

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 305**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2011 PCT/US2011/033616**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11133890**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2011 E 11772784 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2561073**

54 Título: **Vectores de AAV que se dirigen al SNC y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

23.04.2010 US 327627 P

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

13.03.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)
225 Franklin Street
Boston, MA 02110, US**

72 Inventor/es:

**GAO, GUANGPING;
ZHANG, HONGWEI;
WANG, HONGYAN y
XU, ZUOSHANG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 605 305 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores de AAV que se dirigen al SNC y métodos de uso de los mismos

La invención en algunos aspectos se refiere a virus recombinantes adeno-asociados útiles para dirigir transgenes a tejido del SNC, y composiciones que comprenden los mismos, y métodos de uso de los mismos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha investigado terapia génica para la administración de genes terapéuticos a las células del SNC para el tratamiento de diversas enfermedades del SNC, por ejemplo, enfermedad de Canavan, ELA, enfermedad de Parkinson (EP), etc. En algunos casos limitados, se han observado beneficios terapéuticos usando ciertos virus, por ejemplo, adenovirus recombinante (rAd), lentivirus (LV) y virus adeno-asociado (AAV) para expresar una variedad de genes terapéuticos. Se ha usado AAV2 en ensayos clínicos para el tratamiento de EP y amaurosis congénita de Leber (una enfermedad ocular) y hallazgos preliminares sugieren mejoras sintomáticas sin toxicidad perceptible [2-4].

Sin embargo, la terapia génica basada en AAV para tratar enfermedad del SNC todavía se enfrenta a un obstáculo importante. Muchas enfermedades del SNC, que incluyen, por ejemplo, ELA, afectan tanto a las neuronas motoras corticales como espinales que están distribuidas en un área muy amplia en el SNC. Ha sido frecuente el caso de que vectores virales inyectados en tejido del SNC transducen células solo en la proximidad del sitio de inyección, tienen una extensión muy limitada y generalmente no han afectado la esperanza de vida en modelos animales de enfermedad del SNC [véase, por ejemplo, Ref. 5]. Sin embargo, se ha probado una variedad de otros métodos de administración viral. Un ejemplo implica inyectar las partículas virales en músculo esquelético y dejar que las terminaciones nerviosas internalicen el genoma viral, que entonces se transporta de nuevo de forma retrógrada a las neuronas motoras espinales. Este enfoque ha mostrado algunos resultados positivos en ciertos modelos de ratón [68]. Sin embargo, aplicar este método en mamíferos más grandes, como seres humanos adultos, sería poco práctico. En general, la eficiencia de transducción observada con la inyección en músculo es relativamente baja. Algunos investigadores han intentado mejorar esta eficiencia modificando proteínas de la cápside viral con los dominios de unión a nervio de la toxina tetánica o toxina botulínica. Estos esfuerzos no han sido fructíferos debido a diversas dificultades técnicas. Otro problema con la inyección en músculo en mamíferos más grandes es una necesidad de dosis grandes, que es técnicamente exigente, caro y conlleva un alto riesgo de efectos adversos, que varían de reacción inmunitaria a transducción de células no intencionadas (por ejemplo, células germinativas).

Otro método que se ha evaluado para administrar transgenes en neuronas motoras es inyectar el virus en nervios grandes, que maximiza la exposición del virus a axones motores, permitiendo que las neuronas motoras internalicen el genoma viral y lo transporten de nuevo de forma retrógrada al cuerpo de la célula. Se ha demostrado que este método es más eficiente en la transducción de neuronas motoras que la inyección en músculo [9]. Sin embargo, implementar un método tal como este en mamíferos más grande sería exigente.

Sondhi (2006) Molec Ther. 15 pp 481-491 utilizaron un AAV rh. 10 derivado de macaco para administrar genes a un ratón transgénico que presentaba lipofuscinosis ceroides neuronal infantil tardía (LINCL). Beutler (2009) Gene Ther. 16 pp 461-469 revisaron el uso de AAV para el tratamiento de dolor y en particular dolor neuropático crónico. El documento WO 2007/127264 describe la producción y recogida de AAV sin la necesidad de lisis de la célula. Tenenbaum (2004) J. Gene Medicine 6 ppS212-S222 revisa el uso de administración génica mediada por AAV al SNC.

40 SUMARIO

Los aspectos de la presente divulgación se basan en el descubrimiento de AAVs recombinantes que logran una amplia distribución en todo el tejido del SNC de un sujeto. En algunos casos, los rAAVs se extienden en todo el tejido del SNC tras la administración directa en el líquido cefalorraquídeo (LCR), por ejemplo, por inyección intratecal y/o intracerebral. En otros casos, los rAAVs cruzan la barrera hematoencefálica y logran una distribución en todo el tejido del SNC de un sujeto tras la administración intravenosa. La divulgación puede referirse a rAAVs que tienen distintas capacidades de direccionamiento a tejido del sistema nervioso central (por ejemplo, tropismos de tejido del SNC), que logran transferencia génica estable y no tóxica a altas eficiencias. Se desvelan en el presente documento métodos que implican la co-administración mediante inyección intratecal e intracerebral (por ejemplo, intraventricular) de rAAVs. Por ejemplo, se ha descubierto que los rAAVs que tienen una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 logran una amplia distribución tras la inyección intratecal en todo el SNC, y así, son particularmente útiles para trastornos asociados al SNC tales como, por ejemplo, ELA. También se desvelan en el presente documento métodos para tratar la enfermedad de Canavan.

Se desvelan en el presente documento métodos de administración de un transgén a tejido del SNC en un sujeto. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV por administración intratecal, en los que el rAAV comprende (i) una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un transgén. En algunos casos, los métodos comprenden además administrar una cantidad eficaz del rAAV por administración intracerebral. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV por

administración intratecal y por administración intracerebral, en los que el rAAV infecta células de tejido del SNC en el sujeto y comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un transgén. En ciertos casos, la administración intracerebral es una administración intraventricular. En un caso, la administración intraventricular es una administración en una región ventricular del prosencéfalo del sujeto. En ciertos casos, la administración intratecal es en la región lumbar del sujeto. En algunos casos, la dosis de rAAV para administración intratecal está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/sujeto a 10^{11} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intratecal está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/sujeto a 10^{12} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intratecal está en un intervalo de 10^{12} copias de genoma/sujeto a 10^{13} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intratecal está en un intervalo de 10^{13} copias de genoma/sujeto a 10^{14} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/sujeto a 10^{11} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/sujeto a 10^{12} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{12} copias de genoma/sujeto a 10^{13} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral está en un intervalo de 10^{13} copias de genoma/sujeto a 10^{14} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral o intratecal se formula para inyección de un volumen en un intervalo de 1 μ l a 10 μ l. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intracerebral o intratecal se formula para inyección de un volumen en un intervalo de 10 μ l a 100 μ l. En algunos casos, el rAAV para la administración intracerebral o intratecal se formula para inyección de un volumen en un intervalo de 100 μ l a 1 ml. En algunos casos, el rAAV para la administración intracerebral o intratecal se formula para inyección de un volumen de 1 ml o más. En algunos casos, el transgén codifica una proteína indicadora. En ciertos casos, la proteína indicadora es una proteína fluorescente, una enzima que cataliza una reacción dando un producto detectable, o un antígeno de superficie de la célula. En ciertos casos, la enzima es una luciferasa, una beta-glucuronidasa, un cloranfenicol acetiltransferasa, una aminoglucósido fosfotransferasa, una aminociclitol fosfotransferasa, o una puromicina N-acetil-transferasa. En algunos casos, el transgén es un gen asociado al SNC. En algunos casos, el gen asociado al SNC es la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC) o aspartoacilasa (ASPA). En algunos casos, el transgén codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 e inhibe la expresión de SOD1 en el sujeto. En algunos casos, el ARN inhibidor es un ARN antisentido, un ARNhp o un miARN. En algunos casos, el ARN inhibidor tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. Así, un ácido nucleico que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26 se desvela en el presente documento. En algunos casos, un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26 se desvela en el presente documento.

Se desvela en el presente documento un AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. También se desvela en el presente documento un AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. En algunos casos, el AAV recombinante comprende además una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9.

Se desvelan en el presente documento métodos de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto en necesidad del mismo. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto, en los que el rAAV comprende (i) una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 e inhibe la expresión de SOD1 en el sujeto. En algunos casos, el ARN inhibidor es un ARN antisentido, un ARNhp o un miARN. En algunos casos, el ARN inhibidor tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV al sujeto, en los que el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26 y en los que el rAAV infecta células de tejido del SNC en el sujeto.

Se desvelan en el presente documento métodos de administración de un transgén a un tejido del SNC en un sujeto que comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV por administración intravenosa, en los que el rAAV infecta células de tejido del SNC en el sujeto y comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un transgén. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/sujeto a 10^{11} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/sujeto a 10^{12} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{12} copias de genoma/sujeto a 10^{13} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{13} copias de genoma/sujeto a 10^{14} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{14} copias de genoma/sujeto a 10^{15} copias de genoma/sujeto. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma/kg a 10^{11} copias de genoma/kg. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{11} copias de genoma/kg a 10^{12} copias de genoma/kg. En

algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{12} copias/kg a 10^{13} copias de genoma/kg. En algunos casos, la dosis del rAAV para administración intravenosa está en un intervalo de 10^{13} copias de genoma/kg a 10^{14} copias de genoma/kg.

5 Se desvelan en el presente documento métodos de administración de un transgén a un tejido del SNC en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un rAAV que comprende (i) una proteína de la cápside que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 10 a 12 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un transgén. En algunos casos, los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un rAAV que comprende un transgén a un sujeto, en los que el rAAV comprende una proteína de la cápside de un serotipo de AAV, o variante de serotipo, seleccionada del grupo que
10 consiste en: AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 y CSp3, y en los que: (a) si el serotipo de AAV es AAV1, la vía de administración no es intracerebral, intramuscular, intranerviosa o intraventricular y/o el sujeto no es un ratón, rata o felino; (b) si el serotipo de AAV es AAV2, la vía de administración no es administración intracerebral o intraventricular y/o el sujeto no es una rata, ratón, felino, títí o macaco; (c) si el serotipo de AAV es AAV5, la vía de administración no es administración intracerebral o intraventricular y/o el sujeto no es una
15 rata, ratón o títí; (d) si el serotipo de AAV es AAV6, el sujeto no es un ratón; (e) si el serotipo de AAV es AAV7, la vía de administración no es administración intracerebral y/o el sujeto no es un ratón o macaco; (f) si el serotipo de AAV es AAV8, la vía de administración no es administración intracerebral, intraperitoneal o intravascular y/o el sujeto no es un ratón o macaco; (g) si el serotipo de AAV es AAV9, la vía de administración no es administración intracerebral o intravascular y/o el sujeto no es una rata o ratón; y (h) si el serotipo de AAV es AAVrh.10, la vía de administración
20 no es administración intracerebral o intravascular y/o el sujeto no es una rata o ratón. En algunos casos, el serotipo de AAV, o variante de serotipo, está seleccionado de AAV1, AAV6, AAV7, rh.39, rh.43 y CSp3, y la vía de administración es administración intravascular. En algunos casos, el serotipo de AAV es AAV7 y la vía de administración es administración intravascular. En algunos casos, el tejido del SNC está seleccionado de corteza, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, tronco encefálico, médula espinal cervical, médula espinal torácica y
25 médula espinal lumbar. En algunos casos, el transgén codifica una proteína indicadora. En ciertos casos, la proteína indicadora es una proteína fluorescente, una enzima que cataliza una reacción dando un producto detectable, o un antígeno de superficie de la célula. En ciertos casos, la enzima es una luciferasa, una beta-glucuronidasa, una cloranfenicol acetiltransferasa, una aminoglucósido fosfotransferasa, una aminocitol fosfotransferasa, o una puromicina N-acetil-transferasa. En algunos casos, el transgén es un gen asociado al SNC. En ciertos casos, el gen asociado al SNC es la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC) o aspartoacilasa (ASPA). En algunos casos, el rAAV se administra por inyección intravenosa.

35 Se desvela en el presente documento un rAAV que comprende (i) una proteína de la cápside que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 10 a 12 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un gen asociado al SNC. En ciertos casos, el gen asociado al SNC es la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC) o aspartoacilasa (ASPA).
40 En algunos casos, el ARNm expresado del gen asociado al SNC comprende un sitio de unión de miARN de un miARN que se expresa preferencialmente en tejido no del SNC. En ciertos casos, el sitio de unión de miARN es un sitio de unión para miR-122. En ciertos casos, el sitio de unión de miARN es un sitio de unión para miR-1. En algunos casos, el ARNm expresado del gen asociado al SNC no comprende un sitio de unión de miARN de un miARN que se expresa preferencialmente en tejido del SNC. En algunos casos, el promotor es un promotor específico de tejido del SNC. En ciertos casos, el promotor es un promotor de un gen seleccionado de: núcleos neuronales (NeuN), proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), poliposis adenomatosa del colon (APC) y molécula 1 adaptadora de unión a calcio ionizado (Iba-1).

50 Se desvela en el presente documento una composición que comprende un rAAV que comprende (i) una proteína de la cápside que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 10 a 12 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un gen asociado al SNC. En ciertos casos, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se desvela en el presente documento un kit que comprende un recipiente que guarda la composición. En algunos casos, el recipiente es un vial o ampolla sellado. En algunos casos, el recipiente es una jeringa.

55 Se desvela en el presente documento una célula de mamífero aislada que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 10 a 12 y un rAAV vector que comprende un ácido nucleico que codifica un gen asociado a enfermedad del SNC. En algunos casos, la célula de mamífero aislada comprende además un vector de función auxiliar del AAV. En algunos casos, la célula de mamífero aislada comprende además un vector de función accesoria. En ciertos casos, el gen asociado al SNC es la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC) o aspartoacilasa (ASPA).
60

Se desvela en el presente documento un método de tratamiento de la enfermedad de Canavan en un sujeto en necesidad del mismo. En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto, en los que el rAAV comprende (i) una proteína de la cápside distintos de una proteína de la cápside de AAV serotipo 2 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica aspartoacilasa (ASPA). Cualquiera de los serotipos de rAAV desvelados en el presente documento puede usarse en los métodos de tratamiento de la enfermedad de Canavan. En algunos casos, el rAAV tiene una proteína de la cápside que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 8 o 9 o una variante de la misma. En algunos casos, la administración se realiza por vía intratecal o por vía intracerebral. En algunos casos, la administración se realiza por vía intravascular.

En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto por una vía distinta de administración intracerebral, en los que el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica aspartoacilasa (ASPA). En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto, en los que el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica aspartoacilasa (ASPA); y evaluar la función renal en el sujeto al menos una vez después de la administración. Puede usarse cualquier método adecuado conocido en la técnica para evaluar la función renal de un sujeto. La evaluación puede implicar, por ejemplo, un examen de sangre o los niveles de nitrógeno ureico en orina, un examen de sangre o los niveles de creatinina en orina, un examen de la tasa de eliminación de creatinina, un examen de la tasa de filtración glomerular, un examen de la fracción de filtración, un examen del flujo plasmático renal, un examen de ultrasonidos, un examen microscópico de una biopsia de tejido de riñón o cualquier otra prueba adecuada de la función renal. Debe apreciarse que en algunos casos una mejora en la función renal de un sujeto tras el tratamiento con una terapia génica mediada por rAAV es indicativa de eficacia de la terapia génica para tratar la enfermedad de Canavan.

En algunos casos, los métodos comprenden administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto, en los que el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica aspartoacilasa (ASPA); y evaluar la visión del sujeto al menos una vez después de la administración. Puede usarse cualquier método adecuado conocido en la técnica para evaluar la visión de un sujeto. La evaluación puede implicar, por ejemplo, un examen externo del ojo, un examen de la agudeza visual, un examen de la función de la pupila, un examen de la retina, un examen de la motilidad ocular, un examen de la tensión intraocular o un examen oftalmoscópico. La evaluación puede implicar una determinación referente a la capacidad de un sujeto para discriminar colores, objetos o formas o la capacidad de un sujeto para discernir colores, objetos o formas desde una distancia particular. Debe apreciarse que en algunos casos una mejora en la visión de un sujeto tras el tratamiento con una terapia génica mediada por rAAV es indicativa de eficacia de la terapia génica para tratar la enfermedad de Canavan.

En algunos casos, el ácido nucleico expresa un ARNm de aspartoacilasa (ASPA) que comprende uno o más sitio de unión de miARN para uno o más miARN que son más abundantes en uno o más tejidos no del SNC en comparación con tejido del SNC. Por consiguiente, en algunos casos, el ARNm es elegido como diana para la degradación por un miARN en uno o más tejidos no del SNC. En algunos casos, el uno o más tejidos no del SNC no es tejido de riñón o tejido de retina. En algunos casos, el uno o más miARN que son más abundantes en tejidos no del SNC en comparación con tejido del SNC son al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, o al menos diez veces más abundantes. Se conocen en la técnica miARN que son más abundantes en tejido no del SNC frente a tejido del SNC. Por ejemplo, un estudio desvela niveles de expresión de más de trescientos miARN humanos diferentes en 40 tejidos diferentes, que incluyen tejido del SNC, tejido de riñón (véase Liang Y, et al., Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. BMC Genomics. 2007 Jun 12;8:166). Así, en algunos casos, el experto podría seleccionar fácilmente (por ejemplo, basándose en datos tales como se desvelan en Liang et al.) un miARN adecuado que es más abundante en tejido no del SNC e incorporar un sitio de unión para ese miARN en el ARNm codificado.

Cada una de las limitaciones tratadas anteriormente puede englobar diversos casos. Se espera, por tanto, que cada una de las limitaciones de la invención que implican un elemento cualquiera o combinaciones de elementos pueda incluirse con cualquier otra. La presente divulgación no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención es capaz de ser puesta en práctica o ser llevada a cabo de diversas formas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa resultados cuantitativos de intensidades de EGFP de imágenes microscópicas de fluorescencia de un panel de secciones de tejidos del SNC de ratones neonatales infectados con diversos rAAVs que albergan vectores de expresión de EGFP. Se administraron ratones neonatales con los rAAVs por administración intravenosa (inyección en la vena temporal superficial).

La Figura 2 representa resultados cuantitativos de intensidades de EGFP de imágenes microscópicas de fluorescencia de un panel de secciones de tejidos del SNC de ratones adultos infectados con diversos rAAVs que

albergan vectores de expresión de EGFP. Se administraron ratones adultos con los rAAVs por administración intravenosa (inyección en la vena de la cola).

5 La Figura 3 representa la cuantificación de la expresión de EGFP en la médula espinal de ratones neonatales (regiones cervical, torácica y lumbar) 21 días después de la inyección IV (5 ratones por grupo). Se administraron ratones neonatales con los rAAVs por administración intravenosa (inyección en la vena temporal superficial).

La Figura 4A representa resultados que muestran que la inyección en LCR directa de AAVrh.10 que alberga un gen EGFP conduce a la expresión de EGFP en amplias áreas del SNC. Se muestran secciones de tejido, preparadas 60 días después de la inyección del virus, de tronco encefálico, médula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar. Los píxeles grises/negros se corresponden con la expresión de EGFP.

10 La Figura 4B representa resultados que muestran que la inyección en LCR directa de AAVrh.10 que alberga un gen EGFP conduce a la expresión de EGFP en astrocitos. Los píxeles grises/negros se corresponden con la expresión de EGFP.

15 La Figura 5A representa un vector rAAVrh.10 que expresa un microARN que se dirige a SOD1. La construcción emplea CAG (promotor de β -actina de pollo con un potenciador del CMV) para conducir la expresión de EGFP y miR-SOD1 que se localiza en un intrón en 3'-UTR. pA representa la señal de poliA. ITRs marcan las repeticiones invertidas del AAV.

La Figura 5B representa resultados de experimentos que prueban la potencia de silenciamiento de 9 construcciones de miARN diferentes, se encontró que miR-SOD1#5 era el silenciaba la expresión SOD1 más potentemente.

20 La Figura 5C representa resultados de experimentos en los que miR-SOD1#5 se encapsuló en AAVrh.10 y se usó para infectar células HEK293. Se extrajo proteína celular total 43 horas después de la infección y se transfirió para detectar SOD1. Scr representa miARN desordenado; Sod representa miR-SOD1#5; y C representa un control que expresa EGFP solo.

La Figura 5D representa un mapa de plásmido de pAAVscCB6 EGFPmir SOD5 (5243 pb) (SEQ ID NO: 21).

25 La Figura 6A representa resultados de estudios de transferencia génica en ratones mutantes para SOD1 (G93A) que muestran que el miARN de rAAV rh.10-SOD1 inactiva los niveles de SOD1 mutante en astrocitos. También se observó tinción en neuronas motoras.

La Figura 6B representa resultados de estudios de transferencia génica en ratones mutantes para SOD1 (G93A) que muestran que el ARNhp de rAAV rh.10-SOD1 aumenta la esperanza de vida, en comparación con un miARN desordenado de rAAV rh.10.

30 La Figura 7A representa la cuantificación de la expresión de EGFP en tejido de médula espinal cervical, torácica y lumbar en comparación con las esperanzas de vida de ratones individuales infectados con miARN de rAAV rh.10-SOD1; se administró rAAV rh.10-SOD1 directamente al LCR.

35 La Figura 7B representa la cuantificación de la expresión de EGFP en tejido de médula espinal cervical, torácica y lumbar en comparación con las esperanzas de vida de ratones individuales infectados con miARN desordenado de rAAV rh.10; se administró miARN desordenado de rAAV rh.10 directamente al LCR.

La Figura 8 representa análisis de microscopía de fluorescencia de ratones que han sido administrados con inyecciones intratecales de diversos AAVs. En este experimento, tanto AAV9 como AAVrh10 transducen células a lo largo de la longitud completa de la médula espinal después de una única inyección en el LCR en el espacio subaracnoideo lumbar.

40 La Figura 9 representa los efectos del tratamiento de AAV10-miR-SOD1. El tratamiento de AAV10-miR-SOD1 ralentiza la progresión de la enfermedad como se indica por la pérdida más lenta de peso corporal en ratones G93A tratados en comparación con de control.

45 La Figura 10 representa el análisis de microscopía de fluorescencia de ratones que han sido administrados con inyecciones intratecales de diversos AAVs. En este experimento, AAV9 y AAVrh10 pueden transducir células en amplias áreas del prosencéfalo después de una única inyección en el LCR en el tercer ventrículo.

La Figura 11 representa el análisis de microscopía de fluorescencia de secciones de tejidos de ratones inyectados con AAV9. Una única inyección de AAV9 y AAVrh10 en el tercer ventrículo puede transducir células en amplias áreas del prosencéfalo, que incluye corteza, hipocampo, estriado, tálamo, cerebelo y algunas células diseminadas en la médula espinal. También se observa el mismo patrón general en ratones inyectados con AAV10.

50 La Figura 12 representa una validación *in vitro* de sitios de unión de miARN artificiales para el silenciamiento de indicadores. Plásmidos que albergan el genoma rAAVCBnLacZ con o sin sitios de unión de miR-1 o miR-122 se transfectaron en células de hepatoma humano (HuH7) (a) que expresaban miR-122 o se cotransfectaron en células 293, junto con un plásmido que expresaba tanto pri-miR-122 (b) como pri-miR-1 (c) a relaciones molares de 1:3

(baja) o 1:10 (alta). 0X: ningún sitio de unión de miARN; 1X: un sitio de unión de miARN; 3X: tres sitios de unión de miARN. Las células se fijaron y se tiñeron histoquímicamente con X-gal 48 horas después de la transfección y se contaron las células azules. Se comparó el porcentaje de células positivas para nLacZ en cada transfección con la transfección del plásmido de control (prAAVCBnLacZ). CB, β -actina de pollo; miR, microARN; nLacZ, transgén indicador de β -galactosidasa; rAAV, virus recombinantes adeno-asociados.

La Figura 13 representa una evaluación *in vivo* del silenciamiento de transgén mediado por miARN endógeno en una transducción de rAAV9. (a-c) Se inyectaron ratones C588L/6 macho adultos por vía intravenosa con 5×10^{13} copias de genoma por kg (GC/kg) cada uno de rAAV9CBnLacZ (ningún sitio de unión), (a) rAAVCB9nLacZmiR-122BS (un sitio de unión de miR-122) y rAAV9C8nLacZ-(miR-122BS)₃ (tres sitios de unión de miR-122), (b) BS rAAV9CBnLacZ-miR-1 (un sitio de unión de miR-1) y rAAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃ (tres sitios de unión de miR-1), (c) rAAV9CBnLacZ-miR-1BS-miR-122BS (1X cada sitio de unión) y rAAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃-(miR-122BS)₃ (tres sitios de unión de miR-1 y tres de miR-122). Se sacrificaron los animales 4 semanas después de la administración del vector, y se recogieron tejidos apropiados para el crioseccionamiento y tinción histoquímica con X-gal. miR, microARN; nLacZ, gen indicador de β -galactosidasa; rAAV, virus recombinantes adeno-asociados, y (d) cuantificación de las actividades de β -galactosidasa en tejido de hígado de animales que recibieron vectores de rAAVnLacZ con y sin sitios de unión de miARN.

La Figura 14 representa un análisis de los niveles de expresión de miARN relacionado, ARNm, y proteína de genes diana de miARN endógeno en ratones transducidos con rAAV9CBnLacZ con o sin sitios de unión de miARN. Se preparó ARN o proteína celular total a partir de (a-c) hígado o (d) corazón. (a) Detección por transferencia Northern de miARN. ARN nuclear pequeño de U6 proporcionó el control de carga. (b) PCR cuantitativa de transcripción inversa que mide ARNm de ciclina G1. Los datos se presentan como niveles relativos de ARNm de *ciclina G1* normalizados a β -actina. (c,d) Análisis de transferencia Western de niveles de proteína de dianas endógenas de miR-122 y miR-1. Se analizó proteína celular preparada a partir de (c) hígado o (d) corazón para ciclina G1 y calmodulina. (e) Niveles de colesterol en suero. Se recogieron muestras de suero de ratones que recibieron rAAV9 con o sin sitios de unión de miARN después de 4 semanas y se midieron para colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL) y lipoproteína de baja densidad (LDL). miR, microARN; nLacZ, transgén indicador de β -galactosidasa; rAAV, virus recombinantes adeno-asociados.

