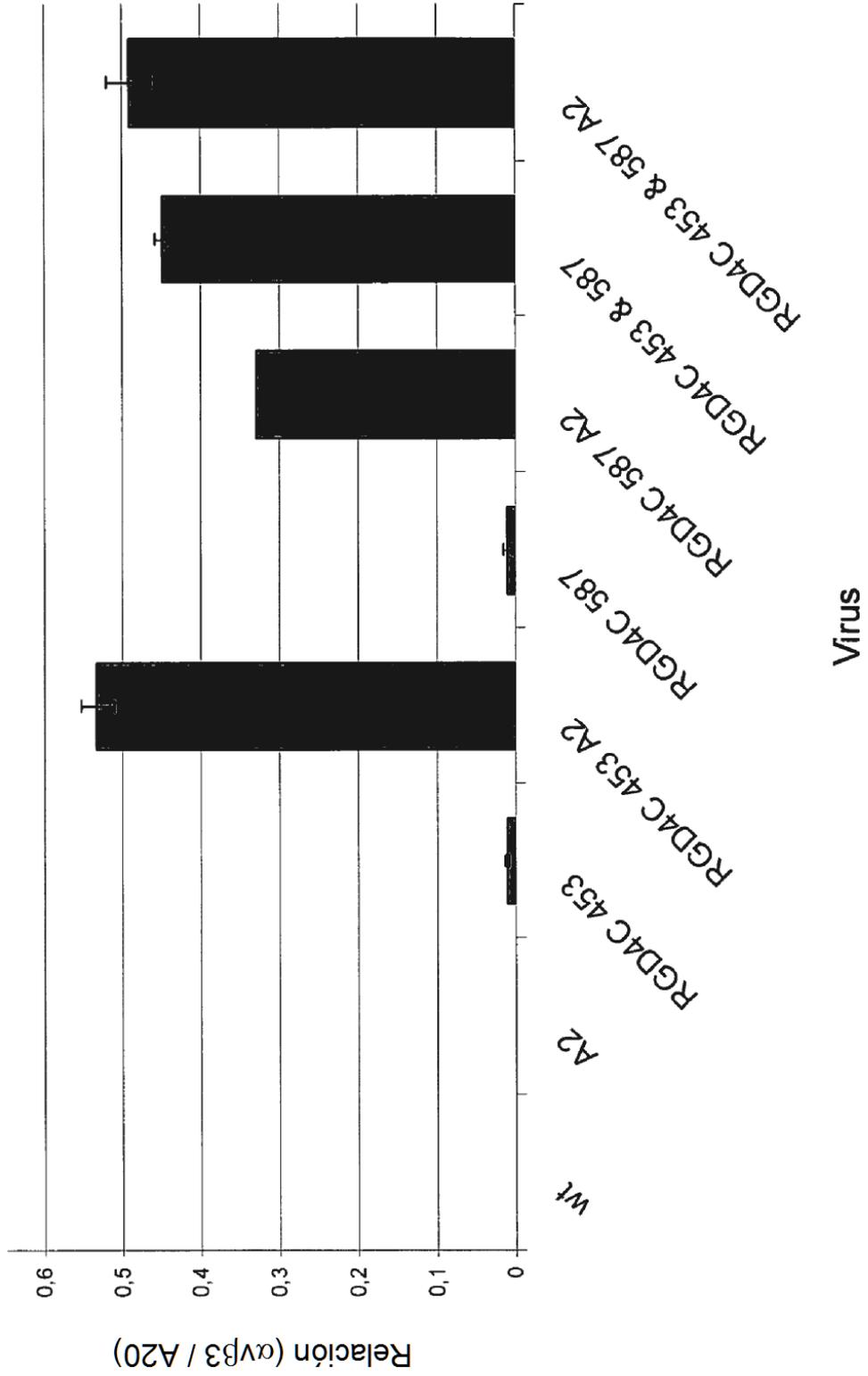


Fig. 6