La Figura 15 representa una caracterización molecular de ARNms de transgén con o sin sitios de unión de miARN. (a) Se presentan localizaciones de las sondas y cebadores, las secuencias de miR-122 maduro y su sitio de unión perfectamente complementario en el ARNm de transgén. (b) Se analizó ARN celular total de hígado tanto por PCR por transcripción inversa convencional (RT-PCR) usando cebadores que abarcan una región entre el extremo 3' de nLacZ y el extremo 5' de la señal de poli(A) (c) o por RT-PCR cuantitativa; los datos se presentan como niveles relativos de nLacZ de ARNm normalizado a β -actina. (d) Para el análisis de transferencia Northern de ARNm de nLacZ, 18S ARN sirvió de control de carga, y las transferencias se hibridaron con tanto un ADN de transgén (e) como sonda de ARN. (f) Además, se analizó por 5' RACE el ARNm que llevaba poli(A) del hígado de un animal que recibió rAAV que contenía tres sitios de unión de miR-1 y tres de miR-122; el producto de PCR se resolvió en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. miR, microARN; nLacZ, gen indicador de β -galactosidasa; rAAV, virus recombinantes adeno-asociados.

La Figura 16 representa un alineamiento de secuencias que abarcan los sitios de unión de miARN y regiones de señales de poli(A) recuperadas por 5 RACE. Se aisló ARNm que contenía poli(A) de (a) hígado y (b) corazón de un animal inyectado con rAAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃-(miR-122BS)₃. Se secuenciaron veintinueve clones derivados de hígado y veintidós derivados de corazón. Los supuestos sitios de escisión en cada clon se identifican por flechas; se informan las frecuencias de escisión específica de sitio dirigida por miARN para cada sitio de unión de miARN; los triángulos indican a las posiciones de los sitios de escisión dirigidos a miARN esperados (a,b). miARN, microARN, nLacZ, gen indicador de β -galactosidasa; rAAV, virus recombinantes adeno-asociados.

La Figura 17 representa una transferencia génica de EGFP dirigida al SNC reprimida por miARN endógeno por rAAV9 administrado por vía sistémica. Se inyectaron ratones C57BL/6 macho de diez semanas de edad por vía intravenosa con scAAV9CBEGFP o scAAV9CBnLacZ(miR-1BS)₃-(miR-122BS)₃ a una dosis de 2×10^{14} copias de genoma por kg (GC/kg) de peso corporal. Se sacrificaron los animales 3 semanas después para la fijación del cuerpo entero por perfusión transcardíaca. (a) Se recogieron cerebro, médula espinal, hígado, corazón y músculo para el crioseccionamiento, tinción inmunofluorescente para EGFP (cerebro y médula espinal cervical), y microscopía de fluorescencia para detectar EGFP. Se extrajeron ADN y ARN celular total del cerebro, hígado, corazón y músculo para medir la cantidad de genoma de vector persistente por qPCR y ARNm de EGFP por qRT-PCR. (b) Para cada tejido, se comparó la abundancia relativa del ARNm de EGFP que contenía sitios de unión de miARN con la del ARNm de EGFP que carecía de sitios de unión de miARN. Para cada muestra, se normalizó la abundancia de ARNm a la cantidad de genoma de vector detectada en el tejido. EGFP, proteína verde fluorescente potenciada; miARN, microARN; nLacZ, gen indicador de β -galactosidasa; qRT-PCR, PCR cuantitativa por transcripción inversa; rAAV, virus recombinantes adeno-asociados.

La Figura 18 representa un modelo molecular para la expresión de rAAV regulada por miARN endógeno. miARN, microARN; rAAV, virus recombinantes adeno-asociados.

- 5 La Figura 19 representa una cuantificación de los niveles de intensidad de GFP en el cerebro y médula espinal de ratones neonatales transducidos con diversos vectores de AAV. Se inyectaron 4×10^{11} copias de genoma (GCs) de diez vectores de AAV diferentes en crías P1 neonatales mediante la vena superficial. Los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se extrajeron los tejidos cerebrales y se prepararon criosecciones de 40 μm de espesor. Las secciones se tiñeron contra el anticuerpo anti-EGFP. Se analizaron las imágenes y se calcularon los valores de intensidad/píxel de todos los serotipos de AAV en diversas regiones en el cerebro y médula espinal (A) usando el software Nikon NIS elements AR versión 3.2. También se presentaron intensidades promedio del cerebro y las regiones de la médula espinal para los diferentes rAAVs (B). Se fijó la región de interés (ROI) de cada estructura anatómica para todos los vectores para garantizar la comparación paralela.
- 10 La Figura 20 representa una expresión de EGFP fuerte y extendida en el cerebro de ratón neonatal después de la inyección intravenosa de rAAVs. Se inyectaron 4×10^{11} copias de genoma (GCs) de rAAVs 7, 9, rh.10, rh.39 y rh.43 en crías P1 neonatales mediante la vena superficial. Los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se extrajeron los tejidos cerebrales y se prepararon criosecciones de 40 μm de espesor. Las secciones se tiñeron contra anticuerpo anti-EGFP. Las barras representan 100 μm . Las regiones mostradas son: bulbo olfativo, estriado, hipocampo, corteza, hipotálamo, cerebelo y bulbo raquídeo.
- 15 La Figura 21 representa la expresión de EGFP en médula espinal de ratón neonatal después de la inyección intravenosa de rAAVs. Se inyectaron 4×10^{11} GCs de rAAVs 7, 9, rh.10, rh.39 y rh.43 en crías P1 neonatales mediante la vena superficial. Los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se extrajeron los tejidos de la médula espinal y se prepararon criosecciones de 40 μm de espesor. Las secciones de las regiones cervical, torácica y lumbar se tiñeron contra anticuerpos anti-EGFP. Las barras representan 100 μm .
- 20 La Figura 22 representa la expresión de EGFP en ganglios de la raíz dorsal transducidos por rAAVs 1, 2, 6, 6.2, 7, 9, rh.10 y rh.39 administrados por vía intravascular. Las crías neonatales recibieron 4×10^{11} GCs de rAAVs en P1 y se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se procesaron criosecciones de cuarenta μm de espesor para la tinción inmunohistoquímica doble para EGFP (verde) y neuronas (NeuN, rojo). Las barras representan 75 μm .
- 25 La Figura 23 representa el análisis de microscopio confocal de los tipos transducidos de células en el SNC del ratón después de la administración sistémica de rAAVs a neonatos P1. Las secciones de cerebro y de médula espinal de 40 μm de espesor de los animales tratados con diferentes rAAVs se co-tiñeron contra anticuerpos anti-EGFP y marcadores específicos del tipo de célula. Se usó anti-NeuN para teñir células neuronales; se usó anti-GFAP para teñir astrocitos; se usó anti-calbindina para teñir células de Purkinje; se usó anti-ChAT para teñir neuronas motoras; se usó anti-DARPP para teñir neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Se examinaron todos los rAAVs, pero para cada tipo de célula, solo se mostró aquí una imagen representativa.
- 30 La Figura 24 representa una transducción de las estructuras ventriculares del cerebro por rAAVs administrados por vía intravascular. La crías neonatales recibieron 4×10^{11} GCs de rAAVs en P1 y se sacrificaron 21 días después de la inyección. Los plexos coroideos en diferentes ventrículos se preservaron todos bien durante el proceso del tejido. Se tiñeron criosecciones de cuarenta μm de espesor contra anticuerpos anti-EGFP. Las barras representan 100 μm .
- 35 La Figura 25 representa un análisis de pureza e integridad morfológica de vectores de rAAV. A. Se usó en este estudio análisis de SDS-PAGE teñido con plata de vectores de rAAVCBEGFP purificados con gradiente de CsCl. Se cargaron aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ partículas de virus cada una de rAAVs 1, 2, 5, 6, 6.2, 7, 9, rh10, rh39 y rh43 en el carril correspondiente. B. Microscopía electrónica de transmisión de viriones de AAV recombinante teñidos negativos. Se diseminaron viriones de rAAV en una película de soporte Formvar recubierta de carbono recién preparada y se tiñeron con 1% de acetato de uranilo para la microscopía de transmisión. Las imágenes de partículas de virus de lotes de vectores representativos se tomaron a 92.000X y se presentaron.
- 40 La Figura 26 representa una transducción de ganglios de la raíz dorsal de ratones neonatales por rAAVs 1, 6, 6.2 y rh43 administrados por vía sistémica. Las crías neonatales que recibieron 4×10^{11} GCs de rAAVs en P1 se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se tiñeron criosecciones de cuarenta μm de espesor contra anticuerpos anti-EGFP. Las barras representan 75 μm .
- 45 La Figura 27 representa una transducción de los vasos capilares del cerebro por rAAVs administrados por vía intravascular. Las crías neonatales que recibieron 4×10^{11} GCs de rAAVs en P1 se sacrificaron 21 días después de la inyección. Se tiñeron criosecciones de cuarenta μm de espesor de los cerebros contra: (a) anticuerpos anti-EGFP (AAV1, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV9, AAVrh.10, AAVrh.39 y AAVrh.43); (b) anticuerpos anti-EGFP y anti-CD34 (rh.10 solo). Las barras representan 100 μm .
- 50 La Figura 28 representa una evaluación de la microgliosis en cerebro de ratón después de la administración sistémica de rAAVs a neonatos P1. Las secciones de cerebro de 40 μm de espesor de los animales tratados con diferentes rAAVs se co-tiñeron contra anticuerpos anti-EGFP y anti-IBA-1. Solo se mostró el resultado de la tinción de rAAVrh.10.
- 55 La Figura 29 representa la expresión de EGFP nativa en el SNC de ratones después de la administración sistémica de rAAVs a neonatos P1. Las crías neonatales que recibieron 4×10^{11} GCs de rAAVs en P1 se sacrificaron 21 días

después de la inyección. Se montaron criosecciones de cuarenta μm de espesor y se observaron bajo microscopio sin inmunotinción. Se indicaron los tiempos de exposición para cada imagen.

La Figura 30 representa resultados que muestran los efectos de la terapia génica basada en rAAV en el tratamiento de la enfermedad de Canavan. La Figura 30A muestra que el tratamiento corrigió la marcha y función motora de los ratones CD. La Figura 30B muestra que el tratamiento mitigó la retinopatía y restauró la visión en ratones CD. La Figura 30C muestra que los niveles de NAA en los ratones CD tratados se parecen a aquellos en los ratones normales. La Figura 30D indica que la actividad de APSA se detecta en los cerebros de ratones CD. La Figura 30E indica que la expresión de APSA se detecta en los cerebros de ratones CD.

La Figura 31A representa que la vacuolación en tanto cerebro como médula espinal de los ratones tratados es más irregular y variable con vacuolas de tamaño generalmente más pequeñas y que algunas áreas de la corteza cerebral casi no muestran vacuolación. La Figura 31B muestra la expresión de APSA en la corteza cerebral *in situ*.

La Figura 32 representa los resultados de un análisis cuantitativo de vacuolación en diversas regiones del cerebro. La Figura 32A muestra que el bulbo olfativo tuvo una espectacular mitigación en la degeneración de materia blanca después de la terapia génica y que las grandes vacuolas fueron esencialmente eliminadas en otros tejidos. La Figura 32B muestra los resultados de un análisis similar en secciones de médula espinal.

La Figura 33 representa los resultados de una evaluación histopatológica de riñones en los ratones CD. La Figura 33A muestra que el epitelio tubular renal del riñón se atenuó de forma difusa y presentó agrandamiento de las luces tubulares en ratones CD no tratados. La Figura 33B muestra que el ratón CD tratado tuvo glomérulos normales. Las Figuras 33C y 33D representan los resultados de un análisis de dos vectores candidatos de partida, rAAV9 y rh.10, respectivamente, para la eficiencia de transducción de riñón después de la administración IV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El virus adeno-asociado (AAV) es un virus pequeño (26 nm) no envuelto defectuoso en la replicación que depende de la presencia de un segundo virus, tal como adenovirus o virus del herpes, para su crecimiento en células. No se conoce que el AAV produzca enfermedad e induce una respuesta inmunitaria muy leve. El AAV puede infectar tanto células en división como no en división y puede incorporar su genoma en el de la célula huésped. Se describen métodos de administración de un transgén a un tejido del SNC en un sujeto usando transferencia génica basada en AAV recombinante. Por consiguiente, en el presente documento se desvelan métodos y composiciones para tratar trastornos relacionados con el SNC en el presente documento. Aspectos adicionales de la divulgación en el presente documento se basan en el descubrimiento de rAAVs que logran una amplia distribución en todo el tejido del SNC. En algunos casos, los rAAVs se diseminan en todo el tejido del SNC tras la administración directa en el líquido cefalorraquídeo (LCR), por ejemplo, mediante inyección intratecal y/o intracerebral. En otros casos, los rAAVs cruzan la barrera hematoencefálica y logran una amplia distribución en todo el tejido del SNC de un sujeto tras la administración intravenosa. Tales rAAVs son útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con el SNC, que incluyen, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Canavan (CD).

Métodos y composiciones para elegir como diana tejido del SNC

En el presente documento se desvelan métodos de administración de un transgén a tejido del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto en el presente documento. Los métodos normalmente implican administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un rAAV que comprende un vector de ácido nucleico para expresar un transgén en el sujeto. Una "cantidad eficaz" de un rAAV es una cantidad suficiente para infectar un número suficiente de células de un tejido diana en un sujeto. Una cantidad eficaz de un rAAV puede ser una cantidad suficiente para tener un beneficio terapéutico en un sujeto, por ejemplo, para prolongar la esperanza de vida de un sujeto, para mejorar en el sujeto uno o más síntomas de enfermedad, por ejemplo, un síntoma de ELA, un síntoma de enfermedad de Canavan, etc. En algunos casos, una cantidad eficaz de un rAAV puede ser una cantidad suficiente para producir un modelo de animal transgénico somático estable. La cantidad eficaz dependerá de una variedad de factores tales como, por ejemplo, la especie, edad, peso, salud del sujeto, y el tejido del SNC que va a ser elegido como diana, y puede así variar entre sujeto y tejido. Una cantidad eficaz también puede depender del modo de administración. Por ejemplo, el elegir como diana un tejido del SNC por inyección intravascular puede requerir dosis diferentes (por ejemplo, más altas), en algunos casos, que el elegir como diana tejido del SNC por inyección intratecal o intracerebral. En algunos casos, se administran múltiples dosis de un rAAV. Una cantidad eficaz puede también depender del rAAV usado. Por ejemplo, dosificaciones para elegir como diana un tejido del SNC pueden depender del serotipo (por ejemplo, la proteína de la cápside) del rAAV. Por ejemplo, el rAAV puede tener una proteína de la cápside de un serotipo de AAV seleccionado del grupo que consiste en: AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 y CSp3. En ciertos casos, la cantidad eficaz de rAAV es 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} copias de genoma por kg. En ciertos casos, la cantidad eficaz de rAAV es 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} o 10^{15} copias de genoma por sujeto.

Un método de administración de un transgén a tejido del SNC en un sujeto puede comprender administrar un rAAV por una vía única o por múltiples vías. Por ejemplo, el administrar un transgén a tejido del SNC en un sujeto puede comprender administrar al sujeto, por administración intravenosa, una cantidad eficaz de un rAAV que cruza la barrera hematoencefálica. El administrar un transgén a tejido del SNC en un sujeto puede comprender administrar al

5 sujeto una cantidad eficaz de un rAAV por administración intratecal o administración intracerebral, por ejemplo, por inyección intraventricular. Un método de administración de un transgén a tejido del SNC en un sujeto puede comprender co-administrar una cantidad eficaz de un rAAV por dos vías de administración diferentes, por ejemplo, por administración intratecal y por administración intracerebral. La co-administración puede realizarse a

10 El tejido del SNC que es elegido como diana puede seleccionarse de, por ejemplo, corteza, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, tronco encefálico, médula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar. La vía de administración para elegir como diana tejido del SNC normalmente depende del serotipo de AAV. Por ejemplo, en ciertos casos donde el serotipo de AAV está seleccionado de AAV1, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 y CSp3, la vía de administración puede ser inyección intravascular. En algunos casos, por ejemplo, donde el serotipo de AAV está seleccionado de AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10, rh.39, rh.43 y CSp3, la vía de administración puede ser inyección intratecal y/o intracerebral.

Administración intravascular

15 Como se usa en el presente documento, el término "administración intravascular" se refiere a la administración de un agente, por ejemplo, una composición que comprende un rAAV, en la vasculatura de un sujeto, que incluye los aparatos circulatorios venoso y arterial del sujeto. Normalmente, los rAAVs que cruzan la barrera hematoencefálica pueden administrarse por administración intravascular para elegir como diana tejido del SNC. En algunos casos, la administración intravascular (por ejemplo, intravenosa) facilita el uso de volúmenes más grandes que otras formas de administración (por ejemplo, intratecal, intracerebral). Así, pueden administrarse grandes dosis de rAAVs (por ejemplo, hasta 10^{15} GC/sujeto) de una vez por administración intravascular (por ejemplo, intravenosa). Los métodos de administración intravascular son muy conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo, uso de una aguja hipodérmica, cánula periférica, línea venosa central, etc.

Administración intratecal y/o intracerebral

25 Como se usa en el presente documento, el término "administración intratecal" se refiere a la administración de un agente, por ejemplo, una composición que comprende un rAAV, en el canal espinal. Por ejemplo, la administración intratecal puede comprender la inyección en la región cervical del canal espinal, en la región torácica del canal espinal, o en la región lumbar del canal espinal. Normalmente, la administración intratecal se realiza inyectando un agente, por ejemplo, una composición que comprende un rAAV, en la cavidad subaracnoideo (espacio subaracnoideo) del canal espinal, que es la región entre la membrana aracnoidea y piamadre del canal espinal. El espacio subaracnoideo es ocupado por tejido esponjoso que consiste en trabéculas (filamentos delicados de tejido conjuntivo que se extienden desde la materia aracnoidea y se juntan en la piamadre) y canales de intercomunicación en los que está contenido el líquido cefalorraquídeo. En algunos casos, la administración intratecal no es administración en la vasculatura espinal.

35 Como se usa en el presente documento, el término "administración intracerebral" se refiere a la administración de un agente en y/o alrededor del cerebro. La administración intracerebral incluye, pero no se limita a, administración de un agente en el cerebro, bulbo raquídeo, protuberancia, cerebelo, cavidad intracraneal y meninges que rodea el cerebro. La administración intracerebral puede incluir administración en la duramadre, materia aracnoidea y piamadre del cerebro. La administración intracerebral puede incluir, en algunos casos, administración de un agente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) del espacio subaracnoideo que rodea el cerebro. La administración intracerebral puede incluir, en algunos casos, la administración de un agente en los ventrículos del cerebro, por ejemplo, el ventrículo lateral derecho, el ventrículo lateral izquierdo, el tercer ventrículo, el cuarto ventrículo. En algunos casos, la administración intracerebral no es administración en la vasculatura del cerebro.

45 La administración intracerebral puede implicar la inyección directa en y/o alrededor del cerebro. En algunos casos, la administración intracerebral implica inyección usando procedimientos estereotáxicos. Los procedimientos estereotáxicos son muy conocidos en la materia y normalmente implican el uso de un ordenador y un dispositivo de barrido tridimensional que se usan juntos para guiar la inyección a una región intracerebral particular, por ejemplo, una región ventricular. También puede usarse bombas de micro-inyección (por ejemplo, de World Precision Instruments). En algunos casos, se usa una bomba de microinyección para administrar una composición que comprende un rAAV. En algunos casos, la velocidad de infusión de la composición está en un intervalo de 1 μ l / minuto a 100 μ l / minuto. Como será apreciado por el experto, las velocidades de infusión dependerán de una variedad de factores, que incluyen, por ejemplo, especie de sujeto, edad del sujeto, peso/tamaño del sujeto, serotipo del AAV, dosificación requerida, región intracerebral elegida como diana, etc. Así, un experto puede considerar otras velocidades de infusión que son apropiados en ciertas circunstancias.

Métodos y composiciones para tratar trastornos relacionados con el SNC

55 En el presente documento también se desvelan métodos y composiciones para tratar trastornos relacionados con el SNC en el presente documento. Como se usa en el presente documento, un "trastorno relacionado con el SNC" es una enfermedad o afección del sistema nervioso central. Un trastorno relacionado con el SNC puede afectar a la médula espinal (por ejemplo, un mielopatía), cerebro (por ejemplo, un encefalopatía) o tejidos que rodean el cerebro

y la médula espinal. Un trastorno relacionado con el SNC puede ser de un origen genético, tanto heredado como adquirido mediante una mutación somática. Un trastorno relacionado con el SNC puede ser una afección o trastorno psicológico, por ejemplo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, trastorno del espectro autista, trastorno del estado de ánimo, esquizofrenia, depresión, síndrome de Rett, etc. Un trastorno relacionado con el SNC puede ser un trastorno autoinmunitario. Un trastorno relacionado con el SNC también puede ser un cáncer del SNC, por ejemplo, cáncer cerebral. Un trastorno relacionado con el SNC que es un cáncer puede ser un cáncer primario del SNC, por ejemplo, un astrocitoma, glioblastomas, etc., o puede ser un cáncer que ha metastatizado a tejido del SNC, por ejemplo, un cáncer de pulmón que ha metastatizado al cerebro. Ejemplos no limitantes adicionales de trastornos relacionados con el SNC incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de almacenamiento lisosómico, isquemia, dolor neuropático, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Canavan (CD).

En el presente documento se desvelan métodos de tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en un sujeto en necesidad del mismo en el presente documento. Un sujeto en necesidad de un tratamiento para ELA es un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene ELA. En algunos casos, la ELA se ha asociado a una mutación en el gen que codifica la superóxido dismutasa (SOD1). Niveles elevados de SOD1 parecen asociarse a ELA en algunos casos. Se ha mostrado que la expresión transgénica de ARNhp contra SOD1 pueden inactivar la expresión de SOD1 mutante, retrasar la aparición de enfermedad y prolongar la supervivencia (Xia et al. 2006, Neurobiol Dis 23: 578). También se ha encontrado que la infusión intratecal de ARNip contra SOD1 en el momento de aparición de la enfermedad inactiva la expresión de SOD1 mutante y prolonga la supervivencia (Wang et al. 2008, JBC 283: 15845). Además, la inyección en el nervio de adenovirus que expresa ARNhp contra SOD1 en el momento de aparición de la enfermedad puede inactivar la expresión de SOD1 mutante y prolongar la supervivencia (Wu et al. 2009, Antiox Redox Sig 11: 1523).

Aspectos de la divulgación en el presente documento se basan en el descubrimiento de que terapias basadas en AAV logran, con baja toxicidad, inhibición a largo plazo de la expresión de SOD1 que es amplia en todo el tejido del SNC del sujeto. Métodos de tratamiento de ELA que se han desvelado en el presente documento normalmente implican administrar a tejido del SNC de un sujeto una cantidad eficaz de un rAAV que alberga un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 (por ejemplo, que se hibrida específicamente con un ácido nucleico que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 17 o 19) e inhibe la expresión de SOD1 en el sujeto. Se ha descubierto que rAAVs que tienen una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 logran una amplia distribución en todo el SNC tras la inyección intratecal y/o inyección intracerebral, y así, son particularmente útiles para tratar ELA. Este resultado es sorprendente en vista de ciertos otros rAAVs que infectan células solo dentro de la proximidad inmediata del sitio de inyección, o logran solo una distribución limitada, tras la inyección intratecal. Así, los rAAVs que logran la amplia distribución en todo el SNC son particularmente útiles como vectores de transferencia génica para tratar ELA.

En algunos casos, se ha descubierto que la co-administración por inyección intratecal e inyección intracerebral, por ejemplo, inyección intraventricular, de rAAVs que tienen una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 y un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 e inhibe la expresión de SOD1, logra inhibición a largo plazo de SOD1 y mejora el resultado (por ejemplo, esperanza de vida) en un modelo animal de ELA (véase, por ejemplo, la Figura 6A). En algunos casos, el ARN inhibidor es un ARN antisentido, un ARNhp o un miARN. El ARN inhibidor puede tener una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26. El ARN inhibidor puede tener una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 30. Así, en algunos casos, se desvela en el presente documento un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un ácido nucleico que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 30. En algunos casos, se desvela en el presente documento un AAV recombinante que alberga un ácido nucleico que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 22 a 30. El AAV recombinante puede tener una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9. El AAV recombinante puede tener una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 12.

En el presente documento se desvelan métodos de tratamiento de la enfermedad de Canavan (CD) en un sujeto en necesidad del mismo. Un sujeto en necesidad de un tratamiento para CD es un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene CD. La enfermedad de Canavan se produce por un gen ASPA defectuoso que es responsable de la producción de la enzima aspartoacilasa. Esta enzima normalmente rompe la molécula del cerebro concentrada N-acetil aspartato. La disminución de la actividad de la aspartoacilasa en sujetos con CD previene la rotura normal del N-acetil aspartato, y parece que la ausencia de una rotura interfiere con el crecimiento de la vaina de mielina de las fibras nerviosas en el cerebro. Síntomas de la enfermedad de Canavan, que pueden aparecer en la infancia temprana y progresan rápidamente, pueden incluir retraso mental, pérdida de habilidades motoras previamente adquiridas, dificultades en la alimentación, tono muscular anormal (es decir, hipotonía o rigidez), mal control de la cabeza y megalocéfalia (cabeza anormalmente agrandada). También pueden producirse parálisis, ceguera o convulsiones. La divulgación en el presente documento puede mejorar uno o más síntomas de CD en un sujeto administrando al sujeto un AAV recombinante que alberga un ácido nucleico que expresa aspartoacilasa (ASPA). Por ejemplo, un método de tratamiento de la enfermedad de Canavan en un sujeto en necesidad del mismo puede comprender administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto por administración intravascular,

en el que el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica ASPA (por ejemplo, una región que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16). Un método de tratamiento de la enfermedad de Canavan en un sujeto en necesidad del mismo puede comprender administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto por administración intratecal, en el que el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica ASPA. En algunos casos, los métodos de tratamiento de CD implican administrar, a tejido del SNC del sujeto, una cantidad eficaz de un rAAV que comprende una proteína de la cápside distinta de una proteína de la cápside de AAV serotipo 2 (por ejemplo, distinta de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 2) y un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica ASPA. En otro ejemplo, un método de tratamiento de la enfermedad de Canavan en un sujeto en necesidad del mismo comprende administrar una cantidad eficaz de un rAAV a tejido del SNC del sujeto por una vía distinta de administración intracerebral, en el que el rAAV comprende un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica ASPA. En algunos casos, la ASPA expresada en tejido del SNC tras la administración del rAAV produce una disminución en la actividad de aspartoacilasa y rotura de N-acetil aspartato en el tejido del SNC. Así, en algunos casos, en el presente documento se desvela un vector de AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16. En algunos casos, en el presente documento se desvela un AAV recombinante que alberga un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16. En algunos casos, en el presente documento se desvela un AAV recombinante que alberga un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica una proteína que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 13 o 15. El AAV recombinante puede tener una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 12. El AAV recombinante puede tener una proteína de la cápside que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 y 3 a 12.

25 *AAVs recombinantes*

Se desvelan AAVs aislados. Como se usa en el presente documento con respecto a los AAVs, el término "aislado" se refiere a un AAV que ha sido aislado de su entorno natural (por ejemplo, de una célula huésped, tejido, o sujeto) o producido artificialmente. Los AAVs aislados pueden producirse usando métodos recombinantes. Tales AAVs se denominan en el presente documento "AAVs recombinantes". Los AAVs recombinantes (rAAVs) tienen preferentemente capacidades de direccionamiento específico de tejido, de forma que un transgén del rAAV se administrará específicamente a uno o más tejido(s) predeterminados). La cápside del AAV es un elemento importante en la determinación de estas estas capacidades de direccionamiento específico de tejido. Así, puede seleccionarse un rAAV que tiene una cápside apropiada para el tejido que se elige como diana. En algunos casos, el rAAV comprende una proteína de la cápside que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NOs 1 a 12, o una proteína que tiene homología sustancial con las mismas.

Son muy conocidos en la técnica métodos de obtención de AAVs recombinantes que tienen una proteína de la cápside deseada (véase, por ejemplo, el documento US 2003/0138772). Proteínas de la cápside de AAVs que pueden usarse en los rAAVs desvelados en el presente documento incluyen, por ejemplo, las desveladas en G. Gao, et al., J. Virol, 78(12):6381-6388 (Junio de 2004); G. Gao, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 100(10):6081-6086 (13 de mayo de 2003); documentos US 2003-0138772, US 2007/0036760, US 2009/0197338, y solicitud provisional de EE.UU. número de serie 61/182.084, presentada el 28 de mayo de 2009. Normalmente, los métodos implican cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NOs 1-12) o fragmento de la misma; un gen *rep* funcional; un vector de AAV recombinante compuesto de repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV y un transgén; y funciones auxiliares suficientes para permitir la encapsidación del vector de AAV recombinante en las proteínas de la cápside de AAV.

Los componentes que van a cultivarse en la célula huésped para encapsidar un vector de rAAV en una cápside de AAV pueden ser desvelados en el presente documento para la célula huésped en *trans*. Alternativamente, uno cualquiera o más de los componentes requeridos (por ejemplo, vector de AAV recombinante, secuencias de rep, secuencias de cap y/o funciones auxiliares) pueden ser desvelados en el presente documento por una célula huésped estable que ha sido manipulada para contener uno o más de los componentes requeridos usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia. Lo más adecuadamente, una célula huésped estable tal contendrá el (los) componente(s) requerido(s) bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, el (los) componente(s) requerido(s) puede(n) estar bajo el control de un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados se desvelan en el presente documento, en la discusión de elementos reguladores adecuados para su uso con el transgén. En otra alternativa adicional, una célula huésped estable seleccionada puede contener componente(s) seleccionado(s) bajo el control de un promotor constitutivo y otros componente(s) seleccionado(s) bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, puede generarse una célula huésped estable que se deriva de células 293 (que contienen E1 las funciones auxiliares bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contienen las proteínas rep y/o cap bajo el control de promotores inducibles. Pueden generarse todavía otras células huésped estables por un experto en la materia.

El vector de AAV recombinante, secuencias de rep, secuencias de cap, y funciones auxiliares requeridas para producir los rAAVs, pueden administrarse a la célula huésped de encapsidación usando cualquier elemento genético apropiado (vector). El elemento genético seleccionado puede administrarse por cualquier método adecuado, que incluye aquellos descritos en el presente documento. Los métodos usados en el presente documento son conocidos para aquellos expertos en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas sintéticas. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Similarmente, los métodos de generación de viriones de rAAV son muy conocidos y la selección de un método adecuado no es una limitación en los presentes métodos. Véase, por ejemplo, K. Fisher et al, *J. Virol.*, 70:520-532 (1993) y la patente de EE.UU. N.º 5.478.745.

En algunos casos, los AAVs recombinantes pueden producirse usando el método de transfección triple (por ejemplo, como se describen en detalle en la patente de EE.UU. N.º 6.001.650). Normalmente, los AAVs recombinantes se producen transfectando una célula huésped con un vector de AAV recombinante (que comprende un transgén) para encapsidarse en partículas de AAV, un vector de función auxiliar del AAV y un vector de función accesoria. Un vector de función auxiliar del AAV codifica las secuencias de "función auxiliar de AAV" (es decir, rep y cap), que funcionan en *trans* para la replicación y encapsidación de AAV productiva. Preferentemente, el vector de función auxiliar del AAV soporta la eficiente producción de vectores de AAV sin generar ningún virión de AAV no mutante detectable (es decir, viriones de AAV que contienen genes rep y cap funcionales). Ejemplos no limitantes de vectores adecuados para su uso en el presente documento incluyen pHLP19, descrito en la patente de EE.UU. N.º 6.001.650, y el vector pRep6cap6, descrito en la patente de EE.UU. N.º 6.156.303, la totalidad de ambos se incorpora por referencia en el presente documento. El vector de función accesoria codifica secuencias de nucleótidos para funciones virales y/o celulares no derivadas de AAV, tras lo cual AAV es dependiente para la replicación (es decir, "funciones accesorias"). Las funciones accesorias incluyen aquellas funciones requeridas para la replicación de AAV, que incluyen, sin limitación, aquellos restos que participan en la activación de la transcripción génica de AAV, corte y empalme de ARNm de AAV específico de la etapa, replicación de ADN de AAV, síntesis de productos de expresión de cap, y ensamblaje de cápsides de AAV. Las funciones accesorias basadas en virus pueden derivarse de cualquiera de los virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, virus del herpes (distinto de virus del herpes simple tipo-1) y virus de la variolovacuna.

También se desvelan células huésped transfectadas. El término "transfección" se usa para referirse a la captación de ADN foráneo por una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Generalmente se conocen en la técnica varias técnicas de transfección. Véase, por ejemplo, Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu et al. (1981) *Gene* 13:197. Tales técnicas pueden usarse para introducir uno o más ácidos nucleicos exógenos, tales como un vector de integración de nucleótido y otras moléculas de ácidos nucleicos, en células huésped adecuadas.

Una "célula huésped" se refiere a cualquier célula que alberge, o sea capaz de albergar, una sustancia de interés. Frecuentemente, una célula huésped es una célula de mamífero. Una célula huésped puede usarse como receptor de una construcción de auxiliar de AAV, un plásmido de minigen de AAV, un vector de función accesoria, u otro ADN de transferencia asociado a la producción de AAVs recombinantes. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectedo. Así, una "célula huésped", como se usa en el presente documento, puede referirse a una célula que se ha transfectedo con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una única célula parental puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total a la parental original, debido a mutación natural, accidental o deliberada.

También se desvelan células aisladas. Como se usa en el presente documento con respecto a la célula, el término "aislada" se refiere a una célula que ha sido aislada de su entorno natural (por ejemplo, de un tejido o sujeto). Como se usa en el presente documento, el término "línea celular" se refiere a una población de células capaces de crecimiento y división continuos o prolongados *in vitro*. Frecuentemente, las líneas celulares son poblaciones clónicas derivadas de una única célula progenitora. Se conoce además en la técnica que pueden producirse cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de tales poblaciones clónicas. Por tanto, las células derivadas de la línea celular citada pueden no ser precisamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular citada incluye tales variantes. Como se usa en el presente documento, el término "célula recombinante" se refiere a una célula en la que se ha introducido un segmento de ADN exógeno, tal como segmento de ADN que conduce a la transcripción de un polipéptido biológicamente activo o la producción de un ácido nucleico biológicamente activo tal como un ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" incluye cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., que sea capaz de replicación cuando se asocia a los elementos de control apropiados y que pueda transferir secuencias de genes entre células. Así, el término incluye vehículos de clonación y de expresión, además de vectores virales. En algunos casos, se contemplan que son vectores útiles aquellos vectores en los que el segmento de ácido nucleico que va a transcribirse está situado bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. Las expresiones "operativamente situado", "bajo el control" o "bajo el control transcripcional" significan que el promotor está en la localización y orientación correctas en relación con el ácido

nucleico para controlar el inicio de la ARN polimerasa y la expresión del gen. El término "vector o construcción de expresión" significa cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico en la que parte o toda la secuencia codificante del ácido nucleico es capaz de ser transcrita. En algunos casos, la expresión incluye la transcripción del ácido nucleico, por ejemplo, para generar un producto de polipéptido biológicamente activo o inhibidor de ARN (por ejemplo, ARNhp, miARN) a partir de un gen transcrito.

Los anteriores métodos para encapsidar vectores recombinantes en cápsides de AAV deseadas para producir los rAAVs no pretenden ser limitantes y otros métodos adecuados serán evidentes para el experto.

Vectores de AAV recombinante

Los "vectores de AAV recombinante (rAAV)" normalmente están compuestos de, como mínimo, un transgén y sus secuencias reguladoras, y repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV en 5' y 3'. Es este vector de AAV recombinante el que está encapsidado en una proteína de la cápside y se administra a una célula diana seleccionada. En algunos casos, el transgén es una secuencia de ácidos nucleicos, heteróloga a las secuencias del vector, que codifica un polipéptido, proteína, molécula de ARN funcional (por ejemplo, miARN, inhibidor de miARN) u otro producto génico de interés. La secuencia codificante de ácidos nucleicos está operativamente unida a componentes reguladores de un modo que permite la transcripción, traducción y/o expresión transgénica en una célula de un tejido diana.

Las secuencias de AAV del vector normalmente comprenden las secuencias de la repetición terminal invertida de 5' y 3' de acción en trans (véase, por ejemplo, B. J. Carter, en "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). Las secuencias de ITR tienen aproximadamente 145 pb de longitud. Preferentemente, se usan sustancialmente las secuencias enteras que codifican las ITRs en la molécula, aunque es permisible algún grado de modificación menor de estas secuencias. La capacidad para modificar estas secuencias de ITR está dentro de la experiencia de la materia (véanse, por ejemplo, textos tales como Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); y K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532 (1996)). Un ejemplo de una molécula tal empleada en el presente documento es un plásmido "de acción en cis" que contiene el transgén, en el que la secuencia transgénica seleccionada y elementos reguladores asociados están flanqueados por las secuencias de ITR de 5' y 3' de AAV. Las secuencias de ITR de AAV pueden obtenerse de cualquier AAV conocido, que incluyen los tipos de AAV de mamífero actualmente identificados.

Además de los principales elementos identificados anteriormente para el vector de AAV recombinante, el vector también incluye elementos de control convencionales que están operativamente unidos al transgén de un modo que permita su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con el vector plasmídico o infectada con el virus producido en el presente documento. Como se usa en el presente documento, secuencias "operativamente unidas" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficiencia de traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. Se conocen en la técnica un gran número de secuencias de control de la expresión, que incluyen promotores que son nativos, constitutivos, inducibles y/o específicos de tejido, y pueden utilizarse.

Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, secuencia codificante) y secuencias reguladoras están operativamente unidas cuando están covalentemente unidas de tal forma que pongan la expresión o transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias de ácidos nucleicos se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están operativamente unidas si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras de 5' produce la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) produce la introducción de una mutación por desplazamiento del marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias codificantes, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente que va a traducirse en una proteína. Así, una región promotora se uniría operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ADN de forma que el transcrito resultante pudiera traducirse en la proteína deseada o polipéptido. Similarmente, dos o más regiones codificantes están operativamente unidas cuando están unidas de tal forma que su transcripción de un promotor común produzca la expresión de dos o más proteínas que han sido traducidas en marco. En algunos casos, las secuencias codificantes operativamente unidas dan una proteína de fusión. En algunos casos, las secuencias codificantes operativamente unidas dan un ARN funcional (por ejemplo, ARNhp, miARN).

Para proteínas que codifican ácidos nucleicos, una secuencia de poliadenilación generalmente se inserta tras las secuencias transgénicas y antes de la secuencia de ITR de 3' de AAV. Una construcción de rAAV útil en el presente documento también puede contener un intrón, deseablemente localizado entre la secuencia promotora/potenciadora y el transgén. Una posible secuencia de intrón se deriva del SV-40, y se denomina la secuencia de intrón T de SV-

40. Otro elemento de vector que puede usarse es un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Se usa una secuencia de IRES para producir más de un polipéptido a partir de un único transcrito de genes. Se usaría una secuencia de IRES para producir una proteína que contiene más de una cadena de polipéptidos. La selección de estos y otros elementos de vector comunes son convencionales y muchas de tales secuencias están disponibles [véase, por ejemplo, Sambrook et al., y referencias citadas en su interior en, por ejemplo, páginas 3.18 3.26 y 16.17 16.27 y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989]. En algunos casos, se incluye una secuencia del virus 2A de la enfermedad de pies y boca en la poliproteína; éste es un péptido pequeño (aproximadamente 18 aminoácidos de longitud) que se ha mostrado que media en la escisión de poliproteínas (Ryan, M D et al., *EMBO*, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., *J Virology*, Noviembre de 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 864-873; y Halpin, C et al., *The Plant Journal*, 1999; 4: 453-459). La actividad de escisión de la secuencia de 2A se ha demostrado en sistemas artificiales que incluyen plásmidos y vectores de terapia génica (AAV y retrovirus) (Ryan, M D et al., *EMBO*, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., *J Virology*, Noviembre de 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 864-873; y Halpin, C et al., *The Plant Journal*, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., *Gene Therapy*, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., *Human Gene Therapy*, 2000; 11: 1921-1931; y Klump, H et al., *Gene Therapy*, 2001; 8: 811-817).

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica en células huésped puede variar entre especies, tejidos o tipos de células, pero debe en general incluir, según sea necesario, secuencias no transcritas de 5' y no traducidas de 5' implicadas con el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de terminación, secuencia CAAT, elementos potenciadores, y similares. Especialmente, tales secuencias no transcritas de 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen operativamente unido. Secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias de activador en la dirección 5' según se desee. Los vectores en el presente documento pueden incluir opcionalmente secuencias conductoras de 5' o señal. La elección y el diseño de un vector apropiado están dentro de la capacidad y discreción de un experto habitual en la materia.

Ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador de RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador del CMV) [véase, por ejemplo, Boshart et al, *Cell*, 41:521-530 (1985)], el promotor del SV40, el promotor de la dihidrofolato reductasa, el promotor de β -actina, el promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK) y el promotor de EF1 α [Invitrogen].

Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden regularse por compuestos exógenamente suministrados, factores ambientales tales como temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o en células en replicación solo. Los promotores inducibles y sistemas inducibles están disponibles de una variedad de fuentes comerciales, que incluyen, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas y pueden ser fácilmente seleccionados por un experto en la materia. Ejemplos de promotores inducibles regulados por promotores exógenamente suministrados incluyen el promotor de la metalotioneína (MT) de oveja inducible por cinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema del promotor de T7 polimerasa (documento WO 98/10088); el promotor de insecto de ecdisona (No et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996)), el sistema represible por tetraciclina (Gossen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)), el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al, *Science*, 268:1766-1769 (1995), véase también Harvey et al, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), el sistema inducible por RU486 (Wang et al, *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997) y Wang et al, *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)) y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)). Todavía otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o en células en replicación solo.

En otra realización, se usará el promotor nativo, o fragmento del mismo, para el transgén. El promotor nativo puede preferirse cuando se desee que la expresión del transgén deba imitar la expresión nativa. El promotor nativo puede usarse cuando la expresión del transgén deba regularse temporalmente o por el desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En otra realización, también pueden usarse otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak para imitar la expresión nativa.

En algunos casos, las secuencias reguladoras confieren capacidades de expresión génica específica de tejido. En algunos casos, las secuencias reguladoras específicas de tejido se unen a factores de transcripción específicos de tejido que inducen la transcripción en una manera específica de tejido. Tales secuencias reguladoras específicas de tejido (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc..) son muy conocidas en la técnica. Secuencias reguladoras específicas de tejido a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los siguientes promotores específicos de tejido: neuronales tal como el promotor de enolasa específica de neurona (NSE) (Andersen et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), promotor del gen de la cadena ligera del neurofilamento (Piccioli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)) y el promotor del gen vgf específico de neuronas (Piccioli et al., *Neuron*, 15:373-84 (1995)). En algunos casos, el promotor específico de tejido es un promotor de un gen seleccionado de: núcleos neuronales (NeuN), proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), poliposis adenomatosa del colon (APC) y molécula 1

adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1). Otros promotores específicos de tejido apropiados serán evidentes para el experto. En algunos casos, el promotor es un promotor de beta-actina de pollo.

En algunos casos, uno o más sitios de unión para uno o más de los miARN se incorporan en un transgén de un vector rAAV, para inhibir la expresión del transgén en uno o más tejidos de un sujeto que albergan los transgenes, por ejemplo, tejidos no del SNC. El experto apreciará que los sitios de unión pueden seleccionarse para controlar la expresión de un transgén en una manera específica de tejido. Por ejemplo, la expresión de un transgén en el hígado puede inhibirse incorporando un sitio de unión para miR-122 de forma que el ARNm expresado del transgén se una a y se inhiba por miR-122 en el hígado. La expresión de un transgén en el corazón puede inhibirse incorporando un sitio de unión para miR-133a o miR-1, de forma que el ARNm expresado del transgén se una a y se inhiba por miR-133a o miR-1 en el corazón. Los sitios diana de miARN en el ARNm pueden estar en las 5' UTR, 3' UTR o en la región codificante. Normalmente, el sitio diana está en la 3' UTR del ARNm. Además, el transgén puede diseñarse de forma que múltiples miARNs regulen el ARNm reconociendo los mismos sitios o múltiples sitios. La presencia de múltiples sitios de unión de miARN puede producir la acción cooperativa de múltiples RISCs y proporcionar inhibición altamente eficiente de la expresión. La secuencia del sitio diana puede comprender un total de 5-100, 10-60, o más nucleótidos. La secuencia del sitio diana puede comprender al menos 5 nucleótidos de la secuencia de un sitio de unión del gen diana.

Secuencias codificantes de transgén: Genes relacionados con el SNC

La composición de la secuencia transgénica de un vector de rAAV dependerá del uso que se le dé al vector resultante. Por ejemplo, un tipo de secuencia transgénica incluye una secuencia indicadora, que tras la expresión produce una señal detectable. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína terapéutica o ARN funcional terapéutico. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína o ARN funcional que pretende usarse para fines de investigación, por ejemplo, para crear un modelo de animal transgénico somático que albergue el transgén, por ejemplo, para estudiar la función del producto transgénico. En otro ejemplo, el transgén codifica una proteína o ARN funcional que pretende usarse para crear un modelo animal de enfermedad. Secuencias codificantes de transgén apropiadas serán evidentes para el experto.

Se desvelan vectores de rAAV para su uso en métodos de prevención o tratamiento de uno o más defectos génicos (por ejemplo, defectos génicos heredables, alteraciones génicas somáticas) en un mamífero, tales como, por ejemplo, un defecto génico que produce una deficiencia de polipéptidos o exceso de polipéptidos en un sujeto, y particularmente para tratar o reducir la gravedad o el grado de deficiencia en un sujeto que manifiesta un trastorno asociado al SNC unido a una deficiencia en tales polipéptidos en células y tejidos. En algunos casos, los métodos implican la administración de un vector de rAAV que codifica uno o más péptidos terapéuticos, polipéptidos, ARNhp, microARN, nucleótidos antisentido, etc. en un vehículo farmacéuticamente aceptable para el sujeto en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para tratar el trastorno asociado al SNC en el sujeto que tiene o que se sospecha que tiene un trastorno tal.

Un vector de rAAV puede comprender como transgén un ácido nucleico que codifica una proteína o ARN funcional que modula o trata un trastorno asociado al SNC. Lo siguiente es una lista no limitante de genes asociados a trastornos asociado al SNC: la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aspartoacilasa (ASPA), superóxido dismutasa (SOD1) y aminoácido descarboxilasa (AADC). Por ejemplo, un transgén útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson codifica TH, que es una enzima limitante de la velocidad en la síntesis de dopamina. Un transgén que codifica GTPCH, que genera el cofactor de TH tetrahidrobiopterina, también puede usarse en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Un transgén que codifica GDNF o BDNF, o AADC, que facilita la conversión de L-Dopa en DA, también puede usarse para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Para el tratamiento de ELA, un transgén útil puede codificar: GDNF, BDNF o CNTF. También para el tratamiento de ELA, un transgén útil puede codificar un ARN funcional, por ejemplo, ARNhp, miARN, que inhibe la expresión de SOD1. Para el tratamiento de isquemia, un transgén útil puede codificar NAIP o NGF. Un transgén que codifica beta-glucuronidasa (GUS) puede ser útil para el tratamiento de ciertas enfermedades de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, mucopolisacaridosis tipo VII (MPS VII)). Un transgén que codifica un gen de activación de profármaco, por ejemplo, timidina cinasa del VHS que convierte ganciclovir en un nucleótido tóxico que altera la síntesis del ADN y conduce a muerte celular, puede ser útil para tratar ciertos cánceres, por ejemplo, cuando se administra en combinación con el profármaco. Un transgén que codifica un opioide endógeno, tal como una β -endorfina, puede ser útil para tratar dolor. Otros ejemplos de transgenes que pueden usarse en los vectores de rAAV serán evidentes para el experto (véase, por ejemplo, Costantini LC, et al., Gene Therapy (2000) 7, 93-109).

En algunos casos, puede limitarse la capacidad de clonación del vector de ARN recombinante y una secuencia codificante deseada puede implicar la sustitución completa del genoma de 4,8 kilobases del virus. Genes grandes, pueden, por tanto, no ser adecuados para su uso en un vector de AAV recombinante estándar, en algunos casos. El experto apreciará qué opciones están disponibles en la materia para vencer una capacidad codificante limitada. Por ejemplo, pueden hibridarse las ITRs de AAV de dos genomas para formar concatémeros de cabeza a cola, duplicando casi la capacidad del vector. La inserción de sitios de corte y empalme permite la eliminación de las ITRs del transcrito. Serán evidentes para el experto otras opciones para vencer una capacidad de clonación limitada .

Administración de AAV recombinantes

Los rAAVs se administran en cantidades suficientes para transfectar las células de un tejido deseado y para proporcionar niveles suficientes de transferencia génica y expresión sin excesivos efectos adversos. Vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, administración directa al tejido seleccionado (por ejemplo, administración intracerebral, administración intratecal), intravenosa, oral, inhalación (incluyendo administración intranasal e intratraqueal), intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intratumoral, y otras vías de administración parentales. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea.

La administración de ciertos rAAVs a un sujeto puede ser, por ejemplo, por administración en la circulación sanguínea del sujeto. La administración en la circulación sanguínea puede ser por inyección en una vena, una arteria, o cualquier otro conducto vascular. Además, en ciertos casos, puede ser deseable administrar los rAAVs a tejido cerebral, meninges, células neuronales, células de la glía, astrocitos, oligodendrocitos, líquido cefalorraquídeo (LCR), espacios intersticiales y similares. En algunos casos, los AAVs recombinantes pueden administrarse directamente a la médula espinal o al cerebro por inyección en la región ventricular, además de al estriado (por ejemplo, el núcleo caudado o putamen del estriado), e intersección neuromuscular, o lóbulo cerebeloso, con una aguja, catéter o dispositivo relacionado, usando técnicas neuroquirúrgicas conocidas en la técnica, tales como por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Stein et al., *J Virol* 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., *PNAS* 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., *Nat. Genet.* 3:219-223, 1993; y Alisky y Davidson, *Hum. Gene Ther.* 11:2315-2329, 2000). En ciertas circunstancias será deseable administrar las construcciones terapéuticas basadas en rAAV en composiciones farmacéuticas adecuadamente formuladas desveladas en el presente documento tanto por vía subcutánea, intrapancreática, intranasal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intracerebral, intratecal, intracerebral, oral, intraperitoneal, como por inhalación. En algunos casos, pueden usarse las modalidades de administración como se describen en las patentes de EE.UU. N.º 5.543.158; 5.641.515 y 5.399.363 para administrar rAAVs.

Composiciones de AAV recombinantes

Los rAAVs pueden administrarse a un sujeto en composiciones según cualquier método apropiado conocido en la técnica. El rAAV, preferentemente suspenso en un vehículo fisiológicamente compatible (por ejemplo, en una composición), puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, un ser humano, ratón, rata, gato, perro, oveja, conejo, caballo, vaca, cabra, cerdo, cobaya, hámster, pollo, pavo, o un primate no humano (por ejemplo, macaco). Las composiciones pueden comprender un rAAV solo, o en combinación con uno o varios de otros virus (por ejemplo, un segundo rAAV que codifica que tiene uno o más transgenes diferentes). En algunos casos, las composiciones comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más rAAVs diferentes, cada uno de los cuales tiene uno o más transgenes diferentes.

Vehículos adecuados pueden ser fácilmente seleccionados por un experto en la materia en vista de la indicación a la que se refiere el rAAV. Por ejemplo, un vehículo adecuado incluye solución salina, que puede formularse con una variedad de disoluciones tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Otros vehículos a modo de ejemplo incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y agua. La selección del vehículo no es una limitación de la presente divulgación.

Opcionalmente, las composiciones pueden contener, además del rAAV y vehículo(s), otros componentes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes, o estabilizadores químicos. Conservantes a modo de ejemplo adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, etilvainillina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Estabilizadores químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

La dosis de viriones de rAAV requerida para lograr un efecto deseado o "efecto terapéutico", por ejemplo, las unidades de dosis en genomas de vector / por kilogramo de peso corporal (vg/kg), variarán basándose en varios factores que incluyen, pero no se limitan a: la vía de administración de rAAV, el nivel de expresión génica o de ARN requerida para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad o trastorno específico que está tratándose, y la estabilidad del producto génico o de ARN. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un intervalo de dosis de viriones de rAAV para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno particular basándose en los factores anteriormente mencionados, además de otros factores que son muy conocidos en la técnica. Una cantidad eficaz del rAAV está generalmente en el intervalo de aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 100 ml de disolución que contiene de aproximadamente 10^9 a 10^{16} copias de genoma por sujeto. Pueden usarse otros volúmenes de disolución. El volumen usado normalmente dependerá, entre otras cosas, del tamaño del sujeto, la dosis de rAAV, y la vía de administración. Por ejemplo, para administración intratecal o intracerebral puede usarse un volumen en el intervalo de 1 μ l a 10 μ l o 10 μ l a 100 μ l. Para administración intravenosa puede usarse un volumen en intervalo de 10 μ l a 100 μ l, 100 μ l a 1 ml, 1 ml a 10 ml, o más. En algunos casos, es apropiada una dosificación entre aproximadamente 10^{10} y 10^{12} copias de genoma de rAAV por sujeto. En ciertos casos, 10^{12} copias de genoma de rAAV por sujeto son eficaces para elegir como diana tejidos del SNC. En algunos casos, el rAAV se administra a una dosis de 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} o 10^{15} copias de genoma por sujeto. En algunos casos, el rAAV se administra a una dosis de 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} copias de genoma por kg.