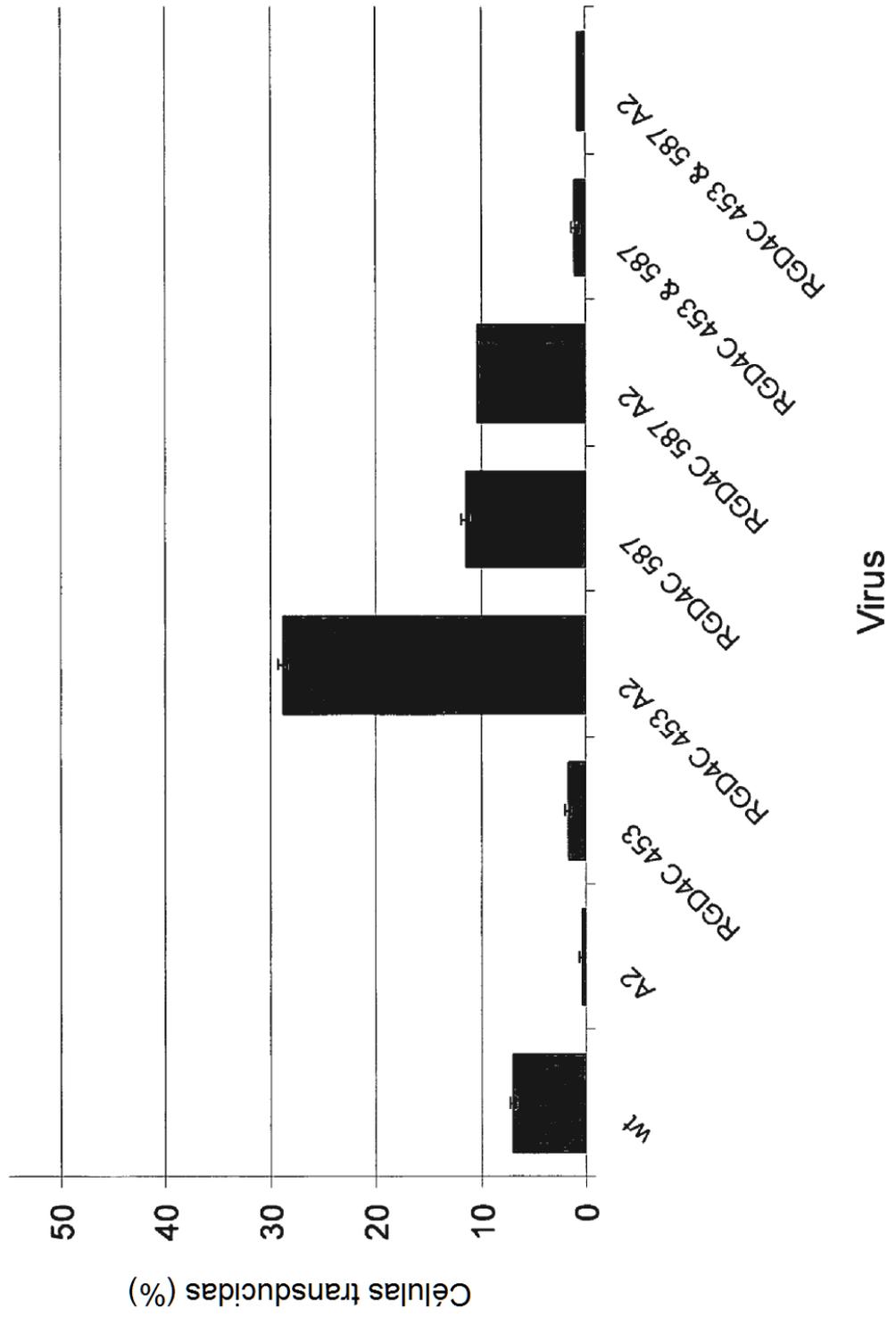


Fig. 7