En algunos casos, las composiciones de rAAV se formulan para reducir la agregación de partículas de AAV en la composición, particularmente donde están presentes concentraciones de rAAV altas (por ejemplo, $\sim 10^{13}$ GC/ml o más). Métodos de reducción de la agregación de rAAVs son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, adición de tensioactivos, ajuste del pH, ajuste de la concentración de sales, etc. (véase, por ejemplo, Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178)

La formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y disoluciones de vehículo es muy conocida para aquellos expertos en la materia, ya que es el desarrollo de pautas de dosificación y de tratamiento adecuadas para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en una variedad de pautas de tratamiento. Normalmente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente el 0,1 % del principio activo o más, aunque el porcentaje del (de los) principio(s) activo(s) puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 1 o el 2 % y aproximadamente el 70 % o el 80 % o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de principio activo en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal forma que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, estabilidad en almacén del producto, además de otras consideraciones farmacológicas, serán contempladas por un experto en la materia de la preparación de tales formulaciones farmacéuticas, y como tal, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y pautas de tratamiento.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. Bajo condiciones de almacenamiento y uso habituales, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. En muchos casos, la forma es estéril y fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede provocarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración de una disolución acuosa inyectable, por ejemplo, la disolución puede ser adecuadamente tamponada, si fuera necesario, y el diluyente líquido convertirse primero en isotónico con solución salina suficiente o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, puede disolverse una dosificación en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y tanto añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis como inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación, dependiendo de la afección del huésped. Las personas responsables de la administración determinarán, en cualquier caso, las dosis apropiadas para el huésped individual.

Se preparan disoluciones inyectables estériles incorporando el rAAV activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Las composiciones de rAAV desveladas en el presente documento también pueden formularse en una forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación y en cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tal como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco, y similares.

Como se usa en el presente documento, "excipiente" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, tampones, disoluciones de vehículo, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. También pueden incorporarse principios activos suplementarios en las composiciones. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una alérgica o reacción no deseada similar cuando se administran a un huésped.

Pueden usarse vehículos de administración tales como liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas de lípido, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones en células huésped adecuadas. En particular, los *transgenes* administrados por el vector de rAAV pueden formularse para la administración tanto encapsulada en una partícula de lípido, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, como una nanopartícula o similares.

Tales formulaciones pueden preferirse para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos o las construcciones de rAAV desveladas en el presente documento. La formación y uso de los liposomas es generalmente conocida para aquellos expertos en la materia. Recientemente, se desarrollaron liposomas con estabilidad en suero y semividas en circulación mejoradas (patente de EE.UU. N.º 5.741.516). Además, se han descrito diversos métodos de liposoma y preparaciones tipo liposoma como posibles vehículos de fármaco (patentes de EE.UU. N.º 5.567.434; 5.552.157; 5.565.213; 5.738.868 y 5.795.587).

Se han usado satisfactoriamente liposomas con varios tipos de células que normalmente son resistentes a la transfección por otros procedimientos. Además, los liposomas están libres de las limitaciones de longitud del ADN que son típicas de los sistemas de administración basados en virus. Se han usado eficazmente liposomas para introducir genes, fármacos, agentes radioterapéuticos, virus, factores de transcripción y efectores alostéricos en una variedad de líneas de células cultivadas y animales. Además, se han completado varios ensayos clínicos satisfactorios que examinan la eficacia de la administración de fármacos mediada por liposomas.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilaminares (también llamadas vesículas multilaminares (MLVs)). Las MLVs generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de MLVs produce la formación de vesículas unilaminares pequeñas (SUVs) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 .ANG., que contienen una disolución acuosa en el núcleo.

Alternativamente, pueden usarse formulaciones en nanocápsula del rAAV. Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar sustancias en una forma estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaño aproximadamente 0,1 µm) deben diseñarse usando polímeros capaces de ser degradados *in vivo*. Se contemplan para uso nanopartículas biodegradables de poli(cianoacrilato de alquilo) que cumplen estos requisitos.

Además de los métodos de administración descritos anteriormente, las siguientes técnicas también se contemplan como métodos alternativos de administración de las composiciones de rAAV a un huésped. Se ha usado y descrito la sonoforesis (es decir, ultrasonidos) en la patente de EE.UU. N.º 5.656.016 como un dispositivo para potenciar la tasa y eficacia de permeación del fármaco en y a través del aparato circulatorio. Otras alternativas de administración de fármacos contempladas son inyección intraósea (patente de EE.UU. N.º 5.779.708), dispositivos de microchip (patente de EE.UU. N.º 5.797.898), formulaciones oftálmicas (Bourlais et al., 1998), matrices transdérmicas (patentes de EE.UU. N.º 5.770.219 y 5.783.208) y liberación controlada por retroalimentación (patente de EE.UU. N.º 5.697.899).

Kits y composiciones relacionadas

Los agentes descritos en el presente documento pueden, en algunos casos, ensamblarse en kits farmacéuticos o de diagnóstico o de investigación para facilitar su uso en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de investigación. Un kit puede incluir uno o más recipientes que guardan los componentes desvelados anteriormente e instrucciones para su uso. Específicamente, tales kits pueden incluir uno o más agentes descritos en el presente documento, junto con instrucciones que describen la aplicación prevista y el uso apropiado de estos agentes. En ciertos casos, los agentes en un kit pueden estar en una formulación farmacéutica y dosificación adecuadas para una aplicación particular y para un método de administración de los agentes. Kits para fines de investigación pueden contener los componentes en concentraciones o cantidades apropiadas para ejecutar diversos experimentos.

El kit puede diseñarse para facilitar el uso de los métodos descritos en el presente documento por investigadores y puede tomar muchas formas. Cada una de las composiciones del kit, si procede, puede estar, desvelada en el presente documento, en forma líquida (por ejemplo, en disolución), o en forma sólida (por ejemplo, un polvo seco). En ciertos casos, algunas de las composiciones pueden ser constituibles o de otro modo procesables (por ejemplo, a una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado u otra especie (por ejemplo, agua o un medio de cultivo celular), que puede o puede no estar, desvelado en el presente documento, con el kit. Como se usa en el presente documento, "instrucciones" puede definir un componente de instrucción y/o promoción, y

normalmente implican instrucciones por escrito en o asociadas a un envase. Las instrucciones también pueden incluir cualquier instrucción oral o electrónica desvelada en el presente documento de cualquier manera de forma que un usuario reconozca claramente que las instrucciones deben estar asociadas al kit, por ejemplo, audiovisual (por ejemplo, cinta de vídeo, DVD, etc.), internet, y/o comunicaciones basadas en web, etc. Las instrucciones por escrito pueden estar en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, instrucciones que también pueden reflejar la autorización por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración a animales.

El kit puede contener uno cualquiera o más de los componentes descritos en el presente documento en uno o más recipientes. Como un ejemplo, en una realización, el kit puede incluir instrucciones para mezclar uno o más componentes del kit y/o aislar y mezclar una muestra y administrar a un sujeto. El kit puede incluir un recipiente que guarda los agentes descritos en el presente documento. Los agentes pueden estar en forma de un líquido, gel o sólido (polvo). Los agentes pueden prepararse de forma estéril, envasarse en jeringa y transportarse refrigerados. Alternativamente, pueden estar guardados en un vial u otro recipiente para almacenamiento. Un segundo recipiente puede tener otros agentes preparados de forma estéril. Alternativamente, el kit puede incluir los agentes activos premezclados y transportados en una jeringa, vial, tubo, u otro recipiente. El kit puede tener uno o más o todos de los componentes requeridos para administrar los agentes a un sujeto, tales como una jeringa, dispositivos de administración tópica, o tubo para aguja y bolsa IV.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Caracterización de 12 vectores de AAV para administración intravascular para elegir como diana tejidos del SNC y no elegir como diana tejidos no del SNC por regulación por miARN

Se evaluaron las propiedades de transferencia génica al SNC de 12 vectores scAAVEGFP de diferentes serotipos, o variantes naturales. Se descubrieron rAAVs que cruzan la barrera hematoencefálica (BBB) y se dirigen a oligodendrocitos. Los experimentos se realizaron en ratones neonatales (1 día de edad) y en ratones adultos (10 semanas de edad) (C57BL/6). Se probaron los siguientes serotipos de AAV: AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh.10 (también denominado en el presente documento as AAVrh.10), rh.39, rh.43, CSp3.

Los vectores de AAV recombinante expresaron un gen indicador de GFP potenciado bajo el promotor híbrido de β -actina de pollo potenciado por CMV y se produjeron por la transfección transitoria en células 293. Se anestesiaron crías neonatales de día 1 con isoflurano. Entonces se inyectaron 100 μ l de vectores de rAAV (4×10^{11} GC por ratón) a las crías mediante la vena temporal superficial bajo un microscopio de disección. En ratones adultos, el rAAV se administró por inyección en la vena de la cola (se evaluaron dos dosis diferentes 4×10^{11} GC por ratón o 4×10^{12} GC por ratón). Veintiún días después de la inyección, los animales tratados se anestesiaron y se perfundieron transcárdicamente con PBS frío y 4 % (v/v) de paraformaldehído. Se extrajeron los cerebros, se sumergieron en 20 % de sacarosa y se incorporaron en Tissue-Tek OCT. Se cortaron secciones 40 μ m de espesor y se tiñeron en placa de 12 pocillos con anticuerpos primarios, por ejemplo, anti-NeuN, anti-EGFP y anti-GFAP, durante la noche a 4 °C, luego con anticuerpos secundarios durante 2 h a temperatura ambiente. Los ratones de control recibieron inyecciones de PBS.

En el estudio neonatal, se observó la distribución de células EGFP (+) en todo el cerebro 3 semanas después de la infusión. Fueron visibles grandes números de células EGFP (+) con intensidades variables en diferentes regiones de los cerebros de los animales tratados con 10 de los 12 vectores. En muchos casos, el plexo coroideo mostró expresión de EGFP muy fuerte, y aparecieron células del parénquima cerebral transducidas predominantemente en regiones periventriculares. Esto indica que una fracción de los vectores administrados IV pueden entrar en el SNC mediante la interfase flexo coroideo-sangre. En adultos, se observó tinción sustancial de la vasculatura cerebral. Las eficiencias de direccionamiento global por los AAVs a diferentes regiones del cerebro se clasificaron como hipotálamo > bulbo raquídeo > corteza > hipocampo > cerebelo > tálamo. No se detectó expresión de EGFP a altos niveles en ratones neonatales que se administraron con rAAV2 o rAAV5 que albergan el gen indicador EGFP por inyección de 4×10^{11} GC por ratón en la vena temporal superficial (Véase la Tabla 1 y las Figuras 1 y 2 para datos resumen).

También se tiñeron inmunofluorescentemente secciones de tejidos con anticuerpos marcadores anti-EGFP y específicos del tipo de célula para clasificar tipos de células EGFP (+) en el SNC. Mejoró espectacularmente la sensibilidad de detección para las células EGFP (+), particularmente neuronas y oligodendrocitos. Aunque diferentes vectores transdujeron neuronas a eficiencias variables, los 10 vectores (incluyendo AAV9) presentaron tropismos más fuertes para las células no neuronales, especialmente astrocitos. Un vector (AAV7) se dirigió a oligodendrocitos más eficientemente que los otros 9 vectores. Varios rAAVs transdujeron tanto neuronas y/o astrocitos a eficiencias más altas en comparación con rAAV9 (AAVrh.10, rh.34 y rh.43). Se observó una amplia transducción de astrocitos en hipotálamo y bulbo raquídeo. La inyección de ciertos vectores produjo una transducción de neuronas sustancial en diferentes regiones del cerebro, que incluyen neocorteza, hipocampo e hipotálamo. Pareció que algunos vectores transdujeron células de Purkinje en la corteza del cerebelo (por ejemplo, CSp3), mientras que otros transdujeron eficazmente vaso sanguíneo en la neocorteza, tálamo e hipotálamo. Además, los flexos coroideos en el 3^a ventrículo, ventrículo lateral y 4^o ventrículo mostraron una fuerte expresión de EGFP. La expresión de EGFP también

se evaluó en diferentes regiones de la médula espinal de ratones neonatales y adultos (los resultados para los estudios neonatales se muestran en la Figura 3).

5 Se observó la transducción de tejidos no del SNC, tales como el corazón y músculo esquelético (por ejemplo, para AAV9, AAV8 y CSp3). En algunos casos, esto puede conducir a algunos efectos secundarios no deseables. Para tratar esta cuestión, los sitios de unión de miARN se incorporaron en 3' UTR del casete del transgén y se logró el desdiseño altamente específico y eficaz de la transducción de AAV de tejidos no del SNC. Para inhibir la expresión en el hígado, se usaron uniones (uniones) de miARN para mR-122. Para inhibir la expresión en músculo esquelético y corazón, se usaron uniones (uniones) de miARN para mR-1.

Tabla 1: TROPISMOS DEL SNC DE AAV

		AAV1	AAV2	AAV5	AAV6	AAV6.2	AAV7	AAV8	AAV9	rh.10	rh.39	rh.43	CSp3
Adulto	Corteza	+			+	+	++	++	+++	++	+	-	+
	Hipocampo	+			+	+	++	++	+++	++	+	-	+
	Tálamo	+			+	+	++	++	++++	+++	++	+	+
	Hipotálamo	+			++	+	+++	++	++	+++	+++	+	++
	Cerebelo	+			++	+	++	+++	+++	++++	+	+	+
	Tronco encefálico	+			++	+	++	++	++++	+++	++	-	+
	Cervical	+++			+	+	+++	+++	++++	+++	+++	-	+
	Torácica	+++			+	+	+++	+++	++++	+++	++	-	+
	Lumbar	+++			+	+	+++	+++	+++++	+++	++	-	+
Neonatal	Corteza	++	+	-	++	+	+	+++	++	++	++	++	++
	Hipocampo	+	+	-	-	-	+++	++	+	+	++	++	+
	Tálamo	+	+	-	-	+	++	+	+	+	++	+	+
	Hipotálamo	++	-	-	+	+	+++++	+++++	+	+	+++++	+++	-
	Cerebelo	++	-	-	+	-	+	+	+	+	++	+	+
	Tronco encefálico	++	-	-	+	-	++	+	+	+	+++++	+++	+++
	Cervical	-	-	-	+	++	++	+++	++	+++++	++++	+++	++
	Torácica	+	-	-	+	++	+++	++	++	++	++++	+++	+
	Lumbar	+	-	-	+	++	++	+	+	++	+++	+++	+

10 *Grado de tropismo de tejido (- sin tropismo; ++++++ alto tropismo) Basado en los datos en las Figuras 1 y 2.*

Ejemplo 2: Construcción y evaluación de un vector AAVrh.10 recombinante para tratar CD

15 La enfermedad de Canavan (CD) es un trastorno neurodegenerativo heredado producido por mutaciones en el gen aspartoacilasa (ASPA), que conduce a la acumulación de ácido N-acetil-aspartico (NAA) en oligodendrocitos con degeneración esponjosa resultante de materia blanca en el cerebro. Un estudio clínico inicial en la terapia génica de ASPA basada en rAAV2 para CD logró éxito muy limitado. Se cree, sin desear ceñirse a teoría alguna, que una terapia génica de CD eficaz transducirá oligodendrocitos en todo el SNC.

20 Se construye un vector de rAAV que comprende un promotor operativamente unido con una región que codifica la proteína ASPA (SEQ ID NO: 13 o 15) como vector de terapia génica para CD. La construcción emplea CAG (promotor de β-actina de pollo con potenciador del CMV) para conducir la expresión de ASPA que tiene una secuencia codificante como se expone en SEQ ID NO: 14 o 16. El vector de rAAV se encapsula en partículas de rAAV usando el método de transfección triple. Para evaluar su eficacia, se examina rAAV-ASPA en un modelo de ratón inactivado en ASPA de CD para su capacidad para eliminar o atenuar el fenotipo tipo CD de ratones inactivados en ASPA homocigóticos (Matalon R et al. The Journal of Gene Medicine, Volumen 2 Edición 3, Páginas 165 - 175). Los ratones inactivados en ASPA homocigóticos presentan alteración neurológica, macrocefalia, enfermedad generalizada de la materia blanca, actividad de ASPA deficiente y altos niveles de NAA en orina. La imagen por resonancia magnética (MRI) y espectroscopía (MRS) del cerebro de los ratones homocigóticos muestran

cambios en la materia blanca característicos de la enfermedad de Canavan y elevados niveles de NAA. Sirven de controles ratones inactivados en ASPA heterocigóticos, que no tienen fenotipo abierto al nacer.

Ejemplo 3: Eficacia terapéutica y evaluación de la seguridad de un vector de AAV para tratar CD

5 El modelo de ratón de CD es una cepa KO del gen ASPA derivado de C57BL/6. Los ratones KO homocigóticos presentan defectos bioquímicos y neurológicos similares a aquellos observados en pacientes con CD. Ratones CD proporcionan un modelo animal para evaluar la terapia génica y otros terapéuticos para el tratamiento de CD. Se usan ratones CD para estudiar la eficacia y seguridad de las novedosas estrategias de terapia génica para el tratamiento de CD.

Diseño del experimento

10 Para examinar la eficacia terapéutica y seguridad, se investigan vectores de scAAV (por ejemplo, AAV7, AAV8, CSp3 y AAV9) que llevan un casete de expresión de ASPA optimizado en un ensayo de terapia génica preclínica de CD. Los vectores incluyen sitios(s) de unión de miARN para inhibir la expresión de ASPA en tejidos no del SNC. Se tratan tanto animales postnatales de día -1 como adultos de 3 meses de edad con cada vector a dos dosis, 1 y 3 x 10¹⁴ GC/kg por administración intravenosa. Para los ratones CD neonatales, dos camadas de animales reciben cada vector a cada dosis mediante inyecciones de la vena temporal, para el sacrificio de una camada cada una en los momentos de tiempo de 1 y 3 meses. Para los ratones adultos CD de 3 meses de edad, se tratan 12 animales macho con cada vector a cada dosis mediante inyección en las venas de la cola. Seis de los animales tratados se sacrificaron 1 y 3 meses después. En experimentos adicionales, tanto los animales postnatales día -1 como adultos de 3 meses de edad se tratan con vectores a una dosis en un intervalo de 10¹¹ a 10¹² GC/sujeto por administración intraventricular directa.

Mediciones funcionales y neurológicas durante la fase viva del estudio

- 1). Metabolismo de NAA. Se recogen muestras de orina de los animales tratados, de control no tratados y no mutantes en los días 14, 30, 45, 60, 75 y 90. Las muestras se analizan por HPLC para determinar los niveles de NAA.
- 25 2). Acumulación de NAA y retención de agua inducida por NAA en el cerebro. Se realizan estudios de obtención de imágenes neurológicas basadas en MRI/MRS en los animales vivos en todos los grupos de estudio 1, 2 y 3 meses después del tratamiento con vector para medir integrales de picos espectrales para creatina/fosfocreatina y NAA, además de áreas hiperintensas anormales en el cerebro.
- 30 3). Pruebas de la función hepática. Se recogen muestras de suero de los animales en todos los grupos de estudio en los días 14, 30, 60 y 90 para medir los niveles de alanina transaminasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) como indicadores de la toxicidad hepática relacionada con el vector.
- 35 4). Pruebas neurológicas. Temblores, caminar con las patas separadas a un ritmo lento y tembloroso, y ataxia están entre las características neurológicas importantes de los ratones CD. 1, 2 y 3 meses después del tratamiento de terapia génica, los animales en todos los grupos de estudio se someten a un análisis de patrones de marcha por tinción de sus patas con tinta de color y entonces se registran sus patrones de marcha como huellas dactilares sobre papel blanco. Los animales también se prueban y se puntúan en una prueba de barra giratoria para su capacidad para mantener el equilibrio.

Análisis enzimáticos e histopatológicos en los puntos finales del estudio

- 40 1). Actividades de ASPA en el cerebro y tejidos no del SNC. Se analizan la expresión de ASPA específica e inespecífica recogiendo tejidos de cerebro, hígado, corazón y pancreáticos en el momento del sacrificio para medir las actividades de ASPA en los homogeneizados de tejido respectivos.
- 45 2). Materia blanca del cerebro y patologías hepáticas. Para examinar la posible mejora en la patología de la materia blanca del cerebro y la toxicidad hepática relacionada con el vector resultante de la terapia génica, se recogen tejidos de cerebro e hígado y se fijan, se incorporan en parafina y se seccionan, y se tiñen con hematoxilina y eosina. El examen histopatológico se realiza por un patólogo.

Ejemplo 4: Administración de genes terapéuticos a las células del SNC por AAVrh.10

50 Se desarrolló un cribado de diferentes serotipos de AAV para identificar candidatos para una transferencia génica terapéutica al SNC. Se construyó un vector de AAV recombinante que expresaba EGFP. El vector de rAAV se encapsidó en cuatro AAVs diferentes: AAV1, 8, 9 y 10. Se inyectaron ratones adultos con los AAVs en el LCR en la posición lumbar. AAV1, 8 y 9 transdujeron células solo en la proximidad del sitio de inyección en la región lumbar de la médula espinal tras la administración de ~4,8 x 10¹⁰ partículas. Sorprendentemente, AAVrh.10 transdujo células en la materia gris a lo largo de toda la médula espinal y el tronco encefálico tras el mismo protocolo de inyección y dosificación que AAV1, AAV8 y AAV9 (Fig. 4A). Recientemente, se ha mostrado que AAV9 cruza la barrera hematoencefálica (BBB) y transduce células de la médula espinal después de la inyección intravenosa. Se observó

una señal débil en el cerebelo y señales fuertes en los troncos encefálicos y médula espinal. También se observó una señal débil (similar al cerebelo) en el prosencéfalo. Sin desear ceñirse a teoría alguna, se cree que el flujo y difusión de LCR permite que el virus se disemine a lo largo de toda la médula espinal, pero que la capacidad de un virus para circular y difundir depende de la estructura de la cápside viral. Los tipos transducidos de células incluyen neuronas y oligodendrocitos. Pero la mayoría parecen ser astrocitos (Fig. 4B), como se indica por el solapamiento de EGFP con células positivas para GFAP. No se observó solapamiento sustancial con el marcador de la microglía, Iba-1. Se transdujeron varias neuronas motoras como se indica por el solapamiento de la expresión de EGFP y tinción de NeuN. Fue sorprendente que entre los astrocitos, solo aquellos situados en la materia gris se transdujeran y aquellos que estaban situados en la materia blanca y debajo de la piamadre no se transdujeran. Esto fue llamativo debido a que es probable que el virus se exponga a astrocitos en esas áreas ya que se administró en el espacio subaracnoideo.

Ejemplo 5: Construcción de un vector AAVrh.10 recombinante para tratar ELA

Se desarrolló un sistema de AAV recombinante como tratamiento para ELA. Se construyó un vector rAAVrh.10 que expresaba un SOD1 que se dirige a microARN (Figura 5A). Este microARN se identificó como miR-SOD1. La construcción empleó CAG (promotor de β -actina de pollo con potenciador del CMV) para conducir la expresión de EGFP y miR-SOD1 que se localizó en un intrón en la 3'-UTR.

Se evaluó la potencia de silenciamiento de 9 construcciones de miARN. Las construcciones se transfectaron en células HEK293. Después de 48 horas, se aisló ARN y se llevó a cabo transferencia Northern para detectar ARNm de SOD1 (Figura 5B). miR-SOD1#5 (SEQ ID NO: 26) silenció la expresión de SOD1 de la forma más potente. A continuación, miR-SOD1#5 se encapsuló en AAVrh.10 (Figura 5D), que se usó para infectar células HEK293. Se extrajo proteína celular total 43 horas después de la infección y se transfirió para detectar SOD1 (Figura 5C). Se observó inhibición de la expresión de SOD1 al nivel de proteína.

Ejemplo 6: Administración de genes terapéuticos a las células del SNC para tratar ELA

Se produjeron grandes lotes de AAVrh.10-miR-SOD1 y AAVrh.10-miR-Scr (miARN desordenado) usando técnicas convencionales. Se preparó AAV auto-complementario (scAAV) debido a que media en la transducción con mayor eficiencia que AAV monocatenario convencional [14]. Se probó scAAVrh.10 y se encontró que expresaba EGFP más rápidamente (en el plazo de 1 semana) y más fuertemente que un AAV monocatenario.

Se administró AAVrh.10-miR-SOD1 a un grupo de ratones G93A (altos expresores de SOD1) y AAVrh.10-miR-Scr a otro grupo de ratones G93A (n=15). Se inyectó AAVrh.10 por vía intratecal en el LCR en el área lumbar y se inyectó por vía intraventricular en el prosencéfalo en ratones de 60 días de edad ($\sim 4,8 \times 10^{10}$ partículas en 8 μ l).

Se dejó que los animales vivieran su esperanza de vida natural antes de sucumbir a la ELA. La esperanza de vida se comparó entre los dos grupos. Se encontró que los ratones que recibieron el virus AAVrh.10-miR-SOD1, que expresa SOD1miR5 (SEQ ID NO: 26), vivieron en promedio 135 días (± 14 días), mientras que los ratones que recibieron AAVrh.10-miR-Scr, que expresa un miARN desordenado (SEQ ID NO: 31), vivieron en promedio 122 días (± 6 días) (Figura 6B). Además, examinando el grado de la expresión de EGFP en tejido de médula espinal cervical, torácica y lumbar, se observó una correlación en los niveles de expresión en estos tejidos, particularmente con tejido cervical, y la esperanza de vida en ratones tratados con AAVrh.10-miR-SOD1 (Figura 7A), pero no en ratones tratados con AAVrh.10-miR-Scr (Figura 7B). Estos resultados sugieren que silenciar la expresión de SOD1 mutante en la médula espinal cervical es particularmente beneficioso en prolongar la supervivencia. Se perfundió un subconjunto de los animales de cada grupo con fijador, se seccionaron y se tiñeron para SOD1 en la médula espinal. Se detectó SOD1 usando técnicas convencionales [9]. Se redujo la intensidad de tinción de SOD1 en células que expresaban EGFP en comparación con las células no EGFP que se transducen con AAVrh.10-miR-SOD1 (Figura 6A, que muestra inactivación de la expresión de SOD1 en astrocitos). No se observó reducción de la expresión de SOD1 en células transducidas con AAVrh.10-miR-Scr.