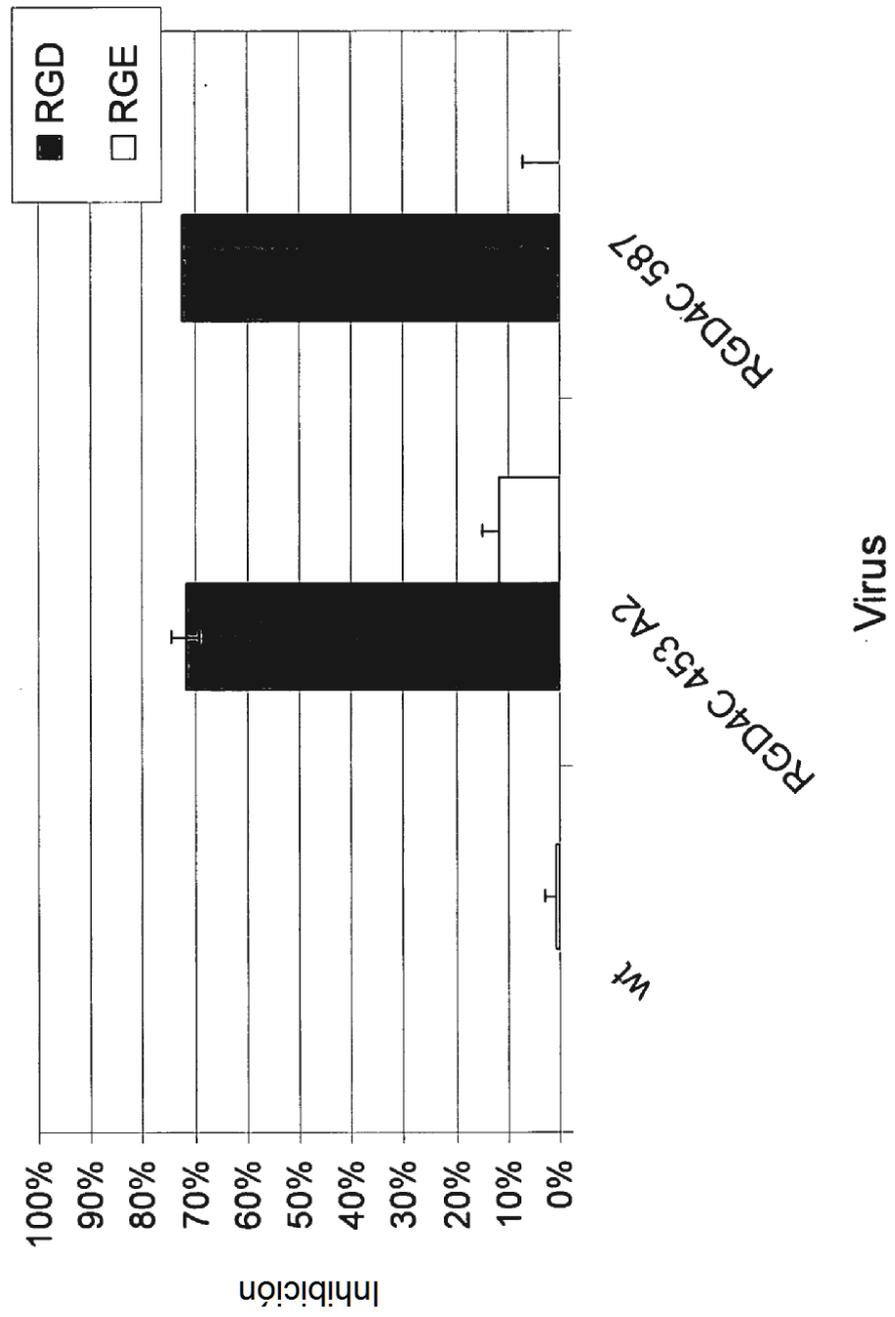


Fig. 8

Fig. 9

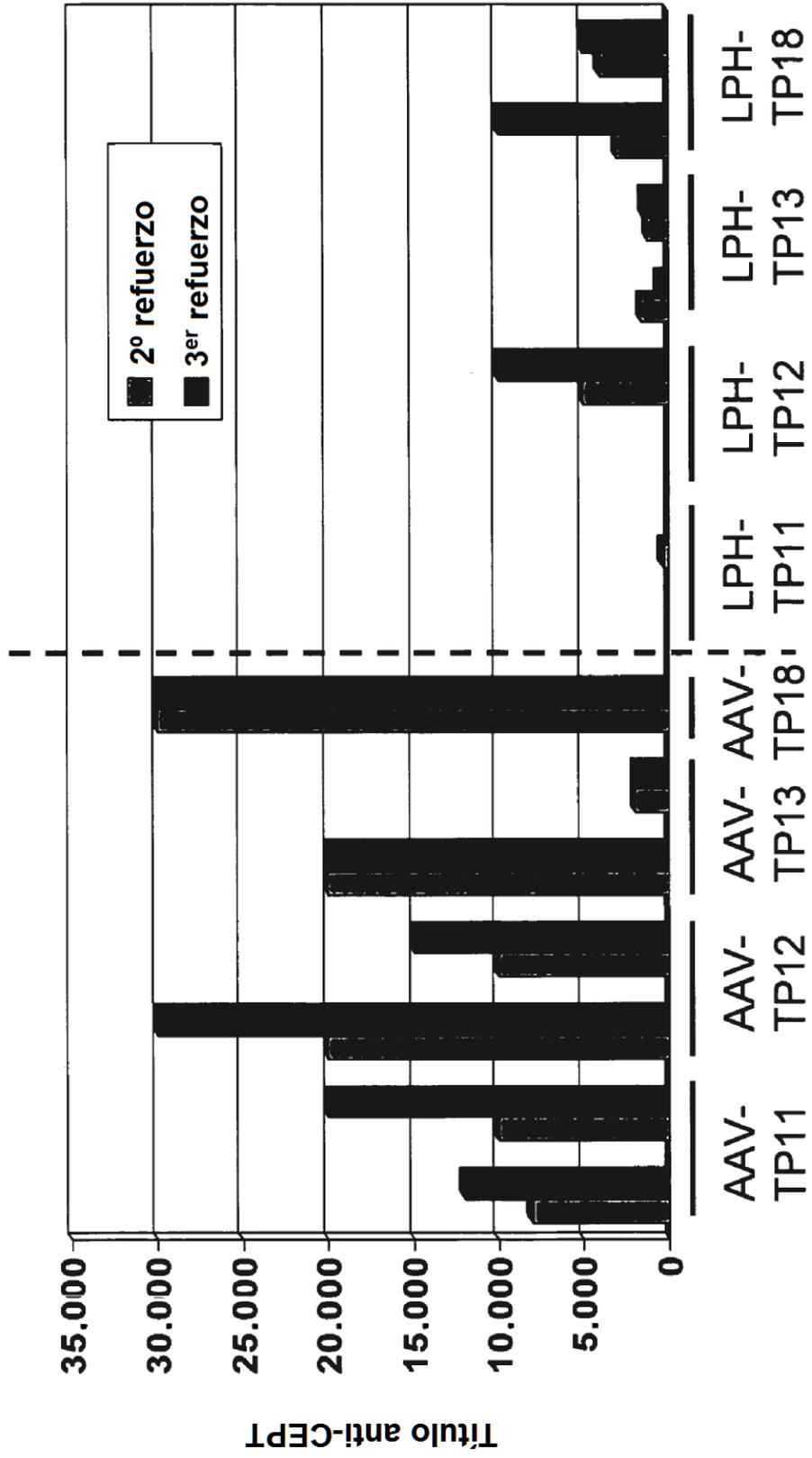


Fig. 10