Se diseccionaron tejidos de otro subconjunto de animales en ambos grupos para estimar los niveles de transducción. Los niveles de transducción se estimaron determinando el genoma viral contenido usando PCR en muestras de ADN obtenidas de diferentes regiones del SNC y no del SNC. Mediciones en tejidos no del SNC (por ejemplo, hígado) proporcionaron una indicación de si virus se había fugado a la periferia. Se realizaron análisis Northern y Western para medir los niveles de SOD1 en la médula espinal. El anticuerpo usado para la detección de SOD1 fue policlonal, anti-SOD1 humana de oveja, por Bidesign International, N.º de catálogo K90077C.

Ejemplo 7: Protocolo de administración intratecal / intraventricular combinado

Se inyectaron virus AAV en LCR de ratón por inyección intratecal lumbar y/o inyección del tercer ventrículo del cerebro. Las inyección en el espacio subaracnoideo lumbar de los ratones se llevó a cabo usando un método modificado de Wu et al. [22]. Se preparó un catéter delgado (aproximadamente 5 cm) estirando tubo de PE10 hasta el diámetro interno 0,12 mm. La sección estirada se cortó a 1,7 a 1,9 mm, y se hicieron dos perlas (separadas 1 mm) entre las secciones delgada y gruesa calentando y presionando el tubo. Para implantar el catéter, el ratón se anestesió por inyección de avertina (1,2 % de 2,2,2-tribromoetanol en 2 % de alcohol terc-amílico y PBS) por vía intraperitoneal a 0,23 ml/10 g de peso corporal [23]. El catéter se implantó entonces entre las vértebras L5 y L6. El

5 catéter se cosió en el músculo superficial en el área con perlas. Se inyectaron los virus de dosis de $4,80E+10$ copias de genoma (para el cribado de virus, en 6ul) a $2,40E+10$ copias de genoma (para terapia, en 8ul) mediante el catéter por una jeringa Hamilton a una velocidad de 2 ul/minuto. El catéter se selló en el extremo por calor y se dejó en ese sitio durante un día. Se cerró la herida por grapas. La inyección en el tercer ventrículo del cerebro se llevó a cabo usando un instrumento estereotáxico Stoelting y bombas de micro-inyección de World Precision Instruments tras el procedimiento estereotáxico estándar. Se inyectó la misma dosis de virus en el tercer ventrículo a una tasa de 1 ul/minuto.

A continuación se muestran las dosis estimadas para seres humanos y monos y la comparación con inyección IV. Los dos tipos de mono son de tamaño similar.

10 *Tabla 2 - Dosis estimadas para seres humanos y monos*

Especie	LCR promedio ml	Tasa de producción de LCR estimada ml/hora	Dosis estimada (GC)	partículas/g de peso corporal
ratón	0,035	0,018	$2,40E+10$	$1,2E+09$
ser humano	140	21	$9,6E+13$	$1,3E+09$
Macaca mulatta (monos rhesus)	14	2,5	$9,6E+12$	$1,7E+09$
Macaca fascicularis (macaco cinomolgo)	Véase Foust KD, et al., Nature Biotechnology, Volumen 28, Número 3, Marzo de 2010, 271-274		$1,00E+14$	$2,20E+11$

Referencias para los antecedentes y Ejemplos 1-7

1. Daya S, Berns KI: Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. Clin Microbiol Rev 2008, 21:583-593.
- 15 2. Eberling JL, Jagust WJ, Christine CW, Starr P, Larson P, Bankiewicz KS, Aminoff MJ: Results from a phase I safety trial of hAADC gene therapy for Parkinson disease. Neurology 2008, 70:1980-1983.
3. Feigin A, Kaplitt MG, Tang C, Lin T, Mattis P, Dhawan V, Durrant MJ, Eidelberg D: Modulation of metabolic brain networks after subthalamic gene therapy for Parkinson's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007, 104:19559-19564.
- 20 4. Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL, Windsor EAM, Conlon TJ, Sumaroka A, Pang J-j, et al: Human RPE65 Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis: Persistence of Early Visual Improvements and Safety at 1 Year. Hum Gen Ther, 0.
5. Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun J-C, Guillot S, Haase G, Szulc J, Henderson CE, Aebischer P: Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. Nat Med 2005, 11:423-428.
- 25 6. Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH: Retrograde Viral Delivery of IGF-1 Prolongs Survival in a Mouse ALS Model. Science 2003, 301:839-842.
7. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND: VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. Nature 2004, 429:413-417.
- 30 8. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DCP, Wong L-F, Bilsland LG, Greensmith L, Kingsman SM, et al: Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. Nat Med 2005, 11:429-433.
9. Wu R, Wang H, Xia X, Zhou H, Liu C, Castro M, Xu Z: Nerve Injection of Viral Vectors Efficiently Transfers Transgenes into Motor Neurons and Delivers RNAi Therapy Against ALS. Antioxidants & Redox Signaling 2009, 11:1523-1534.
- 35 10. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK: Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. Nat Biotechnol 2009, 27:59-65.

11. Duque S, Joussemet B, Riviere C, Marais T, Dubreil L, Douar AM, Fyfe J, Moullier P, Colle MA, Barkats M: Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol Ther* 2009, 17:1187-1196.
- 5 12. Vandenberghe LH, Wilson JM, Gao G: Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy. *Gene Ther* 2009, 16:311-319.
13. McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, Martins I, Gilmore BL, Burstein H, Peluso RW, Polisky B, et al: Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, 105:5868-5873.
- 10 14. McCarty DM: Self-complementary AAV Vectors; Advances and Applications. *Mol Ther* 2008, 16:1648-1656.
- 15 15. Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G, Cleveland DW: Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006, 312:1389-1392.
- 16 16. Xia X, Zhou H, Huang Y, Xu Z: Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit in vivo. *Neurobiol Dis* 2006, 23:578-586.
- 17 17. Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW: Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2008, 11:251253.
- 20 18. Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K: Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 2007, 10:608-614.
- 19 19. Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S: Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 2007, 10:615-622.
- 25 20. Wang Y, Ou Mao X, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA, Jin K:
 Vascular Endothelial Growth Factor Overexpression Delays Neurodegeneration and
 Prolongs Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *J Neurosci* 2007, 27:304-307.
- 21 21. Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano M-P, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, et al: Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 2005, 8:85-92.
- 30 22. Wu, W. P., Xu, X. J., and Hao, J. X. (2004) *J. Neurosci. Methods* 133, 65-69
23. Papaioannou, V. E., and Fox, J. G. (1993) *Lab. Anim. Sci.* 43, 189-192

Ejemplo 8. rAAV9 administrado por vía sistémica regulado por micro-ARN

Introducción al ejemplo

- 35 Este ejemplo implica el uso de microARNs (miARNs) endógenos específicos de tejido para reprimir la expresión de rAAV fuera del SNC, manipulando sitios de unión de miARN perfectamente complementarios en el genoma de rAAV9. El ejemplo describe virus recombinantes adeno-asociados (rAAVs) que pueden cruzan la barrera hematoencefálica y lograr transferencia génica transvascular eficiente y estable al sistema nervioso central (SNC), mientras que desdiseccionan ciertos otros tejidos (por ejemplo, hígado, corazón, músculo esquelético y otros tejidos).
- 40 Los enfoques descritos en este ejemplo siguieron la regulación multi-tejido simultánea y expresión transgénica estable dirigida al SNC sin perturbar detectablemente la vía de miARN endógeno. La regulación de la expresión de rAAV por miARN fue principalmente mediante escisión específica de sitio del ARNm de transgén, generando fragmentos de ARNm de 5' y 3' específicos.

45 La transferencia génica mediada por virus recombinante adeno-asociado (rAAV), como se desvela en el presente documento, es útil para el tratamiento de un gran número de trastornos neurológicos. Se ha encontrado que los vectores de rAAV desvelados en el presente documento cruzan la barrera hematoencefálica y se expresan específicamente en el SNC. Así, los vectores pueden usarse para la administración intravascular de rAAV para la terapia génica de enfermedades del SNC, que incluyen aquellas que afectan a grandes áreas del cerebro y la médula espinal.

Este ejemplo describe el uso de microARNs (miARNs) endógenos para suprimir la expresión transgénica fuera del SNC. Los miARNs son ARNs no codificantes pequeños que regulan la expresión génica por silenciamiento post-transcripcional. En general, los miARNs pueden silenciar a los genes por dos mecanismos. Cuando son parcialmente complementarios a secuencias de ARNm, normalmente reducen la estabilidad del ARNm diana y la expresión de proteínas (por ejemplo, por dos a cuatro veces o menos), un modo de regulación que se cree que ajusta la expresión de ARNm. A diferencia, cuando los miARNs son casi perfectamente complementarios a sus dianas de ARNm, normalmente provocan la escisión del ARNm, desencadenando su destrucción total.

En particular, este ejemplo describe el uso de miARNs para desdiseñar la expresión de rAAV9 tanto por separado como simultáneamente en el hígado, corazón y músculo esquelético, los tres tejidos que son los más eficazmente elegidos como diana por rAAV9 administrado por vía intravenosa. El silenciamiento de la expresión transgénica en hígado, corazón y músculo se aprovechó de la expresión natural de los abundantes miARNs (≥ 60.000 copias/célula), miR-122, que se expresan en hepatocitos, y miR-1, un miARN encontrado en el corazón y músculo esquelético de prácticamente todos los animales. Se han usado satisfactoriamente sitios de unión de miR-122 para prevenir la hepatotoxicidad de un transgén de un vector de adenovirus. Se manipularon sitios perfectamente complementarios para miR-1, miR-122, o ambos, en la región no traducida 3' (UTR) de un transgén indicador de β -galactosidasa dirigida al núcleo (*nLacZ*) cuya expresión fue conducida por un potenciador del citomegalovirus, el promotor de β -actina de pollo (CB). Este ejemplo presenta múltiples resultados independientes que indican que los miARNs reprimen la expresión de *nLacZ* escindiendo el ARNm de transgén en exactamente el mismo sitio que por todos los ARN pequeños unidos a Argonaute en células eucariotas. Cuando se administra por vía sistémica *in vivo*, el vector de rAAV9 que no eligió como diana miARN expresó satisfactoriamente el transgén indicador en el SNC, pero no el hígado o corazón o músculo esquelético.

Resultados

Los miARN reprimen eficientemente la expresión de gen indicador en células cultivadas

Para evaluar una estrategia para la transducción mediada por rAAV, se introdujeron una o tres copias en tándem de un sitio de unión perfectamente complementario para miR-1 o miR-122 en 3' UTR de *nLacZ* en un vector plasmídico de rAAV. Las construcciones se transfectaron en células HuH7, una línea celular de hepatoma humano que expresa ~ 16.000 copias de miR-122 por célula, y se midió el número de células positivas para *nLacZ*. El número de células HuH7 que expresan *nLacZ* para el plásmido de un sitio fue aproximadamente la mitad de aquellas del control sin sitio; tres sitios redujeron el número de células que expresaban *nLacZ* más de siete veces (Figura 12a).

A continuación, se analizó la expresión de las construcciones de *nLacZ* en células de riñón embrionario humano 293, que expresan naturalmente bajos niveles de tanto miR-122 como miR-1, cuando miR-1 o miR122 se introdujo como pri-miARN de un segundo plásmido. Se transfectaron células 293 con los plásmidos indicadores de *nLacZ* que llevaban 0, 1 o 3 sitios de unión de miR-122 o de miR-1, junto con un plásmido que expresaba tanto pri-miR-122 (Figura 12b) como pri-miR-1 (Figura 12c). Para variar la concentración del miARN, se usó tanto una relación molar baja (1:3) como una alta (1:10) del plásmido del sitio de unión de *nLacZ* con respecto al plásmido de expresión de miARN. Cuando se introdujo miR-122 o miR-1 en las células, la expresión de *nLacZ* se reprimió solo cuando el ARNm indicador de *nLacZ* contuvo los sitios de unión de miARN correspondientes; no hubo reducción de células positivas de *nLacZ* cuando miR-1 se coexpresó con *nLacZ* que contenía sitios de unión de miR-122 o cuando miR-122 se coexpresó con *nLacZ* que contenía sitios de unión de miR-1 (Figura 12b,c).

Los miARNs endógenos específicos de tejido regulan la expresión de rAAV9 administrado por vía sistémica en ratones adultos

Para evaluar la regulación de miARN de vectores de AAV9CB*nLacZ* administrados por vía sistémica *in vivo*, se produjeron vectores de AAV9CB*nLacZ* que llevaban 0, 1 o 3 sitios de unión de miARN perfectamente complementarios a tanto miR-122 como miR-1. Los vectores se administraron por inyección en la vena de la cola a ratones C56BL/6 macho adultos a una dosis de 5×10^{13} copias de genoma por kg (GC/kg) de peso corporal. Cuatro semanas después, se examinaron el hígado y el corazón de los animales transducidos. La tinción de LacZ reveló que el transgén *nLacZ* se silenció por los miARNs endógenos en el tipo de célula y órgano en el que se expresaron predominantemente: el transgén se silenció específicamente por miR-122 en el hígado y por miR-1 en el corazón (Figura 13a,b). Mientras que las células positivas para *nLacZ* se redujeron en los hígados de los animales tratados con rAAV9CB*nLacZ* que llevaban uno o tres sitios de unión de miR-122, los niveles de expresión de *nLacZ* en los corazones de los mismos animales fueron similares a aquellos en los animales tratados con AAV9CB*nLacZ* que no llevaban sitios (Figura 13a). Similarmente, no se detectó expresión de *nLacZ* en los corazones de los animales que recibieron AAV9CB*nLacZ* que contiene uno o tres sitios de unión de miR-1, pero no se afectó la expresión de *nLacZ* en los hígados de los mismos animales en comparación con aquella en el animal de control (Figura 13b). Estos datos sugieren que cuanto mayor sea el número de sitios para un miARN en rAAV, menor es la expresión de *nLacZ* en el tejido donde se expresó el miARN correspondiente (Figura 13a,b).

A continuación, para evaluar si el silenciamiento del transgén podría lograrse simultáneamente en múltiples tejidos, se insertaron diferentes números de tanto sitios de unión de miR-122 como de miR-1 en 3' UTR del genoma de rAAV9CB*nLacZ* y se examinaron para su expresión en ratones transducidos con rAAV9. La tinción histoquímica de

secciones de tejidos mostró que la expresión de nLacZ se suprimió en tanto el corazón como el hígado para rAAV9CbnLac que contenía una o tres copias de cada uno de los sitios de unión de miR-1 y de miR-122, pero nLacZ fue fácilmente detectable en el páncreas, donde la expresión de tanto miR-122 como de miR-1 fue baja (Figura 13c). Ensayos cuantitativos de β-galactosidasa de tejido de hígado homogenizado mostraron similarmente que la expresión de nLacZ era significativamente más baja cuando el transgén contuvo los sitios de unión de miARN (un sitio de unión de miR-122: $7,8 \pm 7,4$ %, valor de P = 0,005; tres sitios de unión de miR-122: $1,6 \pm 1,0$ %, valor de P = 0,005; un sitio de unión de miR-1 más uno de miR-122: $8,6 \pm 5,7$ %, valor de P = 0,005; tres sitios de unión de miR-1 más tres de miR-122: $3,1 \pm 1,2$ %, valor de P = 0,005; tres sitios de unión de miR-1: $105,7 \pm 11,6$ %) (Figura 13d).

La represión por miARN de la expresión de rAAV no perturba las vías de miARN endógeno

10 Se ha informado que transgenes altamente expresados que llevan sitios complementarios de miARN promueven la degradación del miARN correspondiente. Se determinaron los niveles de miR-122, miR-22, miR-26a y *let-7* en hígado transducido con rAAV. No se detectó diferencia en la abundancia de los cuatro miARNs entre los tres grupos de estudio (Figura 14a). Además, datos de análisis de secuenciación de alto rendimiento de ARN pequeño de los hígados de un animal de cada uno de los grupos de estudio no muestran cambio en los niveles de miARN.

15 Con el fin de determinar si los sitios de unión de miARN en los transcritos de transgenes desregularían la expresión de los ARNm diana endógenos conocidos de miR-122 o miR-1, se analizaron la expresión de ciclina G1, una diana de miR-122 en el hígado (Figura 14b,c) y calmodulina, una diana de miR-1 en el corazón (Figura 14d). No se detectó alteración significativa en la expresión de ciclina G1 o calmodulina. miR-122 regula la biosíntesis del colesterol en el hígado, y los agentes que bloquean la función de miR-122 pueden producir cambios fácilmente detectables en los niveles de colesterol en suero. No se detectó cambio en los niveles de colesterol total, lipoproteína de alta densidad o lipoproteína de baja densidad en los ratones 4 semanas después de la transducción con tanto rAAV9 de control como rAAV9 que expresaba un transgén que lleva sitios de unión de miR-122 (Figura 14e). Se concluyó que en este ejemplo el desdiseñamiento mediado por miARN de la expresión de rAAV no tuvo efecto detectable sobre la expresión o función de miARN endógeno.

25 *ARNms endógenos silencian la transducción de rAAV por escisión específica de sitio de ARNm de transgén*

Para determinar cómo los miARNs suprimen la expresión de transgenes administrados por rAAV *in vivo*, se caracterizó el ARNm de transgén en hígado por PCR convencional (Figura 15b), PCR cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR) (Figura 15c), hibridación Northern (Figura 15d,e) y amplificación rápida de extremos 5' de ADN complementario (ADNc) (5' RACE; Figura 15f). Cuando se usaron cebadores que amplificaban la región entre el extremo 3' de nLacZ (cebador A⁺F) y el extremo 5' de la señal de poli(A) (cebador A⁺R), se detectó un amplicón que abarcaba los sitios de unión de miARN, un producto de 145 pares de bases (pb) después de 26 ciclos de amplificación para las muestras que recibieron rAAV de control. Se requirieron seis ciclos de amplificación adicionales para detectar una débil banda de 220 pb para las muestras transducidas por rAAV que contenían tres sitios de unión de miR-122. Estos datos están de acuerdo con los bajos niveles de ARNm intacto de nLacZ- (Figura 15a,b).

Para evaluar cuantitativamente el grado de la represión dirigida por miARN de los transcritos de transgenes, se realizó qRT-PCR usando tanto oligo(dT) como cebadores de hexámero al azar para la transcripción inversa y pares de cebadores de PCR que abarcaban tanto una región 5' (nLacZ5'F/5'R) como 3' (nLacZ 3'F13'R) de la secuencia codificante de nLacZ (Figura 15a). Se examinaron los niveles de ARNm de nLacZ con extremos 5' y 3' intactos en ARN de hígado total extraído de cuatro animales que recibieron el rAAV de control V9CbnLacZ y cuatro que recibieron rAAV9CbnLacZ que contiene tres sitios de unión de miR-122 en 3' UTR. Se observaron reducciones que oscilan de 3 ± 1 (hexámero al azar) a 7 ± 1 (oligo[dT]) veces en ARNm de nLacZ con un extremo 3' intacto en los animales que habían recibido rAAV9 que contiene sitios de unión de miR-122, con respecto al control. A diferencia, se detectó poca o ninguna disminución en el ARNm de nLacZ con un extremo 5' intacto para las mismas muestras usando el par de cebadores 5'F/5'R (Figura 15c). Estos resultados indican que el modo primario de recuperación del ARNm que se ha escindido por un miARN fue la degradación exonucleolítica de 3' a 5'.

Para caracterizar adicionalmente el destino del ARNm de transgén dirigido por miR-1 o miR-122, se realizaron análisis de transferencia Northern. Una sonda de transgén que se une al extremo 5' de ARNm de nLacZ detectó un ARN de ~3,4 kb en un animal inyectado con rAAV9CbnLacZ de control, el tamaño esperado del transcrito nLacZ de longitud completa; se detectó una banda ligeramente más grande en la muestra de hígado de un ratón tratado con rAAV9CbnLacZ que llevaba tres sitios de unión de miR1 (Figura 15a,d). A diferencia del transcrito individual detectado para el rAAV9 que expresa nLacZ que lleva tres sitios de unión de miR-1, se detectaron dos ARN de diferentes tamaños para el rAAV que expresa nLacZ que lleva tres sitios de unión de miR-122 (Figura 15d).

Las longitudes de estos transcritos indican que el transcrito más largo probablemente representa el ARNm de longitud completa, mientras que el transcrito más corto más abundante se corresponde con fragmentos de 5' de ARN de nLacZ escindido por miR-122 en los sitios de unión de miR-122 correspondientes en 3' UTR (Figura 15d).

Para confirmar esta observación, se repitió el análisis Northern usando una sonda de ARN que abarcaba una porción de 3' UTR del ARNm de transgén. Además de detectar transcritos de nLacZ de longitud completa en las

muestras transducidas por rAAV9 que carecían de sitios de unión de miARN, se detectaron dos especies que migraban próximas más pequeñas que el marcador de ARN de 281 nucleótidos. El tamaño de estos fragmentos estuvo de acuerdo con los productos de escisión de 3' dirigidos al miARN del ARNm de *nLacZ* (Figura 15e). Estos dos productos de escisión de 3' también se detectaron por electroforesis en gel del producto del experimento de 5' RACE descrito más adelante (Figura 15f).

Para determinar si tal escisión de diana se produce *in vivo* cuando el transcrito de *nLacZ* contienen sitios de unión de miR-1 o de miR-122, se realizó amplificación rápida de extremos 5' de ADNc (5' RACE). La Figura 16 presenta las secuencias de 21 clones recuperados usando 5' RACE de ARN de hígado (Figura 16a) y 22 clones aislados de ARN de corazón (Figura 16b) de los animales inyectados con rAAV9 en los que 3' UTR de *nLacZ* contuvo tres sitios de unión de miR-1 y tres de miR-122. En hígado, se detectaron los distintivos de secuencia para la escisión dirigida por miR-122 del ARNm de transgén en cada sitio de unión de miR-122: 5 % para el primer sitio de unión, 48 % para el segundo sitio de unión y 43 % para el tercer sitio de unión. Todos los extremos 5' se mapearon con el fosfato que se encuentra entre los nucleótidos diana que se emparejan con las posiciones 10 y 11 de la secuencia perfectamente complementaria a miR-122, el sitio preciso se escindió por ARNs pequeños unidos a proteínas Argonaute en todos los eucariotas (Figura 17a). Se obtuvieron resultados similares en el corazón para los sitios miR-1 (Figura 17b).

La Tabla 3 presenta un análisis de 5' RACE ampliado para grupos de vectores adicionales. Se observó que ninguno de los productos de 5' RACE secuenciados se correspondió con la escisión específica de sitio dirigida por miR-1 en hígado o la escisión específica de sitio dirigida por miR-122 en corazón (Tabla 3). Aunque no se detectó escisión dentro de los sitios de unión de miR-1 en el hígado, algunos clones del corazón se escindieron dentro de los sitios de unión de miR-122, pero no en la posición distintiva para la escisión dirigida por miARN.

rAAV9 administrado por vía intravascular puede ser eficientemente controlado por miARNs endógenos

Se añadieron sitios de unión de miARN-1 y miARN-122 en el genoma de vector de GFP potenciado de scAAV9CB (EGFP) y se inyectaron ratones macho C57BL/6 de 10 semanas de edad con 2×10^{14} GC/kg. Después de 3 semanas, se prepararon secciones de 40 μ m de cerebro y médula espinal y secciones de 8 μ m de hígado, corazón y músculo esquelético y se examinaron para la expresión de proteína EGFP. Se encontró que scAAV9CBEGFP administrado por vía intravenosa se transdujo eficientemente en el SNC; EGFP fue fácilmente detectable en la región del tálamo del cerebro y la región cervical de la médula espinal, pero también en tejidos no del SNC tales como hígado, corazón y músculo (Figura 17a). A diferencia, la expresión transgénica en aquellos tejidos no del SNC se redujo cuando los sitios de unión de miR-1 y de miR122 se incluyeron en el transgén; la expresión de EGFP no se alteró en el SNC, donde miR-1 y miR-122 no estaban presentes (Figura 17a). Se usó RT-PCR cuantitativa para medir la expresión diferencial del transgén de EGFP reprimido en miARN en cerebro ($41,2 \pm 7,7$ %), hígado ($3,0 \pm 0,5$ %), corazón ($0,4 \pm 0,1$ %) y músculo ($1,3 \pm 0,4$ %), con respecto al transgén de EGFP que carecía de sitios de unión de miARN (Figura 17b). Para eliminar cambios asociados a la eficiencia de transducción entre experimentos, los datos se normalizaron al número de genomas de vector detectados en las muestras experimentales y de control. Similar a los análisis microscópicos de la expresión de EGFP nativa, los datos de qRT-PCR muestran que la presencia de sitios de unión de miR-122 o de miR-1 redujeron la expresión transgénica en el hígado (20 veces), corazón (100 veces) y músculo (50 veces), pero no alteraron detectablemente la expresión transgénica en cerebro.

Discusión de resultados

Este ejemplo muestra que rAAV9 puede manipularse de manera que los miARNs endógenos repriman la expresión transgénica fuera del SNC. Los resultados indican que tales rAAV9s manipulados pueden usarse en terapias para la degeneración de neuronas asociadas a enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, expresando factores neurotróficos de crecimiento tales como el factor de crecimiento similar a la insulina, factor neurotrófico derivado del cerebro o factor neurotrófico derivado de la glía en los astrocitos transducidos. Este enfoque elimina o reduce la expresión no del SNC derivada de los tejidos periféricos transducidos por rAAV9 administrado por vía sistémica.

El lograr la expresión transgénica en principalmente solo los tejidos diana es una consideración para el desarrollo clínico de administración génica al SNC segura. Los resultados en este ejemplo indican que miARNs endógenos pueden ser empleados para limitar la especificidad tipo tejido y célula de la expresión de rAAV, como se mostró inicialmente para vectores lentivirales. Los datos demuestran que los miARNs endógenos pueden reprimir eficazmente la expresión transgénica de rAAV. En tanto corazón como hígado, los miARNs reprimieron la expresión transgénica dirigiendo la escisión endonucleolítica del ARNm de transgén (Figura 18). La regulación de miARN de la expresión de rAAV no perturbó la expresión o función del miARN endógeno correspondiente, permitiendo que la expresión transgénica se limitara al SNC en ratones. El ejemplo indica que una estrategia que combina múltiples sitios de unión para miARNs expresados en la periferia, pero no el SNC, es útil para el desarrollo de vectores de terapia génica específicos del SNC más seguros.