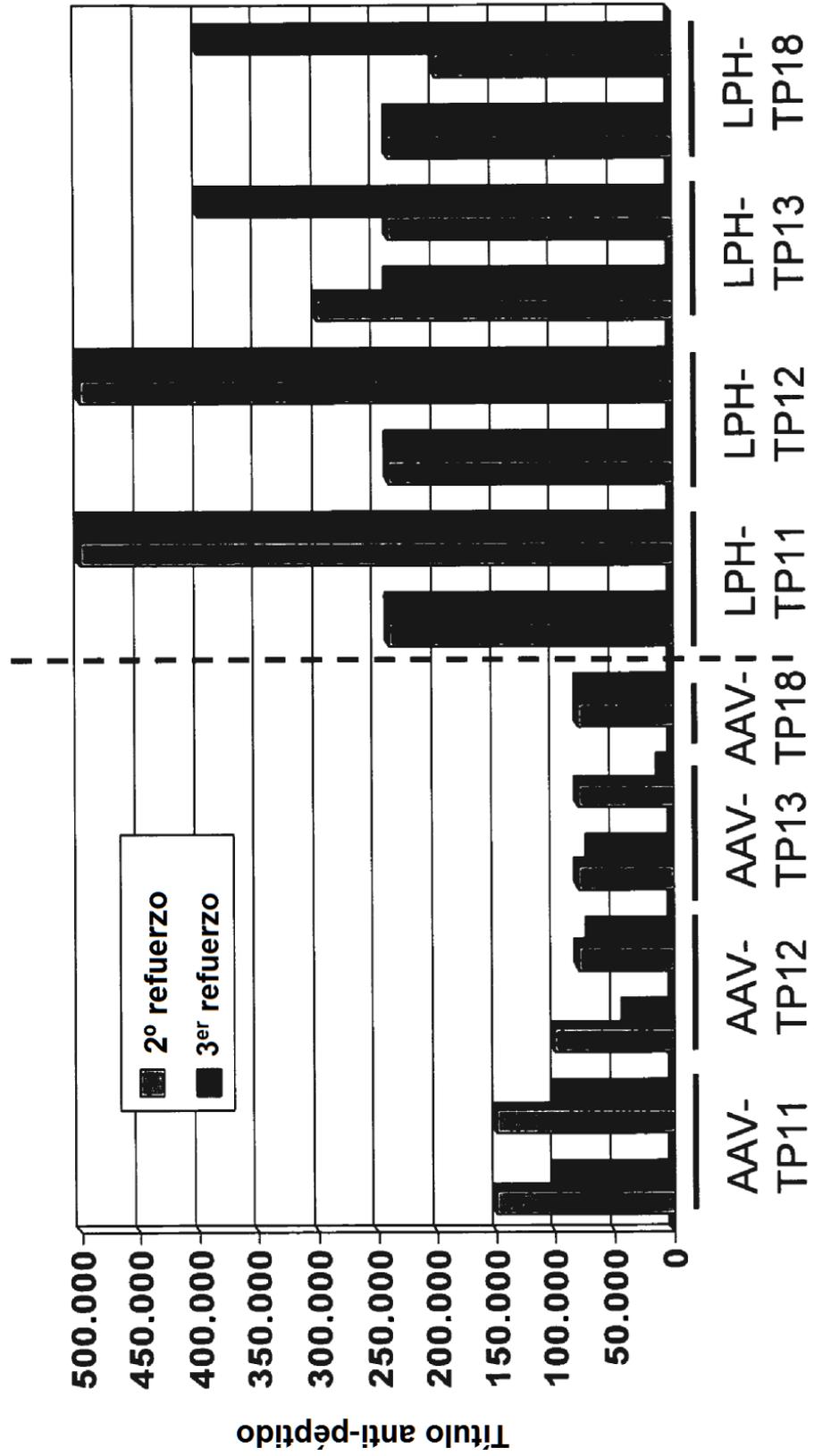


Fig. 11

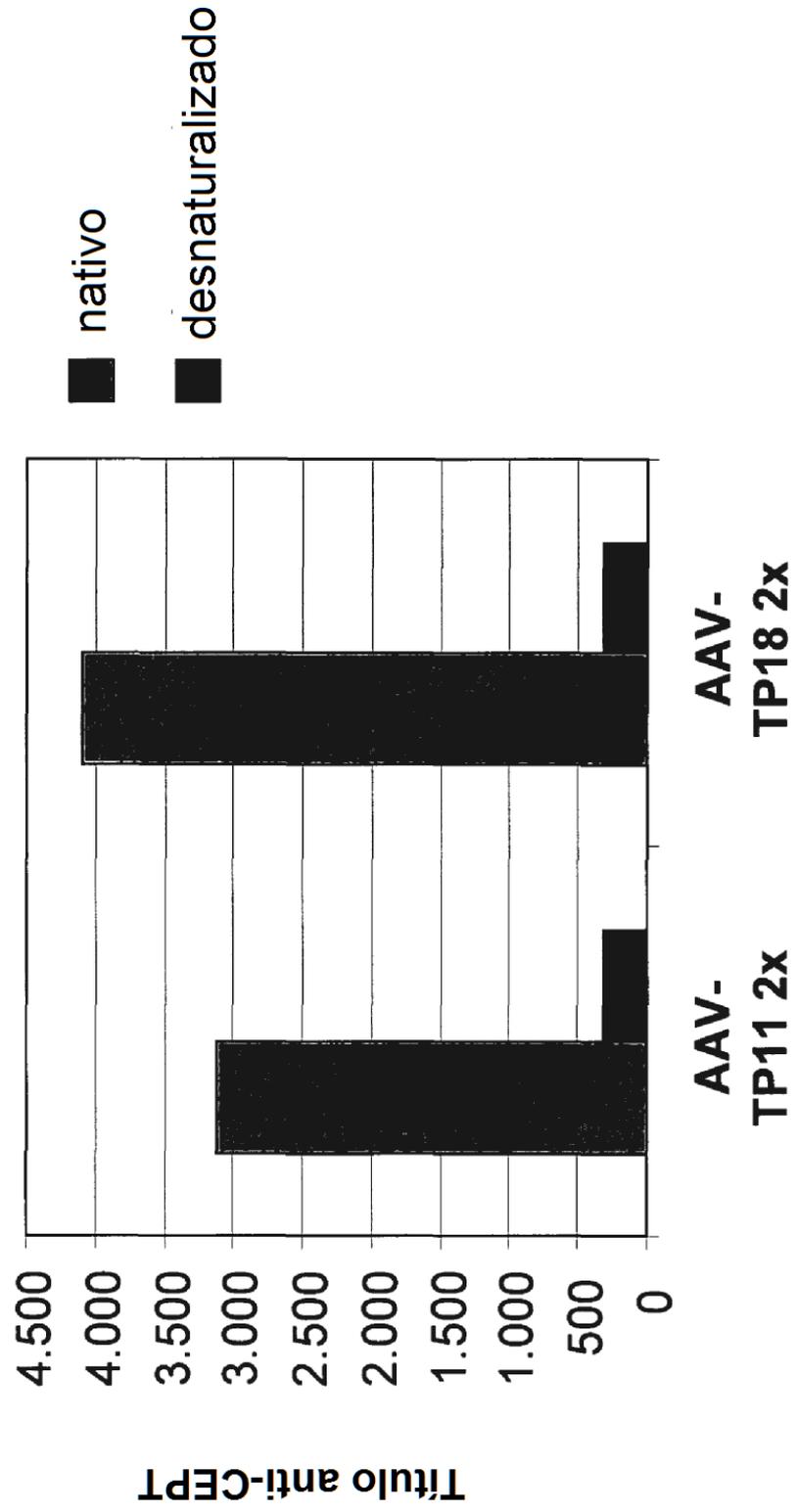


Fig. 12