Materiales y métodos

Diseño de vector, construcción y producción. Se diseñaron sitios de unión de miARN perfectamente complementarios basándose en las secuencias de miR-1 y miR-122 indicadas en miRBase y se insertaron en el sitio

de restricción *BstBI* en 3' UTR del casete de expresión de nLacZ del plásmido de β -galactosidasa dirigida al núcleo (nLacZ) de pAAVCB ubicuamente expresado usando oligonucleótidos sintéticos (Figura 15a y Tabla 3). Este vector usa un casete híbrido de potenciador del citomegalovirus / promotor de CB que es activo en la mayoría de las células y tejidos. Para expresar miR-122 y miR-1, se amplificaron por PCR fragmentos de pri-miR-122 y pri-miR-1 de ADN genómico de ratón C57/B6 (Tabla 4) y se insertó en el sitio de restricción XbaI 3' con respecto a un ADnC de luciferasa de luciérnaga en el plásmido pAAVCBELuc. La identidad de cada pri-miARN se verificó por secuenciación. Los vectores de AAV9 usados en este estudio se generaron, purificaron y valoraron.

Cultivo celular y transfección. Se cultivaron células HEK-293 y HuH7 en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con 10 % de suero bovino fetal y 100 mg/l de penicilina-estreptomina (Hyclone, South Logan, UT). Las células se mantuvieron en una estufa de incubación humidificada a 37 °C y 5 % de CO₂. Los plásmidos se transfectaron transitoriamente usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante.

Estudios de ratón. Se obtuvieron ratones C57BL/6 macho (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) y se mantuvieron. Para monitorizar los perfiles de lípidos de los animales del estudio, se recogieron muestras de suero 4 semanas después de la inyección de rAAV9 y se analizaron para colesterol total, lipoproteína de alta densidad y lipoproteína de baja densidad en un analizador COBAS C 111 (Roche Diagnostics, Lewes, RU). Para evaluar la transferencia génica de EGFP limitada al SNC mediada por miARN endógeno, ratones C57BL/6 macho de 10 semanas de edad se inyectaron por vía intravenosa (vena de la cola) con AAV9CBnLacZ-[sitio de unión de miR-122 (BS)]₁. AAV9CBnLacZ-(miR-122BS)₃. AAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₁. AAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃. AAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₁-(miR-122BS)₁ y AAV9CBnLacZ-(miR-1BS)₃-(miR-122BS)₃, respectivamente, a 5×10^{13} GC/kg de peso corporal) o scAAV9CBEGFP a 2×10^{14} GC/kg de peso corporal). Los animales que recibieron vectores de nLacZ se sacrificaron 4 semanas después; se prepararon criosecciones de 8 μ m de tejidos de hígado, corazón y páncreas para tinción histoquímica con X-gal. Los animales que recibieron vectores de EGFP se sacrificaron 3 semanas después y se fijaron por perfusión transcardíaca con 4 % (peso/vol) de paraformaldehído. Se recogieron cerebro, médula espinal, hígado, corazón y músculo para crioseccionamiento. Se tiñeron tejido de cerebro y de médula espinal cervical como secciones flotantes en una placa de 12 pocillos usando anticuerpos anti-EGFP de conejo (Invitrogen) diluidos 1:500, seguido de anticuerpo secundario anti-conejo de cabra (Invitrogen) diluido 1:400. Fuera del SNC, la expresión de EGFP se detectó directamente por fluorescencia. Se registró la fluorescencia de EGFP y de anticuerpo usando un microscopio invertido Nikon TE-2000S a x10 aumentos y un tiempo de exposición de 3 segundos para hígado, corazón y músculo, y 5 segundos para tálamo (cerebro) y médula espinal cervical.

Cuantificación de genomas de vector por qPCR. Se extrajo ADN de genoma de los tejidos seleccionados usando el minikit de ADN QIAamp (Qiagen, West Sussex, RU), según las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo PCR cuantitativa por triplicado usando ADN de Ring y 0,3 μ mol/l de cebadores específicos de EGFP (EGFP-F y EGFP-R) usando la mezcla madre GoTaq qPCR (Promega, Madison, WI) en un instrumento de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de qRT-PCR. Se extrajo ARN usando Trizol (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Se cebó el ARN total (0,5-1,0 μ g) con hexámeros al azar u oligo(dT) y se transcribieron de forma inversa con transcriptasa inversa MultiScribe (Applied Biosystems). Se realizaron PCR cuantitativas por triplicado con 0,3 μ mol/l de pares de cebadores específicos de gen (nLacZ5'F/5'R, nLacZ 3'F/3'R, ciclina G1F/R y EGFP-F/EGFP-R) usando la mezcla madre GoTaq qPCR en un dispositivo de PCR en tiempo real StepOne Plus. La especificidad de los productos de qRT-PCR derivados de los extremos 5' y 3' de ARNm de nLacZ se confirmó por electroforesis en gel.

Análisis de transferencia Northern. Se extrajo ARN total de hígado de ratón y se analizó por hibridación Northern. Para detectar ARNm de nLacZ, un fragmento de 618 pb de ADnC de nLacZ se aisló por digestión por NcoI y PciI de pAAVCBnLacZ y se marcó con α -³²P dCTP por cebado al azar (Takara, Shiga, Japón). Para detectar fragmentos de 3' del ARNm de nLacZ escindido, un fragmento de 111 pb de la secuencia de poli(A) en el genoma de vector se clonó en pCR4-TOPO (Invitrogen) para la preparación de sonda de ARN antisentido marcada con α -³²P CTP durante la transcripción *in vitro* usando el kit Riboprobe System T7 (Promega). Para detectar miR-122, miR-26a, miR-22 y let-7 o U6 en ARN de hígado total, se resolvieron ARN pequeños desnaturalizando geles al 15 % de poliacrilamida, se transfirieron a la membrana Hybond N+ (Amersham BioSciences, Pittsburgh, PA) y se reticularon con 254 nm de luz (Stratagene, La Jolla, CA). Se usaron oligonucleótidos sintéticos, se marcaron en el extremo 5' con γ -³²P ATP usando T4 polinucleótido cinasa (New England Biolabs, Beverly, MA), como sondas de ADN (Tabla 4) y se hibridaron en tampón Church (0,5 mol/l de NaHPO₄, pH 7,2, 1 mmol/l de EDTA, 7 % (peso/volumen) de dodecilsulfato de sodio) a 37 °C. Las membranas se lavaron usando 1 x SSC (cloruro sódico 150 mM, citrato de sodio 15 mM), 0,1 % de tampón dodecilsulfato de sodio, y luego se visualizaron usando FLA-5100 Imager (Fujifilm, Tokio, Japón).

Análisis de transferencia Western. Se extrajeron proteínas con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación [25 mmol/l de Tris-HCl, pH 7,6, 150 mmol/l de NaCl, 1 % (vol/vol) de NP-40, 1 % (peso/vol) de desoxicolato de sodio, 0,1 % (peso/volumen) de dodecilsulfato de sodio] que contenían una mezcla de inhibidores de la proteasa (Boston PB, Boston, MA). La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford (Bio-Rad, Melville, NY). Se cargaron muestras de proteína, 50 μ g cada una, sobre geles al 12 % de poliacrilamida, se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Amersham BioSciences). Brevemente, las membranas

ES 2 605 305 T3

- se bloquearon con tampón de bloqueo (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de incubación con tanto anti-GAPDH (Millipore, Billerica, MA), anti-ciclina G1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o anti-calmodulina (Millipore) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS que contenía 0,1 % (vol/vol) de Tween-20, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con LI-COR IRDye durante 1 hora a temperatura ambiente, y entonces los anticuerpos se detectaron usando Odyssey Imager (LI-COR).
- 5 *Ensayo de β -galactosidasa.* Se extrajeron proteínas con tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación y se cuantificaron como se ha descrito anteriormente. Se usaron cincuenta microgramos de proteína para cada ensayo de β -galactosidasa usando el sistema Galacto-Star (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante.
- 10 *5' RACE.* Se realizó 5' RACE como se ha descrito. Se usaron el cebador Outer de 5' RACE y el cebador específico del gen *nLacZ* bGHPolyAR (Tabla 4) para la primera ronda de PCR anidada. Se usaron el cebador Inner de 5' RACE y el cebador específico del gen *nLacZ* nLacZpolyR, que se localiza cerca del codón de terminación de ADNc de *nLacZ*, para la segunda ronda de PCR anidada (Tabla 4). Los productos de PCR se clonaron en TOPO en pCR-4.0 (Invitrogen) y se secuenciaron.
- 15 *Análisis estadístico.* Todos los resultados se informan como media \pm DE y se compararon entre grupos usando la prueba de la t de Student bilateral.

Tabla 3 Resumen de escisión de ARNm de transgén guiada por microARN en hígado y corazón de ratón

		Sitio de escisión						
Escisión de miR BS	Posición	Entre 10 y 11 nt		Entre 17 y 18 nt		Entre 18 y 19 nt		Sitio al azar
Hígado 1 Copia de miR-122 BS (21 clones)	1	17/21	81 %	ND		ND		19 %
3 Copias de miR-122 BS (11 clones)	1	ND	100 %	ND		ND		0 %
	2	4/11						
	3	7/11						
3 Copias de cada uno de miR-1 y miR-122 miR-1 3x BS	1	ND	ND	ND		ND		0 %
BS en un único vector (21 clones)	2	ND						
	3	ND						
miR-122 3x BS	1	1/21	95 %	ND		ND		5 %
	2	10/21						
	3	9/21						
Corazón 1 Copia de miR-1 BS (12 clones)	1	12/12	100 %	ND		ND		0 %
3 Copias de miR-1 BS (21 clones)	1	ND	80 %	4/21	20 %	ND		0 %
	2	16/21		ND				
	3	1/21		ND				
3 Copias de cada uno de miR-1 y miR-122 miR-122 3x BS	1	ND	ND	ND		1/22	14 %	4 %
BS en un vector único (22 clones)	2	ND				1/22		
	3	ND				ND		
miR-1 3x BS	1	1/22	73 %	ND	9 %	ND		0 %
	2	7/22		1/22				
	3	8/22		1/22				

Tabla 4. Cebadores y sondas de oligonucleótidos usados en el Ejemplo 8.

Oligonucleótidos	Secuencia	SEQ ID NO
(miR-1) ₁ sentido	[PHOS]CGAAATACATACTTCTTTACATTCC ATT	SEQ ID NO: 32
(miR-1) ₁ antisentido	[PHOS]CGAATGGAATGTAAAGAAGTATGT ATTT	SEQ ID NO: 33
(miR-122) ₁ sentido	[PHOS]CGAAACAAACACCATTGTCACACT CCATT	SEQ ID NO: 34
(miR-133) ₁ antisentido	[PHOS]CGAATGGAGTGTGACAATGGTGT TGTT	SEQ ID NO: 35
(miR-1) ₃ sentido	[PHOS]CGAAATACATACTTCTTTACATTCC AATACATACTTCTTTACATTCCAATACATA CTTCTTTACATTCCATT	SEQ ID NO: 36
(miR-1) ₃ antisentido	[PHOS]CGAATGGAATGTAAAGAAGTATGT ATTGGAATGTAAAGAAGTATGTATTGGAA TGAAAGAAGTATGTATT	SEQ ID NO: 37
(miR-122) ₃ sentido	[PHOS]CGAAACAAACACCATTGTCACACT CCAACAAACACCATTGTCACACTCCAACA AACACCATTGTCACACTCCATT	SEQ ID NO: 38
(miR-122) ₃ antisentido	[PHOS]CGAATGGAGTGTGACAATGGTGT TGTTGGAGTGTGACAATGGTGTGTTGG AGTGTGACAATGGTGTGTTGTT	SEQ ID NO: 39
(miR-1) ₁ -(miR-122) ₁ sentido	[PHOS]CGAAATACATACTTCTTTACATTCC AACAAACACCATTGTCACACTCCATT	SEQ ID NO: 40
(miR-1) ₁ -(miR-122) ₁ antisentido	[PHOS]CGAATGGAGTGTGACAATGGTGT TGTTGGAATGTAAAGAAGTATGTATT	SEQ ID NO: 41
Fragmento (miR-1) ₃ - (miR-122) ₃ sintetizado	TTCGAACTCGAGATACATACTTCTTTACAT TCCAATACATACTTCTTTACATTCCAATAC ATACTTCTTTACATTCCACCATGGACTAGT ACAAACACCATTGTCACACTCCAACAAAC ACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATT GTCACACTCCAGCGGCCGCTTCGAA	SEQ ID NO: 42
Pri-miR-122F	ATCGGGCCCGACTGCAGTTTCAGCGTTTG	SEQ ID NO: 43
Pri-miR-122R	CGCGGGCCCGACTTTACATTACACACAAT	SEQ ID NO: 44
Pri-miR-1F	CGCGGGCCCGACTGATGTGTGAGAGAGAC	SEQ ID NO: 45
Pri-miR-1R	CGCGGGCCCGACTTTCGGCCTCCCGAGGC	SEQ ID NO: 46
NLacZ5 ϕ F(5 ϕ F)	TGAAGCTGAAGCCTGTGATG	SEQ ID NO: 47
nLacZ 5 ϕ R(5 ϕ R)	GAGCACCTGACAGCATTGAA	SEQ ID NO: 48
nLacZ3 ϕ F(3 ϕ F)	CTCAGCAACAGCTCATGGAA	SEQ ID NO: 49
nLacZ3 ϕ R(3 ϕ R)	TTACTTCTGGCACCACACCA	SEQ ID NO: 50
nLacZpolyF(A ⁺ F)	TGGTGTGGTGCCAGAAGTAA	SEQ ID NO: 51
nLacZpolyR(A ⁺ R)	CAACAGATGGCTGGCAACTA	SEQ ID NO: 52
bGHPolyAR(bGH ⁺ AR)	TGGGAGTGGCACCTTCCA	SEQ ID NO: 53
EGFP-F	CGACCACTACCAGCAGAACA	SEQ ID NO: 54
EGFP-R	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	SEQ ID NO: 55

Oligonucleótidos	Secuencia	SEQ ID NO
Ciclina G1F	AATGGCCTCAGAATGACTGC	SEQ ID NO: 56
Ciclina G1R	AGTCGCTTTCACAGCCAAAT	SEQ ID NO: 57
MM-Actina F	ATGCCA ACACAGTGCTGTCTGG	SEQ ID NO: 58
MM-Actina R	TGCTTGCTGATCCACATCTGCT	SEQ ID NO: 59
Sonda de miR-122	TGGAGTGTGACAATGGTGTGTTG	SEQ ID NO: 60
Sonda de Let-7	AACTATACAACCTACTACCTCA	SEQ ID NO: 61
Sonda de miR-26a	AGCCTATCCTGGATTACTTGAA	SEQ ID NO: 62
Sonda de miR-22	ACA GTT CTT CAA CTG GCA GCT T	SEQ ID NO: 63
Sonda de U6	CTCTGTATCGTTCCAATTTTAGTATA	SEQ ID NO: 64

Ejemplo 9: La inyección intravenosa de rAAVs medió en la amplia transducción en el SNC de ratón neonatal

Introducción al ejemplo

Este ejemplo describe un análisis de nueve vectores de scAAV para propiedades de transferencia génica al SNC después de la administración sistémica. Este estudio implicó identificar vectores más eficaces para la transferencia génica al SNC, el estudio examinó serotipos o variantes naturales de rAAVs para la permeación potenciada de la BBB. En algunos casos, el estudio buscó identificar vectores de rAAV con administración mejorada de proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) al SNC tras la inyección en la vena facial en el día 1 postnatal (P1). Se incluyó AAV9 en el estudio. Excepto por rAAV2 y rAAV5, los otros 7 vectores cruzaron la BBB con eficiencia de transducción variable, entre los que rAAVrh.10, rAAVrh.39, rAAVrh.43, rAAV9 y rAAV7 se clasificaron en los 5 primeros, que mediaron en una robusta expresión de EGFP en tanto células neuronales como de la glía en todo el SNC en este estudio. El rendimiento de rAAVrh.10 fue comparable al de rAAV9 y en algún caso mejor. Varios rAAVs transducen eficientemente neuronas, neuronas motoras, astrocitos y células de Purkinje; entre ellos, rAAVrh.10 es al menos tan eficiente como rAAV9 en muchas de las regiones examinadas. rAAVs administrados por vía intravenosa no produjeron microgliosis anormal en el SNC. Los rAAVs que logran una amplia transferencia génica estable del SNC son útiles como vectores terapéuticos para trastornos neurológicos que afectan a grandes regiones del SNC, además de herramientas biológicas convenientes para la investigación neurocientífica.

Resultados

Veintiún días después de la administración del vector en ratones P1, se compararon los perfiles de transducción del SNC de los siguientes vectores de AAV recombinantes que codifican EGFP: rAAV1, rAAV2, rAAV5, rAAV6, rAAV6.2, rAAV7, rAAV9, rAAVrh.10, rAAVrh.39 y rAAVrh.43. Los vectores usados en este estudio fueron comparables en pureza e integridad morfológica (Figura 19). Como se evalúa por el sistema de puntuación descrito en los métodos, rAAV9 estuvo entre los principales intérpretes; la mayoría de los otros rAAVs probados (rAAV1, rAAV6, rAAV6.2, rAAV7, rAAVrh.10, rAAVrh.39 y rAAVrh.43) también dieron lugar a la expresión de EGFP en todo el SNC (Tabla 2). El número de células positivas para EGFP evidente (Tabla 5) entre estructuras sub-anatómicas estuvo influido por el vector particular usado. Para estos siete rAAVs, y rAAV9 (total de ocho rAAVs), que permearon en la BBB y realizaron la transducción del SNC después de la administración i.v., se encontraron células positivas para EGFP en el hipotálamo, seguido de bulbo raquídeo, estriado, hipocampo, corteza y cerebelo. A diferencia, la eficiencia de transducción en el bulbo olfativo y el tálamo fue relativamente baja (Tabla 5). Se hizo una evaluación cuantitativa de la eficiencia de la transferencia génica de EGFP de cada rAAV. Se seleccionaron 12 regiones sub-anatómicamente y funcionalmente importantes en el cerebro para el análisis cuantitativo de la intensidad/píxel de EGFP media en cada región para cada rAAV usando el software Nikon NIS elements AR V. 32 (Figura 19a) (véase Métodos). Para los ocho vectores que lograron la transducción del SNC después de la inyección i.v., la intensidad/píxel de EGFP media fue relativamente baja en la corteza, núcleo habenular, asta de Amón, giro dentado, tálamo, cerebelo y bulbo olfativo, moderado en flexo coroideo y caudado-putamen, pero alto en hipotálamo, bulbo raquídeo y amígdala (Figura 19a). Se compararon las intensidades promedio de EGFP de todas las 12 regiones para diferentes rAAVs en la Figura 19b. Se observaron AAVrh.10, AAVrh.39 y AAVrh.43 para la eficiencia genética de la transducción en cerebro, seguido de AAV7, AAV9 y AAV1 (Figuras 19a y 19b). Aquellos ocho serotipos eficaces también mediaron en la expresión de EGFP en toda la médula espinal, a diferentes grados. Se realizó el mismo análisis cuantitativo para cada rAAV en las secciones cervical, torácica y lumbar de la médula espinal (Figura 19a); también se compararon las intensidades promedio de EGFP de las tres secciones para diferentes rAAVs (Figura 19b). AAV1, AAV9, AAVrh10, AAV.rh39 y AAV.rh43 presentaron una fuerte transducción en la médula espinal con alta intensidad de EGFP observada en el cuello uterino, seguido de las secciones torácica y lumbar de la médula espinal (Figuras

19a y 19b). Para rAAV2 hubo algunas células positivas para EGFP en el hipocampo, corteza e hipotálamo. Se observaron células positivas para EGFP en el hipotálamo en ratones inyectados con AAV5. Se proporciona a continuación una descripción de las observaciones hechas en diferentes estructuras del SNC. Las estructuras del SNC subanatómicas pueden servir de diana para la terapia génica del SNC. En algunos casos, las estructuras del SNC subanatómicas están asociadas a cambios patológicos en uno o más trastornos neurológicos. En algunos casos, las estructuras del SNC subanatómicas tienen perfiles de transducción distintos para uno o más rAAVs.

Estriado. La patología del estriado está asociada a enfermedad de Huntington, coreas, coreoatetosis y discinesias. La drogadicción puede implicar plasticidad en las sinapsis estriatales. La inyección sistémica de rAAV9 en ratones neonatales transduce tejido estriatal. En este estudio, un gran número de células con morfología neuronal en esta región también se transdujeron por rAAVrh.10 (Figura 20), que se confirmó por co-tinción con un marcador neuronal como se describe a continuación. Otros vectores, que incluyen rAAVrh.39 y rAAV7, también mediaron en la transducción moderada en el estriado (Figura 20). A diferencia, rAAV6, rAAV6.2 y rAAV1 produjeron expresión de EGFP relativamente baja en esta estructura (Figura 20).

Hipocampo. El hipocampo es una región asociada a memoria a largo plazo y navegación espacial, que normalmente se daña por estrés y patogénesis de enfermedades tales como epilepsia y esquizofrenia. Se observaron bilateralmente grandes números de neuronas positivas para EGFP en todas las regiones del hipocampo, concretamente el giro dentado, hilio, CA1, CA2 y CA3 para los ratones que recibieron rAAVrh.10, rAAV9, rAAV7, rAAVrh.39, y rAAVrh.43 intravenoso (clasificados por eficiencia de transducción en esta estructura, Tabla 5 y Figuras 19 y 20). Además del patrón de transducción neuronal, las células positivas para EGFP tuvieron aspecto morfológico de astrocitos (Figura 20). Esto se confirmó además por tinción doble con anticuerpos contra EGFP y marcador astrocítico como se describe más adelante. Para vectores de rAAV1 rAAV6 y rAAV6.2 administrados por vía intravenosa hubo pequeños números de células positivas para EGFP en el hipocampo (Figura 20).

Corteza. Cambios patológicos en la corteza participan en enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Los vectores de AAV7, AAV9, AAVrh.10, AAVrh.39 y AAVrh.43 lograron transducción de EGFP moderada en la corteza (Tabla 5 y Figuras 19 y 20). La morfología de células transducidas estuvo de acuerdo con tanto neuronas como astrocitos como se confirmó además por tinción de marcador celular y el análisis microscópico confocal descrito más adelante. Normalmente se observaron células positivas para EGFP importantes en las regiones ventrolaterales de la corteza, que incluyen la corteza insular agranular posterior, corteza piriforme, corteza entorrinal lateral, núcleo amigdalino cortical posterolateral y núcleo amigdalino cortical posteromedial (Figura 20). Fuertes señales de EGFP se diseminaron de +1,5 a -3,3 mm en relación con el bregma (0,0 mm). La eficiencia cortical de la transducción de rAAVrh.10, rAAV9, rAAVrh.39 y rAAVrh.43 fue comparable (Tabla 5 y Figuras 19 y 20). Los vectores de AAV1, AAV6 y AAV6.2 también transdujeron células en la corteza (Figura 20).

Hipotálamo. Una función del hipotálamo es secretar neurohormonas para controlar ciertos procesos metabólicos. El hipotálamo también se indica en la etiología de la diabetes. Se observó señal de EGFP en el hipotálamo para ocho vectores. La administración intravenosa de rAAVrh.10 produjo la expresión de EGFP más alta en todo el hipotálamo, seguido de rAAVrh.39, rAAV7, rAAV6.2, rAAVrh.43, rAAV9, rAAV1 y rAAV6 (Figuras 19 y 20 y Tabla 5). De forma interesante, la mayoría de las células positivas para EGFP en esta estructura tienen una morfología astrocítica que se determinó por inmunotinción para un tipo astrocítico de marcador específico de célula como se describe más adelante. La señal de EGFP astrocítica tendió a oscurecer el examen directo de detalles morfológicos de otras células transducidas. Sin embargo, esto se aclaró por tinción inmunofluorescente doble de secciones de tejidos con anticuerpos para EGFP y marcadores de células neuronales como se describe más adelante.

Cerebelo. Las lesiones patológicas en el cerebelo se encuentran frecuentemente en enfermedades tales como síndrome afectivo-cognitivo cerebeloso, trastorno del desarrollo de la coordinación, síndrome de la fosa posterior, déficits lingüísticos, envejecimiento, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, autismo, demencia y esquizofrenia. Se detectaron células positivas para EGFP y fibras en el cerebelo para la mayoría de los vectores de rAAV (Tabla 5 y Figuras 19 y 20). Se encontró un gran número de células que expresaban EGFP en las capas de células de Purkinje y granulosas para rAAV7, rAAV9, rAAVrh.10, rAAVrh.39 y rAAVrh.43 (Figura 20). El perfil de transducción del vector de rAAV1 indicó expresión en células en la capa de células granulosas, mientras que rAAV6 y rAAV6.2 se localizaron en células en la capa de células de Purkinje (Figura 20).

Bulbo raquídeo. El bulbo raquídeo es una posible diana para terapia génica para tratar dolor crónico. La mayoría de los rAAVs medió en la expresión de EGFP de moderada a robusta en el bulbo raquídeo, estando la mayoría de las células verdes presentes en el borde externo (Figura 20). Las eficiencias de transducción de estos rAAV en esta región se clasifican en el siguiente orden: rAAVrh.39 = rAAVrh.43 > rAAVrh.10 > rAAV1 > rAAV9 > rAAV7 > rAAV6.2 > rAAV6 (Tabla 5 y Figura 19a). La morfología de la mayoría de las células transducidas por EGFP estuvo de acuerdo con que las células eran astrocitos.