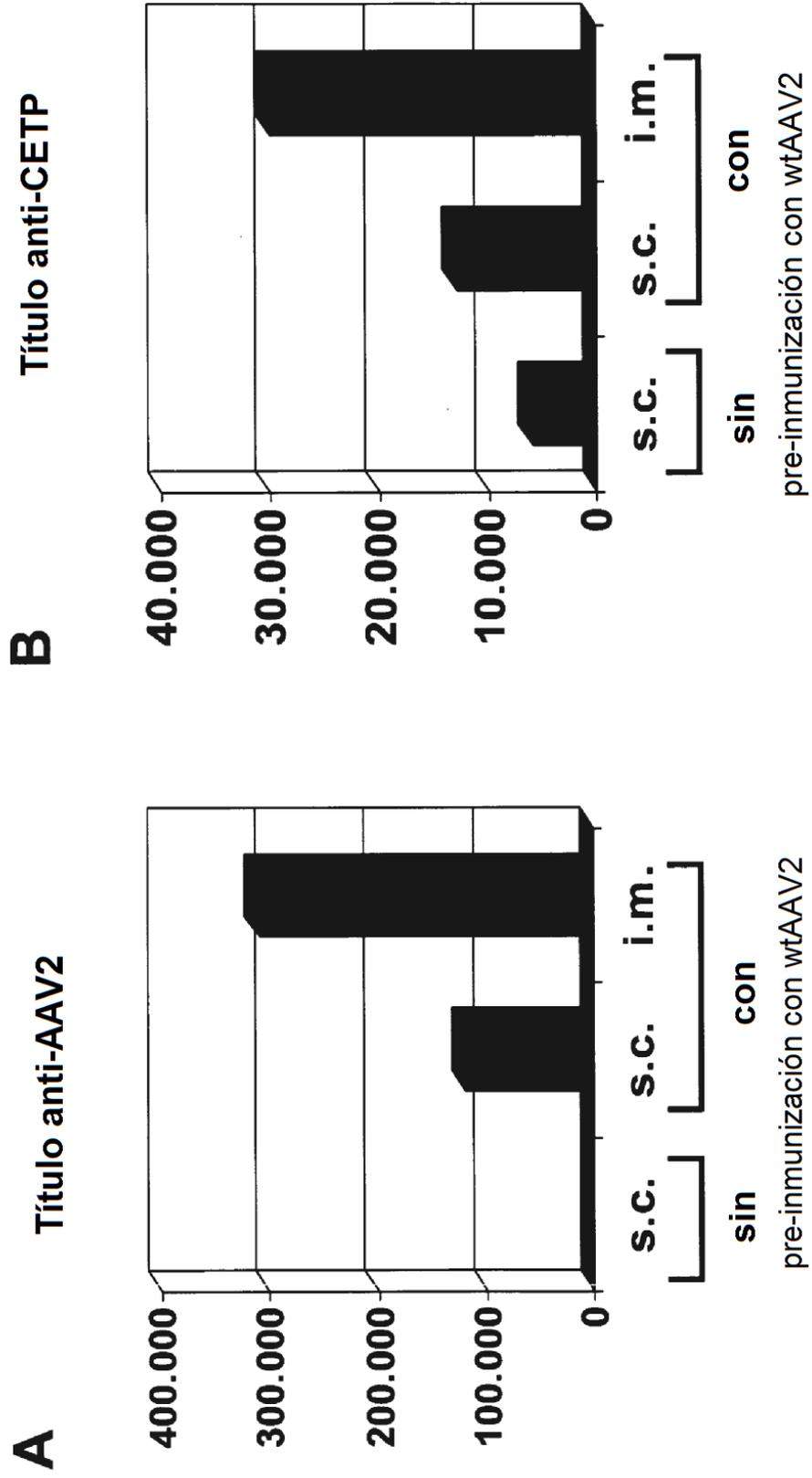


Fig. 13

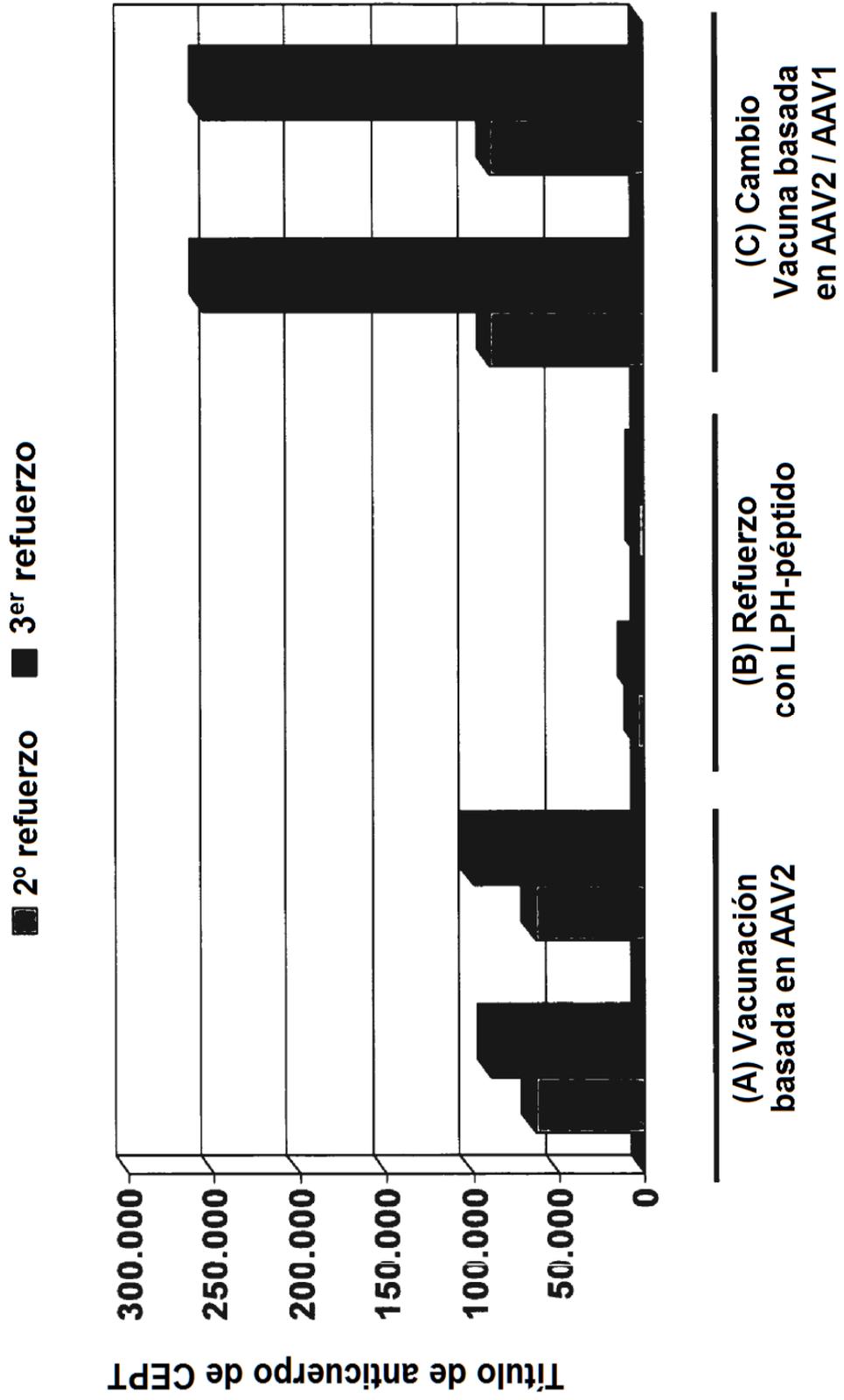


Fig. 14