Médula espinal. La médula espinal participa en enfermedades de las neuronas motoras. rAAVrh.10, rAAV9, rAAVrh.39 y rAAVrh.43 dieron lugar a expresión de EGFP muy robusta en la materia gris y blanca cervical, mientras que rAAV1, rAAV6.2 y rAAV7 mostraron intensidad de EGFP moderada (Tabla 5 y Figuras 19 y 21). Para rAAV1, se observó señal de EGFP en materia blanca. La capacidad de transducción de todos los rAAVs eficaces disminuyó de la médula espinal cervical a la lumbar. Fueron visibles células positivas para EGFP en la última región. Se

observaron grandes poblaciones de células positivas para EGFP con morfología astrocítica en toda la médula espinal (Figura 21). Además, rAAVrh.10, rAAV9, rAAVrh.39, rAAVrh.43 y rAAV7 también transdujeron células con morfología de neurona motora en las regiones ventrales de la médula espinal (Figura 21). Las fibras de la columna dorsal ascendente mostraron señal de EGFP clara. Además, los ganglios de la raíz dorsal (DRG) presentaron transducción sorprendente con fuerte expresión de EGFP en neuronas DRG (Figura 22 y Figura 26). Las identidades de tipos de células transducidas por rAAV en la médula espinal se caracterizaron por co-tinción por inmunofluorescencia con anticuerpos contra EGFP y marcadores específicos de tipo de célula como se describe más adelante.

La administración IV de vectores de AAV conduce a la transducción de diferentes tipos de células en el SNC

Para confirmar la identidad de células transducidas en diferentes regiones del SNC, se realizó tinción inmunofluorescente doble con anticuerpos para EGFP y NeuN (marcador neuronal genérico), proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP; marcador de astrocitos), calbindina-D28K (marcador de células de Purkinje) y colina acetil transferasa (ChAT; marcador de neuronas motoras) (Figura 23). Los resultados de la inmunotinción mostraron que un gran número de células positivas para NeuN expresaron EGFP en todo el cerebro de ratón, que indicó la amplia transducción neuronal. Las regiones con alta densidad de neuronas transducidas incluyeron estriado, hipocampo, corteza e hipotálamo. Los vectores de rAAVrh.10, rAAV9, rAAV7 y rAAVrh.39 fueron eficientes en mediar en la transducción neuronal, seguido de AAV6.2, AAV1 y AAV6 (Figuras 19 y 23). Además, se transdujeron neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra por AAV.rh10 (Figura 23). Las células transducidas en el SNC incluyeron astrocitos positivos para GFAP con cuerpos celulares pequeños y procesos altamente ramificados (Figura 23). La inmunotinción de calbindina-D28K confirmó la identidad de varias células transducidas en el cerebelo como células de Purkinje, con la expresión de EGFP en tanto cuerpo celular como sus procesos tipo árbol (Figura 23). rAAVs aptos en la transducción de células de Purkinje incluyen: rAAVrh.10, rAAV9, rAAVrh.39, rAAV7, rAAV6.2 y rAAVrh.43. rAAV1 y rAAV6 transdujeron una porción de células de Purkinje con intensidad de EGFP relativamente baja (Figura 19). La transducción de neuronas motoras se confirmó por la presencia de grandes células EGFP+/ChAT+ en la médula espinal ventral para varios vectores de rAAV (Figura 23). rAAVrh.10, rAAV9, rAAV7, rAAVrh.39 mostraron transducción de eficiencia comparable de neuronas motoras (Figura 21).

La administración IV de vectores de AAV medió en la robusta transducción en ventrículos y vasos sanguíneos del cerebro

Se observó expresión de EGFP en las células del flexo coroideo en los ventrículos laterales, 3° y 4° de los animales infundidos con rAAVrh.39, rAAVrh.10, rAAVrh.43, rAAV7 y rAAV9 (clasificados por eficiencia de transducción, Tabla 5 y Figuras 19 y 24). La expresión de EGFP en diferentes ventrículos del mismo cerebro de ratón fue similar (Figura 24). También se transdujeron células ependimarias que revisten los ventrículos. Una observación referente a la distribución de las células positivas para EGFP fue el aparente gradiente con el número más alto de células transducidas en regiones peri-ventriculares y números progresivamente más bajos con distancia creciente a los ventrículos. Esto fue evidente en áreas alrededor de los ventrículos 3° y 4° distintos de los ventrículos laterales (Figura 24). También se encontró una amplia señal de EGFP con vasos sanguíneos en todo el cerebro de ratón y médula espinal. Esto se verificó por tinción inmunofluorescente doble con anticuerpos dirigidos a EGFP y un marcador específico de endotelio de vaso sanguíneo, CD34 (Figuras 27a y 27b). A diferencia de los perfiles de transducción de rAAV en diferentes regiones del parénquima cerebral, la transducción de EGFP de los vasos sanguíneos en todo el SNC fue relativamente uniforme para cualquier vector dado. Sin embargo, la transducción de vasos sanguíneos estuvo influida por el rAAV particular usado. La mayoría de los rAAVs medió en una transducción de vasos sanguíneos de moderada (por ejemplo, rAAV6) a altamente eficiente (por ejemplo rAAVrh.10) en el SNC.

La inyección IV de vectores de AAV no produjo microgliosis

También se tiñeron secciones de cerebro con anticuerpo contra Iba-1 para marcar células de la microglía. Las células positivas para Iba-1 en las secciones de ratones que recibieron rAAVrh.10 no fue superiores a aquellas en ratones sin tratamiento previo o inyectados con PBS (Figura 28). Este resultado indicó que los rAAVs administrados por vía intravascular no produjeron inflamación sostenida en el SNC de ratones 3 semanas después de la inyección de neonatos P1.

Discusión de resultados

En este estudio, el perfil de transducción del SNC se evaluó para 10 vectores de rAAV diferentes administrados por infusión intravascular en ratones neonatales. La mayoría de los rAAVs pueden cruzar la BBB y mediar en la transferencia génica al SNC del ratón neonatal con grados variables de eficiencia (Figuras 19-21 y Tabla 5). Después de la administración sistémica, rAAVrh.10, rAAVrh.39, rAAVrh.43 y rAAV9 son los rAAVs eficaces con capacidad de transducción y tropismo celular similares, como se evalúa por la expresión de EGFP global en el SNC. Específicamente, varias regiones en el SNC del ratón, que incluyen estriado, hipocampo, corteza, hipotálamo, cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal cervical, revelaron una expresión de EGFP sustancial. Además, rAAV6.2 y rAAV7 también fueron eficaces. AAV1 y AAV6, lograron la transducción del SNC (Tabla 5). La expresión de EGFP nativa fue detectable en secciones de cerebro y médula espinal para la mayoría de los rAAVs sin inmunotinción (Figura 29).

Este ejemplo tiene importancia clínica para la terapia génica de trastornos relacionados con el SNC, que incluye para pacientes jóvenes. Para una variedad de enfermedades neurológicas, el tratamiento temprano durante la infancia puede ser necesario para prevenir la lesión irreversible del SNC. La capacidad de los rAAVs para transducir grandes números de células neuronales en diferentes regiones es relevante para tratar enfermedades neurológicas tales como atrofas musculares espinales, lipofuscinosis ceroides neuronales y degeneraciones espinocerebelosas. La eficiencia de algunos vectores de rAAV en transducir células de Purkinje y de capas granulosas indica que los vectores pueden usarse para tratar ataxias espinocerebelosas. La transducción de astrocitos por rAAVs que expresan factores neurotróficos secretados también puede ser beneficiosa para varias enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Canavan y esclerosis lateral amiotrófica. La transducción vascular en el SNC puede ser relevante para tratar isquemia cerebral y accidente cerebrovascular. La aplicación clínica de la administración génica mediada por rAAV intravascular también puede extenderse al sistema nervioso periférico (SNP). La eficiente transducción de DRG proporciona nuevas estrategias terapéuticas para pacientes que padecen dolor crónico.

La administración génica sistémica al SNC también es útil como método para manipular la expresión génica en investigación. Puede aplicarse expresión transgénica eficaz y estable en el SNC por administración intravenosa de rAAVs para establecer modelos de animales transgénicos somáticos, que es un método posiblemente más barato, más rápido y más simple que la transgénesis convencional. También pueden crearse modelos de animales inactivados en genes del SNC somáticos usando el método descrito en el presente documento.

Algunos rAAVs de hecho demostraron perfiles de transducción únicos en el SNC. Por ejemplo, rAAV1 presentó células granulomatosas transducidas en el cerebelo, mientras que rAAV6 y rAAV6.2 transdujeron células de Purkinje, y otros transdujeron ambos tipos de células (Figura 9). Esto indica que una vez a través de la BBB, los rAAVs tienen distintos tropismos, que pueden atribuirse a la cápside debido a que el genoma de vector usado en todos los vectores era el mismo.

Los serotipos de AAV desvelados en el presente documento pueden transducir eficientemente células endoteliales de capilares del cerebro, neuronas y astrocitos. Esto indica que estos vectores pueden extravasarse de la circulación y llegar al parénquima del SNC, posiblemente cruzando la BBB. El AAV puede cruzar la barrera endotelial por una vía de transcitosis. En este estudio, flexos coroideos y su tejido del parénquima de alrededor fueron eficientemente transducidos. Además, hubo un evidente gradiente de intensidad de EGFP de tejido peri-ventricular (más alta) a del parénquima profundo (más abajo). Estas observaciones indican que AAV puede entrar en el SNC del ratón neonatal mediante el flexo coroideo, seguido de la amplia distribución mediante el LCR y/o flujo intersticial de fluidos para transducir células neuronales y de la glía.

Pueden usarse promotores específicos de neuronas y de la glía, tales como sinapsina-1, y promotores de GFAP para limitar la expresión génica a un tipo específico de célula. Otro método para lograr la administración génica al SNC dirigida es utilizar interferencia por ARN para desdiseccionar los tejidos periféricos por mecanismos reguladores post-transcripcionales. Añadiendo sitios de unión de microARN en el extremo 3' de los casetes del transgén, la expresión transgénica después de la administración sistémica de vectores de AAV pueden reducirse o eliminarse en tejidos tales como hígado, corazón y músculo esquelético, mientras que se mantiene la transducción del SNC .

Materiales y métodos

Producción de AAV

Se produjeron vectores de scAAV por trans-encapsidación del genoma del vector de rAAV flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV2 con las cápsides de diferentes AAVs usando el método de transfección transitoria de células 293 y sedimentación en gradiente con CsCl que se ha descrito previamente. Se valoraron preparaciones de vector por PCR cuantitativa. La pureza de los vectores se evaluó por electroforesis en gel al 4-12 % de SDS-acrilamida y tinción con plata (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se examinó la integridad morfológica de cada vector usado en el estudio por microscopía electrónica de transmisión de viriones de AAV recombinante teñidos negativos. La expresión de EGFP en el genoma de vectores de scAAV se dirige por un potenciador híbrido del promotor del CMV/ β -actina de pollo.

Infecciones de ratones neonatales

Se usaron compañeros de camada de ratones C57BL/6 no mutantes. La cría de ratones se realizó usando el método de ritmo programático. Se monitorizaron ratones preñados diariamente desde el día embrionario 17 hasta 21 para garantizar que las crías recién nacidas pudieran ser administradas con los vectores en P1. Se sacó de la jaula la madre (alojada individualmente) de cada camada que iba a inyectarse. Los vectores se diluyeron a concentración de 4×10^{12} GC/ml en PBS y posteriormente se extrajeron 100 μ l de disolución en jeringas de insulina 31G (jeringas de insulina BD Ultra-Fine II U-100). Las crías P1 de ratones C57BL/6 se anestesiaron usando isoflurano y descansaron sobre hielo. Para inyecciones intravenosas, se usó un microscopio de disección para visualizar la vena temporal (situada justo anterior a la oreja). La aguja se insertó en la vena y se comprimió manualmente el émbolo. La correcta inyección se verificó observando el palidecimiento de la vena. Cada cría recibió 4×10^{11} GC de diferentes vectores scrAAVCBEGFP (rAAV1, rAAV2, rAAV5, rAAV6, rAAV6.2, rAAV7, rAAV9, rAAVrh.10, rAAVrh.39, rAAVrh.43; n=6-8

ratones por grupo) mediante la vena temporal superficial. Después de la inyección, las crías se limpiaron cuidadosamente, se frotaron con su lecho original, y entonces se devolvieron a su jaula original. Entonces, la madre se volvió a meter en la jaula después de una breve anestesia nasal usando almohadillas de etanol.

Procesamiento histológico

5 Los animales del estudio se anestesiaron 21 días después de la inyección, luego se perfundieron transcárdicamente con 15 ml de PBS frío, seguido de 15 ml de disolución de fijación que contenía 4 % de paraformaldehído (v/v) con 0,2 % de glutaraldehído (v/v) en PBS. Entonces, los cadáveres enteros se fijaron posteriormente en disolución de fijador durante 5 días. Se extrajeron médulas espinales y cerebros bajo un microscopio de disección de campo brillante, se aclararon en PBS, y luego se crioprotegieron en 30 % de sacarosa (peso/volumen) en PBS a 4 °C. Una vez los tejidos precipitaron al fondo de la disolución de sacarosa, se incorporaron en el compuesto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA) y se congelaron en un baño de nieve carbónica/etanol. Los bloques de tejido se almacenaron a -80 °C hasta que se seccionaron. Se cortaron secciones flotantes de 40 µm en serie del cerebro entero en un criostato (Thermo Microm HM 550). Para la médula espinal, se tomaron secciones de 3 mm de longitud de las regiones cervical, torácica y lumbar, y entonces se prepararon secciones transversales de 40 µm en serie como antes.

Inmunotinción y análisis de imágenes de microscopía

Se tiñeron secciones de cerebro y médula espinal como secciones flotantes en placas de 12 pocillos. Las secciones se lavaron 3 veces en PBS durante 5 min cada vez, y luego se incubaron en disolución de bloqueo que contenía 1 % de Triton-X100 (v/v) (Fisher, Pittsburg, PA), 5 % de leche en polvo (peso/volumen) y 10 % de suero de cabra (v/v) (Invitrogen) durante 2 h a temperatura ambiente. Entonces, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en disolución de bloqueo a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las secciones de tejidos se lavaron dos veces en 0,05 % de Tween-20 (v/v) en PBS (PBST) y una vez con PBS, durando cada etapa de lavado 10 min. Después, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios apropiados en disolución de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 h. Las secciones se lavaron otra vez como antes antes de montarlas sobre portaobjetos de vidrio. Se usó Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para cubrir todos los portaobjetos, y entonces se analizaron usando un microscopio invertido fluorescente (Nikon Eclipse Ti) o un microscopio confocal Leica TSC-SP2 AOBs equipado con una lente de aceite 63x y un microscopio invertido DM-IRE2. Los anticuerpos primarios usados en este estudio fueron los siguientes: anti-GFP de conejo (Invitrogen), anti-ChAT de cabra y anti-NeuN de ratón (ambos de Millipore, Billerica, MA), anti-GFAP de ratón (Cell Signaling, Danvers, MA), anti-CD34 de rata (Abcam, Cambridge, MA), anti-calbindina D-28k de ratón (Sigma, St Louis, MO) y anti-DARPP de conejo (Abcam, Cambridge, MA). Los anticuerpos secundarios usados en el estudio incluyeron: anti-IgG de conejo de burro DyLight 488 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA); anti-IgG de cabra de burro DyLight 549 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch); anti-IgG de rata de cabra DyLight 549 Affinipure (Jackson ImmunoResearch); anti-IgG de ratón de cabra DyLight 594 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch); anti-IgG de conejo-Alexa fluor 488 de cabra (Invitrogen) y anti-IgG de ratón-Alexa fluor 568 de cabra (Invitrogen).

Comparación semi-cuantitativa y cuantitativa de la transducción de EGFP por diferentes vectores

Para generar un formato de datos cuantificable y comparable, se desarrolló un sistema de puntuación semi-cuantitativa para estimar la eficiencia de transducción de diferentes vectores de rAAV en diferentes regiones del SNC del ratón. Brevemente, se marcaron regiones con células no positivas para EGFP como (-). Las regiones con muy pocas células positivas para EGFP se puntuaron (+), las regiones con algunas células positivas para EGFP se clasificaron como (++) , las regiones con muchas células positivas para EGFP se marcaron como (+++). Finalmente, las regiones llenas de células positivas para EGFP se marcaron como (++++) .

A continuación, se seleccionaron 12 regiones sub-anatómicamente y funcionalmente importantes en el cerebro, además de las secciones cervical, torácica y lumbar de la médula espinal, para análisis cuantitativo de imágenes que se tomaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti equipado con una cámara enfriada Retiga 2000-RV CCD. Se usó el software Nikon NIS elements AR v. 3.2 para la cuantificación de la intensidad. Antes de la cuantificación, se obtuvieron la intensidad de la fuente de luz óptima y los tiempos de exposición representando una curva de intensidad/tiempo de exposición usando portaobjetos de referencia de fluorescencia (Ted Pella, prod. 2273). Se encontró que la intensidad y los tiempos de exposición tenían correlación lineal. Además, la exposición en exceso y la exposición por defecto extrema distorsionan la correlación lineal. Se usaron la máxima intensidad (ND1) y una exposición de 20 ms para todas las secciones para evitar la exposición en exceso. Para la cuantificación, se usó región de interés (ROI) fijada para cuantificar el área más brillante de cualquier región del cerebro dada. Se obtuvo una intensidad media (intensidad total/tamaño de ROI) para cada región de todos los serotipos.

Tabla 5. Características de transducción de serotipos de AAV tras las inyecciones intravasculares en cerebro de ratón neonatal

	Bulbo olfativo		Estríado		Hipocampo		Corteza		Tálamo		Hipotálamo		Cerebelo		Bulbo raquídeo		Cervical		Torácica		Lumbar		Plexo coroideo	
	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n	Puntuación	n
AAV1	+	3	++	3	++	3	++	3	+	3	+++	3	+++	3	+++	3	+++	3	+++	3	+	3	+++	3
AAV2	-	3	-	3	+	3	+	3	+	3	+	3	+	3	+	3	+	3	-	3	-	3	++	3
AAV5	-	3	-	3	-	3	+	3	-	3	+	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3
AAV6	+	3	+	3	++	3	++	3	+	3	+++	2	++	3	++	3	++	3	+	3	+	3	+++	3
AAV6.2	-	3	+++	2	++	3	++	3	+	3	++++	3	++	3	++	3	++	3	++	3	+	3	++++	3
AAV7	+++	1	+++	3	+++	2	++	3	+	3	++++	3	+++	1	++	3	++	3	+	3	+	3	++++	3
AAV9	+++	2	+++	3	++	3	+++	1	+	3	++++	1	+++	1	++	3	++++	1	++	3	+	3	++++	3
rh10	+++	1	++++	1	+++	3	+++	2	++	2	++++	3	+++	1	+++	3	++++	1	++	3	+	3	++++	3
rh39	+++	1	++++	2	+++	3	+++	1	+	3	++++	3	+++	1	++++	1	++++	1	+++	3	+	3	++++	3
rh43	++	3	+++	3	+++	3	+++	3	+	3	++++	1	++	3	++++	1	++++	2	+++	3	+	3	++++	3

Puntuación: (-) Sin transducción, (+) muy pocas células positivas, (++) algunas células positivas, (+++) muchas células positivas y (++++) la región está casi saturada con células positivas para EGFP. El número de animales (n) con la puntuación particular se da a la derecha de la puntuación.

Ejemplo 10: Evaluación de un tratamiento basado en rAAV en un modelo de enfermedad de Canavan

Introducción al ejemplo

La CD es un leucodistrofia infantil rara y mortal producida por mutaciones recesivas autosómicas en el gen aspartoacilasa (ASPA) [como se ha establecido por el trabajo de graduado de G.G. (12)]. La deficiencia de ASPA en pacientes con CD conduce a ácido N-Acetil-aspartico (NAA) elevado en orina (un distintivo de CD) y degeneración esponjosa de la materia blanca en todo el SNC, produciendo retardo psicomotor grave y muerte temprana. Un modelo de ratón con ASPA^{-/-} imita la neuropatología y manifestaciones clínicas observadas en pacientes con CD, es decir, degeneración esponjosa de materia blanca, déficits motores, retrasos del desarrollo y muerte temprana (en el plazo de 3 semanas después del nacimiento).

En este estudio, se usaron rAAVs administrables por i.v. para dirigirse al SNC globalmente para tratar degeneración WM difusa en ratones CD. Inyecciones i.v. individuales del vector de ASPA a los ratones CD neonatales corrigieron el defecto metabólico, la disfunción psicomotora y otros fenotipos de enfermedad, y prolongaron la supervivencia. Aunque los ratones CD no tratados empezaron a mostrar retraso del crecimiento, disfunción psicomotora en la 2ª semanas después del nacimiento y murieron uniformemente poco después del destete, los ratones tratados empezaron a ganar peso 2 semanas después de la inyección de vector y casi alcanzaron a sus compañeros de camada heterocigóticos en el plazo de 7-8 semanas. A diferencia de los ratones CD, la movilidad de los animales tratados fue similar a la de los compañeros de camada no mutantes. Los datos de la prueba de la barra giratoria en los ratones tratados no mostraron diferencias significativas en el tiempo de latencia entre los ratones CD tratados y sus compañeros de camada no mutantes de la misma edad, que indica que la terapia génica corrigió la ataxia, un síntoma neuromuscular típico de CD. La caracterización bioquímica indicó reducción de los niveles de NAA en las muestras de orina y la restauración de la actividad de ASPA en sus tejidos de cerebro y riñón. La mitigación de los fenotipos bioquímicos y clínicos se correlacionó bien con la histopatología globalmente mejorada en no solo el cerebro, médula espinal, sino también en tejidos periféricos tales como el riñón, que indica que CD no es solo un trastorno del SNC.

Resultados

En ratones CD se dosificaron a P1 (vena facial, 4×10^{11} GCs) con AAV9ASPA. Los ratones se monitorizaron para el crecimiento, marcha, función motora en la barra giratoria, niveles de NAA en orina y actividades de ASPA en el cerebro. Los resultados mostraron que i) los ratones CD no tratados empezaron a perder peso en la 2ª semana y murieron en la 3ª semana después del nacimiento; ii) los animales tratados recuperaron su capacidad para crecer en la 5ª semana y alcanzaron a los animales ASPA^{+/+} en la 10ª semana; iii) la terapia génica corrigió completamente la marcha de los ratones CD, además de la función motora de los ratones CD tratados en P1 (Figura 30A) como se mide por la prueba de la barra giratoria; iv) la terapia génica restauró la visión de ratones CD. Las pruebas de electroretinografía (ERG) en los ojos de los ratones CD mostraron respuestas no registrables a la luz, mientras que las respuestas de ERG bien definidas fueron fácilmente detectables en los ratones CD tratados (Figura 30B). Estos datos indican una retinopatía más grave y pérdida de visión en ratones CD y la terapia génica puede mitigar la retinopatía y restaurar la visión de los ratones CD; v) la terapia génica mejoró claramente los defectos metabólicos de NAA, ya que los niveles de NAA en los ratones CD tratados se aproximan a aquellos en los ratones de control (Figura 30C); y vi) la corrección del metabolismo de NAA se correlaciona bien con la restauración de la expresión de ASPA (Figura 30E) y las actividades (Figura 30D) en el cerebro de los ratones CD tratados.

Para determinar si las correcciones fenotípicas se correlacionaban con la neuropatología aliviada, además de la expresión de ASPA *in situ* en las secciones de cerebro de los ratones CD tratados, se analizaron secciones de cerebro 3 meses después de la terapia génica para neuropatología e inmunohistoquímica de ASPA. Mientras que el cerebro de ratón sin tratar muestra una marcada vacuolación que implica difusamente a todas las regiones del cerebro y la médula espinal, la vacuolación en tanto el cerebro como la médula espinal del animal tratado parece más irregular y variable con vacuolas generalmente de tamaño más pequeño. Algunas áreas de la corteza cerebral no muestran casi vacuolación (Figura 31A). Además, se usó el sistema del complejo avidina-biotina (ABC) para teñir secciones de cerebro para detectar la expresión de ASPA en la corteza cerebral *in situ* (Figura 31B). Para generar mediciones cuantitativas de la mejora de la neuropatología en los ratones CD tratados, las "vacuolas" en las secciones de cerebro y de médula espinal producidas por la degeneración de materia blanca en los ratones CD se cuantificaron antes y después del tratamiento de terapia génica. Para este análisis cuantitativo, se usaron un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti y el software Nikon NIS elements AR V.3.2. Las vacuolas que fueron > 3.000 píxeles, 1.000 - 3.000 píxeles y 100 - 1.000 píxeles se definieron como vacuolas grandes, medianas y pequeñas, respectivamente. De entre las 5 regiones del cerebro evaluadas en este experimento, el bulbo olfativo tuvo la mitigación más espectacular en la degeneración de materia blanca después de la terapia génica (Figura 32A). Para las otras 3 regiones, mientras que las vacuolas grandes se eliminaron completamente y los números de vacuolas medianas se redujeron sorprendentemente, la reducción en los números de vacuolas pequeñas (<100 um) no fue tan significativo en este experimento (Figura 32A). El mismo análisis en las secciones de médula espinal reveló una tendencia similar (Figura 32B).

Se evaluó la histopatología de los riñones en los ratones CD. Los glomérulos mostraron estructura normal, pero se asociaron a dilatación de los espacios de Bowman. El epitelio tubular renal se atenuó difusamente (o atrófico) en asociación con el agrandamiento de las luces tubulares (Figura 33A). A diferencia, el ratón CD tratado tuvo glomérulos normales. Las células epiteliales tubulares renales se tiñeron bien y normales en el volumen (Figura 33B). Estos resultados indican la participación del riñón en la fisiopatología de CD y riñón como diana periférica para terapia génica de CD. Este resultado también indica tropismo renal de vectores de AAV como una consideración para la selección de un vector para terapia génica de CD. Se evaluaron dos vectores, rAAV9 y rh.10, para eficiencia de la transducción de riñón después de la administración IV a ratones C57BL/6 de 10 semanas de edad. Los resultados indican el uso de rAAVrh.10 (Figura 33D) como vector útil para terapia génica de CD debido a que transduce riñón eficientemente, además de su transducción eficiente del SNC (Figura 33C).

45 SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y DE AMINOÁCIDOS

>gij9632548|ref|NP_049542.1| proteína de la cápside [Virus adeno-asociado - 1] (SEQ ID NO: 1)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQP
 AKKRLNFGQTGDSESVDPDPQLGEPATPAAVGPPTMASGGGAPMADNNEGADGV
 GNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYS
 TPWGYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTIA
 NNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFYFSYTFEEVPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNR
 QNQSQAQNKDLLFSRGSAPGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWT
 GASKYLNGRESIINPGTAMASHKDDDEDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNDVMT
 DEEEKATNPVATERFGTVAVNFSQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDQVYLG
 PIWAKIPHDTDGHFHPSPMLGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFAFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDDNNGLYTEPRPIGTRYL
 TRPL

>gi|110645923|ref|YP_680426.1| proteína principal de la cubierta VP1 [Virus adeno-asociado - 2] (SEQ ID NO: 2)

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFG
 GNLGRAVFAQKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPA
 RKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVG
 NSSGNWHCDSTWMDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTP
 WGYFDNRFHCHFSRQDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIAN
 NLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRT
 NTPSGTTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTG
 ATKYHLNGRDSLNVNPGPAMASHKDDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITD
 EEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP
 WAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTG
 QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTR
 NL

>gi|51593838|ref|YP_068409.1| proteína de la cápside [Virus adeno-asociado - 5] (SEQ ID NO: 3)

MSFVDHPPDWLEEVGEGLEFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPNG
 GLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSGGN
 LGKAVFAQKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAE
 AGPSGSQQLQIPASSLQADTMSAGGGGGLGDNQAGDGVGNASGDWHCDSTW
 MGDVVTKSTRTWVLPSPYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDNRFHS
 HWSRQDWQRLINNYWGFPRSLRVKIFNIQVKEVTQDSTTTIANNLTSTVQVFTDD
 DYQLPYVVGNGTEGCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSK
 MLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFLKANPLVDQYLYRFVSTNNTGGVQFNK
 NLAGRYANTYKNWFPMPGRTQGWNLGSGVNRASVSASFATTNRMELEGASYQVPP
 QPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAY
 NVGGQMATNNQSSTTAPATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFH
 PSPAMGGFGLKHPPPMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKK
 ENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTRTRPIGTRYLTRPL

5 >gi|2766607|gb|AAB95450.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado - 6] (SEQ ID NO: 4)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAGPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGP
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFAQKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQP
 AKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPATPAAVGPTTMASGGGAPMADNNEGADGV
 GNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYS
 TPWGYFDNRFHCHFSRQDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTTIA
 NNLTSTVQVFSSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLNRT
 QNQSQAQNKDLLFSRGSAPGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWT
 GASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMIT
 DEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGP
 PWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFAFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYL
 TRPL

>gi|171850125|gb|ACB55302.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado - 6.2] (SEQ ID NO: 5)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQP
 AKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPATPAAVGPTTASGGGAPMADNNEGADGV
 GNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYS
 TPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTIA
 NNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRT
 QNQSGSAQNKDLLFSRGSAPGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWT
 GASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMIT
 DEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQG
 PIWAKIPHTDGFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYL
 TRPL

>gi|22652861|gb|AAN03855.1|AF513851_2 proteína de la cápside [Virus adeno-asociado - 7] (SEQ ID NO: 6)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQ
 PARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAAAPSSVSGTVAAGGGAPMADNNEGADGV
 GNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSETAGSTNDNTYFGYS
 TPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKKLRFKLFNIQVKEVTNDGVTIA
 NNLTSTIQVFSDEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQSVGRSS
 FYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYSFEDVPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLARTQ
 SNPGGTAGNRELQFYQGGPSTMAEQAKNWLPGPCFRQQRVSKTLDQNNNSNFAWT
 GATKYHLNGRNSLVNPGVAMATHKDEDRFFPSSGVLIFGKTGATNKTTLNENLMT
 NEEERPTNPVATEEYGIVSSNLQAANTAAQTQVNNQ GALPGMVWQNRDVYLQGP
 IWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTG
 QVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNFEKQTGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTR
 NL

>gi|22652864|gb|AAN03857.1|AF513852_2 proteína de la cápside [Virus adeno-asociado - 8] (SEQ ID NO: 7)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQ
 PARKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADG
 VGSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFG
 YSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPKRSLFKLFNIQVKEVTQNEGKT
 IANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGR
 SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSR
 TQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAW
 TAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDEERFFPSNGILIFGKQNAARDNADYSQVDM
 LTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQ
 GPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSCLNSFITQYS

5

TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYL
 TRNL

>gi|46487805|gb|AAS99264.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado 9] (SEQ ID NO: 8)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLG
 PNGLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQP
 AKKRLNFGQTGDTEVPDPQPIGEPAAAPSGVGLTMASSGGAPVADNNEGADGVG
 SSSGNWHCDSQWLGDRVITTSRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYST
 PWGYDFDNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIA
 NNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRS
 SFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKT
 INSGQNQQTLLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGA
 SSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITN
 EEEIKTTNPVATESYGVVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGP
 IWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNVVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLT
 RNL

>gi|29650526|gb|AA088201.1| proteína de la cápside [Virus adeno-asociado de primate no humano] (SEQ ID NO: 9)
 rh-10

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQ
 PAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPIGEPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGV
 GSSGNWHCDSTWLGDRVITTSRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGY
 STPWGYDFDNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTI
 ANNLSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGR
 SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYQFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSR
 TQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAW
 TGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQAGKDNVDYSSV
 MLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVY
 LQGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFIT
 QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTDGTYSEPRPIGT
 RYLTRNL

5 >gi|171850147|gb|ACB55313.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado - rh.39] (SEQ ID NO: 10)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQ
 PAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPIGEPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGV
 GSSGNWHCDSTWLGDRVITTSRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGY
 STPWGYDFDNRFHCHFSRPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTI
 ANNLSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGR
 SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSR
 TQSTGGTQGTQQLLFSQAGPANMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAW
 TGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQAGRDNDYSSV
 MLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQTNTGPIVGNVNSQGALPGMVWQNRDVY
 LQGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFIT
 QYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGT
 RYLTRNL

>gi|46487767|gb|AAS99245.1| proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado rh.43] (SEQ ID NO: 11)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLG
 PFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKKGQQP
 ARKRLNFGQTGDSSEVPDPQPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGV
 GSSGNWHCDSWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGY
 STPWGYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKI
 ANNLSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGR
 SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPIDQYLYLSR
 TQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAW
 TAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDERFFPVTGSCFWQQAARDNADYSVDM
 LTSEEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQ
 GPIWAKIPHDTGDNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYS
 TGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYL
 TRNL

>proteína de la cápside VP1 [Virus adeno-asociado] CSp3 (SEQ ID NO: 12)

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLG
 PGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTS
 FGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQP
 AKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTIASGGGAPVADNNEGADGVGS
 SSGNWHCDSQWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYKRISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP
 WGYFDFNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIRVKEVTDNNGVKTTN
 NLSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSS
 FYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPIDQYLYLSKI
 NGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQQRVSTTVTRNNNSEFAWPGAS
 SWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNE
 EEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGP
 WAKIPHDTGDNFHPSPMLMGGFVGHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNVVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYL
 RNL

>gi|189339202|ref|NP_001121557.1| aspartoacilasa [Homo sapiens] (SEQ ID NO: 13)

MTSCHIAEEHIQKVAIFGGTHGNELTGVFLVKHWLENGAEIQRGTGLEVKPFITNPRAV
 KKCTRYIDCDLNRIFDLNLGKKMSEDLPEYVRRRAQEIHLFGPKDSEDSYDIIFDLH
 NTTSNMGCTLILEDNRNFLIQMFHYIKTSLAPLPCYVYVYLIEHPSLKYATTRSIKYPV
 GIEVGPQPQGVLRADILDQMRKMIKHALDFIHHFNEGKEFPFCAIEVYKIEKVDYPR
 DENGEIAAIIHPNLQDQDWKPLHPGDPMFLTLDGKTIPLGGDCTVYPVFNAAAYYE
 KKEAFAKTTLKTLNAKSIRCC LH

5

>gi|189339201:92-1033 aspartoacilasa de Homo sapiens (enfermedad de Canavan) (ASPA), variante de transcrito 2, ARNm (SEQ ID NO: 14)

ATGACTTCTTGTACATTGCTGAAGAACATATACAAAAGGTTGCTATCTTTGGAG
 GAACCCATGGGAATGAGCTAACCGGAGTATTTCTGGTTAAGCATTGGCTAGAGA
 ATGGCGCTGAGATTCAGAGAACAGGGCTGGAGGTAACCATTTACTAACC
 CCAGAGCAGTGAAGAAGTGTACCAGATATATTGACTGTGACCTGAATCGCATTTT
 TGACCTTGAAAATCTTGGCAAAAAAATGTCAGAAGATTTGCCATATGAAGTGAG
 AAGGGCTCAAGAAATAAATCATTTATTTGGTCCAAAAGACAGTGAAGATTCCTAT
 GACATTATTTTGGACCTTCAACACCACCTTAACATGGGGTGCACCTTATTCT
 TGAGGATTCCAGGAATAACTTTTTAATTCAGATGTTTCATTACATTAAGACTTCTC
 TGGCTCCACTACCCTGCTACGTTTATCTGATTGAGCATCCTTCCCTCAAATATGCG
 ACCACTCGTTCATAGCCAAGTATCCTGTGGGTATAGAAGTTGGTCCTCAGCCTC
 AAGGGGTCTGAGAGCTGATATCTTGGATCAAATGAGAAAAATGATTAACATG
 CTCTTGATTTTATACATCATTTCAATGAAGGAAAAGAATTTCCCTCCCTGCGCCATT
 GAGGTCTATAAAATTATAGAGAAAGTTGATTACCCCGGGATGAAAATGGAGAA
 ATTGCTGCTATCATCCATCCTAATCTGAGGATCAAGACTGGAACCACTGCATC
 CTGGGGATCCCATGTTTTTAACCTTGTGATGGGAAGACGATCCCACTGGCGGAGA
 CTGTACCGTGTACCCCGTGTGTGTAATGAGGCCGCATATTACGAAAAGAAAAGA
 AGCTTTTGCAAAGACAACCTAACTAACGCTCAATGCAAAAAGTATTCGCTGCTGT
 TTACATTAG

>gi|31560279|ref|NP_075602.2| aspartoacilasa [Mus Musculus] (SEQ ID NO: 15)

MTSCVAKEPIKIIAIFGGTHGNETLGVFLVTHWLRNGTEVHRAGLDVKPFITNPRAV
 EKCTRYIDCDLNRVFDLENLSKEMSEDLPEYVRRRAQEINHLFGPKNSDDAYDLVFDL
 HNTTSMGCTLILEDNRNDFLIQMFHYIKTCMAPLPCSVYLIEHPSLKYATTRSIKYP
 VGIEVGPQPHGVLRADILDQMRKMIKHALDFIQHFNEGKEFPFPCSIDVYKIMEKVDYP
 RNESGDMAAVIHPNLQDQDWKPLHPGDPVVFVSLDGVKVIPLGGDCTVYPVVFVNEAAY
 YEKKEAFAKTTLKLSAKSIRSTLH

>gi|142354273:148-1086 aspartoacilasa de Mus musculus (Aspa), ARNm (SEQ ID NO: 16)

ATGACCTCTTGTGTTGCTAAAGAACCTATTAAGAAGATTGCCATCTTTGGAGGGA
 CTCATGGAAATGAACTGACCGGAGTGTCTTAGTACTACTGGCTAAGGAATGG
 CACTGAAGTTCACAGAGCAGGGCTGGACGTGAAGCCATTCATTACCAATCCAAG
 GGCGGTGGAGAAGTGCACCAGATACATTGACTGTGACCTGAATCGTGTTTTTGAC
 CTGAAAATCTTAGCAAAGAGATGTCTGAAGACTTGCCATATGAAGTGAGAAGG
 GCTCAAGAAATAAATCATTATTTGGTCCAAAAAATAGTGATGATGCCTATGACC
 TTGTTTTGACCTTCAACACCACTTCTAACATGGGTTGCACCTTATTCTTGAG
 GATTCCAGGAATGACTTTTTAATTCAGATGTTTCACTATATTAAGACTTGCATGGC
 TCCATTACCCTGCTCTGTTTATCTCATGAGCATCCTTCACTCAAATATGCAACCA
 CTCGTTCCATTGCCAAGTATCTGTGTTGATAGAAGTTGGTCCTCAGCCTCACGGT
 GTCCTTAGAGCTGATATTTAGACCAAATGAGAAAAATGATAAAACATGCTCTTG
 ATTTTATACAGCATTCAATGAAGGAAAAGAATTTCTCCCTGTTCTATTGACGTC
 TATAAAATAATGGAGAAAAGTTGATTATCCAAGGAATGAAAGTGGAGACATGGCT
 GCTGTTATTCATCCTAATCTGCAGGATCAAGACTGGAAACCATTGCACCCTGGAG
 ATCCTGTGTTTGTGTCCTTGATGGAAAAGTTATTCCACTGGGTGGAGACTGTAC
 CGTGTACCCAGTGTGTTGTAATGAAGCTGCATATTATGAAAAAAGAAAGCATT
 GCAAAGACAACAAAACCTAACACTCAGCGCAAAAAGCATCCGCTCCACTTTGCAC
 TAA

5

>gi|48762945:149-613 superóxido dismutasa 1 de Homo sapiens, soluble (SOD1), ARNm (SEQ ID NO: 17)

ATGGCGACGAAGGCCGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGCCAGTGCAGGGCATT
 ATCAATTTTCGAGCAGAAGGAAAGTAATGGACCAGTGAAGGTGTGGGGAAGCATT
 AAAGGACTGACTGAAGGCCTGCATGGATTCCATGTTTCATGAGTTTGGAGATAATA
 CAGCAGGCTGTACCAGTGCAGGTCCTCACTTTAATCCTCTATCCAGAAAACACGG
 TGGGCCAAAGGATGAAGAGAGGCATGTTGGAGACTTGGGCAATGTGACTGCTGA
 CAAAGATGGTGTGGCCGATGTGTCTATTGAAGATTCTGTGATCTCACTCTCAGG
 GACCATTGCATCATTGGCCGCACACTGGTGGTCCATGAAAAAGCAGATGACTTG
 GGCAAAGGTGAAAATGAAGAAAGTACAAAGACAGGAAACGCTGGAAGTCGTTT
 GGCTTGTGGTGTAATTGGGATCGCCAATAA

>gi|4507149|ref|NP_000445.1| superóxido dismutasa [Homo sapiens] (SEQ ID NO: 18)

MATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVVWGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTA
 GCTSAGPHFNPLSRKHGGPKDEERHVGDLGNVTADKDGVADVSIEDSVISLGDHCII
 GRTLTVHEKADDLGKGGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ

10 >gi|45597446:117-581 superóxido dismutasa 1 de Mus musculus, soluble (Sod1), ARNm (SEQ ID NO: 19)

ATGGCGATGAAAGCGGTGTGCGTGCTGAAGGGCGACGGTCCGGTGCAGGGAACC
 ATCCACTTCGAGCAGAAGGCAAGCGGTGAACCAGTTGTGTTGTCAGGACAAATT
 ACAGGATTAAGTGAAGGCCAGCATGGGTTCCACGTCCATCAGTATGGGGACAAT
 ACACAAGGCTGTACCAGTGCAGGACCTCATTTTAATCCTCACTCTAAGAAACATG
 GTGGCCCCGGGATGAAGAGAGGCATGTTGGAGACCTGGGCAATGTGACTGCTG
 GAAAGGACGGTGTGGCCAATGTGTCCATTGAAGATCGTGTGATCTCACTCTCAGG
 AGAGCATTCATCATTGGCCGTACAATGGTGGTCCATGAGAAACAAGATGACTT
 GGGCAAAGGTGAAAATGAAGAAAGTACAAAGACTGGAAATGCTGGGAGCCGCT
 TGGCCTGTGGAGTGATTGGGATTGCGCAGTAA

>gi|45597447|ref|NP_035564.1| superóxido dismutasa [Mus musculus] (SEQ ID NO: 20)

ES 2 605 305 T3

MAMKAVCVLKGDPVQGTIHFQKASGEPVVLSGQITGLTEGQHGFHVHQYGDNT
QGCTSAGPHFNPHSKKHGGPADEERHVVDLGNVTAGKDGVANVSIEDRVISLSGEH
SIIGRTMNVHEKQDDLKGGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ

>pAAVscCB6 EGFPmir SOD5 (directo) 5243 pb (SEQ ID NO: 21)

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGTAG
CCATGCTCTAGGAAGATCAATTCAATTCACGCGTCGACATTGATTATTGACTAGT
TATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCG
CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC
CATTGACGTCAATGGGTGGATATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA
TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGTTCGAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCC
CCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTT
GTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGG
GCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGC
GGCGCGTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATA
AAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGCAAGCTCTAGCCTCGAGAATTCACGCG
TGGTACCTCTAGAGCAGAGCTCGTTTATGTAACCGTCAGTTCGAAATCGCCACCA
TGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGC
TGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCG
ATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC
CGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGC
CGTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAG
GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC
GCGCCGAGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAAC
ACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGG
TGAACCTCAAGATCCGCCACAACAICGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACC
ACTACCAGCAGAACACCCCAATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACC
ACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC
ACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA
GCTGTACAAGTAAGTAACAGGTAAGTGCATCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTAT
TCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAGTTTGTCACT
GACTGGAGAACTCGGTTTGTCTGCTGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGGCGGTGCCG
TGGGCGAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGGCCCTCGTCTGCTGCTGACGTC
ACCCGTTCTGTTGGTACCTGCTGTTGACAGTGAGCGACGCAATGTGACTTCGCTG
ACAAAGCTGTGAAGCCACAGATGGGCTTTGTCAGCAGTACATTTGCGCTGCCTAC
TGCTTCGGACTTCAAGGGCTCGAGAATTCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGT
GTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGACGACGAGGTTTCGGGCTAGGGTAGGCTC
TCCTGAATCGACAGGCGCCGACCTTGGCGGCCGCAACAACGCGTTCCTGACC
ATTCATCCTCTTCTTTTCTGAGGCTTGTGGAAGAAATGGGATCCGATCTTTT
TCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCT
GGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGCT
CTCACTCGGCCTAGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGG
AACCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA
GGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAA
CGTCTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATC
CCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCA
ACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAG
CGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTA
GCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCCGGGCTTTCC
CGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGC
ACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAAGTGGCCATCGCC
CTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAC
CTTTGTCCAAACTGGAAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTA

TAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAA
 AATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTT
 CGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATA
 TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG
 GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCAT
 TTTGCCTTCCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGA
 AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA
 GATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAA
 GTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCG
 GTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACACAGA
 AAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAAC
 CATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGCCGAA
 GGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGTTCGT
 TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG
 CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTC
 TAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC
 CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
 GGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCC
 TCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
 AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAG
 ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAA
 AGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCCTAACGTTG
 AGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
 AGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTA
 CCAGCGGTGGTTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA
 CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTT
 AGGCCACCATTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATC
 CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACT
 CAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGT
 GCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGC
 GTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATC
 CGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGA
 AACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG
 ATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGC
 GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGTCCACATGTTCTTCTGCTG
 GTTATCCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACC
 GCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGA
 AGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGC
 AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATT
 AATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGG
 CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTA
 TGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTAATTAGG

>sod1mir1 (directo) 108 pb (SEQ ID NO: 22)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACATCATCAATTTTCCGAGCAGAAGTGTGAAGCCACA
 GATGGGTTCAGTCACTCCTTTAATGCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

>sod1mir2 (directo) 106 pb (SEQ ID NO: 23)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGACATTAAGGATCCTGACTGACTGTGAAGCCACA
 GATGGGTTCAGTCACTCCTTTAATGCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

5

>sod1mir3 (directo) 108 pb (SEQ ID NO: 24)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTGCATGGATTCTCCATGTTTCATCTGTGAAGCCACA
 GATGGGATGAACATGGAATCCATGCAGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

>sod1mir4 (directo) 106 pb (SEQ ID NO: 25)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACAAGGATGAAGATCGAGGCATGCTGTGAAGCCACA
 GATGGGCATGCCTCTCTTCATCCTTGTGCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

10 >sod1mir5 (directo) 110 pb (SEQ ID NO: 26)

ES 2 605 305 T3

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGCAATGTGACTTCGCTGACAAAGCTGTGAAGCCA
CAGATGGGCTTTGTCAGCAGTCACATTGCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGG
G

>sod1mir6 (directo) 108 pb (SEQ ID NO: 27)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACCGATGTGTCTATCTTGAAGATTCTGTGAAGCCACA
GATGGGAATCTTCAATAGACACATCGGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

>sod1mir7 (directo) 106 pb (SEQ ID NO: 28)

5 TGCTGTTGACAGTGAGCGACGGTGGAAATGATCAGAAAGTACTGTGAAGCCACA
GATGGGTACTTTCTTCATTTCCACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

>sod1mir8 (directo) 110 pb (SEQ ID NO: 29)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGCTGTAGAAATTCGTATCCTGATCTGTGAAGCCAC
AGATGGGATCAGGATACATTTCTACAGCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

>sod1mir9 (directo) 106 pb (SEQ ID NO: 30)

TGCTGTTGACAGTGAGCGAGGTATTAACCTTGTCAGAATTTAGTGAAGCCACAGA
TGTAATTTCTGACAAGTTTAATACCCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

10 >pAAVscCB6 EGFPmir scr (1820 pb - 1925 pb, directo) 106 pb (SEQ ID NO: 31)

TGCTGTTGACAGTGAGCGACGATGCTCTAATCGGTTCTATCAAGTGAAGCCACAG
ATGTTGATAGAACCTTAGAGCATCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Massachusetts Gao, Guanping Zhang, Hongwei Wang, Hongyan Xu, Zuoshang

15 <120> VECTORES DE AAV QUE SE DIRIGEN AL SNC Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> U0120.70046

<150> 61/327.627

20 <151> 23-04-2010

<160> 64

<170> PatentIn versión 3.5

25

<210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado 1

30

<400> 1

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460

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

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

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

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525

Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540

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

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

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 305 T3

		675						680							685			
Lys	Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Val	Gln	Tyr	Thr	Ser	Asn			
	690					695					700							
Tyr	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Val	Asp	Phe	Thr	Val	Asp	Asn	Asn	Gly	Leu			
	705				710					715					720			
Tyr	Thr	Glu	Pro	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Pro	Leu			
				725					730					735				

<210> 2

<211> 735

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado 2

<400> 2

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Thr	Leu	Ser			
1				5					10					15				
Glu	Gly	Ile	Arg	Gln	Trp	Trp	Lys	Leu	Lys	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro			
			20					25					30					
Lys	Pro	Ala	Glu	Arg	His	Lys	Asp	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro			
		35					40					45						
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro			
	50					55					60							
Val	Asn	Glu	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp			
	65				70					75					80			
Arg	Gln	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala			
				85					90					95				
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly			
			100					105					110					
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro			
		115					120					125						
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Val	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg			
	130					135					140							
Pro	Val	Glu	His	Ser	Pro	Val	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly			
	145				150					155					160			
Lys	Ala	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr			
				165					170					175				

10

ES 2 605 305 T3

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
195 200 205

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

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
260 265 270

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

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

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

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

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

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

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
370 375 380

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

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

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

ES 2 605 305 T3

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr
 435 440 445
 Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
 485 490 495
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
 500 505 510
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
 515 520 525
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 530 535 540
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 545 550 555 560
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 565 570 575
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
 595 600 605
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
 610 615 620
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
 625 630 635 640
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
 645 650 655
 Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
 660 665 670
 Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys
 675 680 685
 Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr
 690 695 700
 Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr
 705 710 715 720
 Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735

ES 2 605 305 T3

<210> 3

<211> 724

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado 5

5

<400> 3

```

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
 1                               5                               10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
 20                               25                               30

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

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
 50                               55                               60

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
 65                               70                               75 80

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

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

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

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

Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
 145                              150                              155 160

Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
 165                              170                              175

Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
 180                              185                              190
    
```

ES 2 605 305 T3

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
 195 200 205

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
 210 215 220

Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
 225 230 235 240

Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
 245 250 255

Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 260 265 270

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
 290 295 300

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
 305 310 315 320

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 325 330 335

Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
 340 345 350

Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
 355 360 365

Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
 370 375 380

Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
 385 390 395 400

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
 405 410 415

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
 420 425 430

Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
 435 440 445

ES 2 605 305 T3

Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
 450 455 460

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

Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
 485 490 495

Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
 500 505 510

Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
 515 520 525

Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
 530 535 540

Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
 545 550 555 560

Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
 565 570 575

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

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
 595 600 605

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
 610 615 620

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
 625 630 635 640

Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
 645 650 655

Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
 660 665 670

Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
 675 680 685

Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
 690 695 700

Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu
 705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 4

5 <211> 736

ES 2 605 305 T3

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado 6

<400> 4

5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460

ES 2 605 305 T3

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

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

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

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

5 <211> 736

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado 6.2

ES 2 605 305 T3

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460

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

ES 2 605 305 T3

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

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

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525

Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<210> 6

<211> 737

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado 7

ES 2 605 305 T3

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu

<210> 7

<211> 738

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado 8

ES 2 605 305 T3

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
 485 490 495

ES 2 605 305 T3

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

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

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

Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
 545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 8

<211> 736

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado 9

ES 2 605 305 T3

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
 485 490 495

ES 2 605 305 T3

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

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

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

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 738

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado rh.10

<400> 9

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460

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

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495

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

ES 2 605 305 T3

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

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

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
 545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
 580 585 590

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 10

<211> 738

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado rh.39

<400> 10

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495

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

ES 2 605 305 T3

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

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

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
 545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575

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

Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 11

<211> 736

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado rh.43

<400> 11

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 305 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly Gln
 485 490 495

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

ES 2 605 305 T3

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

Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Val Thr Gly Ser Cys Phe Trp
 530 535 540

Gln Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu
 545 550 555 560

Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu
 565 570 575

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 736

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado CSp3

<400> 12

ES 2 605 305 T3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Ile Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Arg Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

ES 2 605 305 T3

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

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

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

Arg Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Thr Asn
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Arg Asn
 485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505 510

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

ES 2 605 305 T3

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

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 313

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 605 305 T3

Met Thr Ser Cys His Ile Ala Glu Glu His Ile Gln Lys Val Ala Ile
 1 5 10 15

Phe Gly Gly Thr His Gly Asn Glu Leu Thr Gly Val Phe Leu Val Lys
 20 25 30

His Trp Leu Glu Asn Gly Ala Glu Ile Gln Arg Thr Gly Leu Glu Val
 35 40 45

Lys Pro Phe Ile Thr Asn Pro Arg Ala Val Lys Lys Cys Thr Arg Tyr
 50 55 60

Ile Asp Cys Asp Leu Asn Arg Ile Phe Asp Leu Glu Asn Leu Gly Lys
 65 70 75 80

Lys Met Ser Glu Asp Leu Pro Tyr Glu Val Arg Arg Ala Gln Glu Ile
 85 90 95

Asn His Leu Phe Gly Pro Lys Asp Ser Glu Asp Ser Tyr Asp Ile Ile
 100 105 110

Phe Asp Leu His Asn Thr Thr Ser Asn Met Gly Cys Thr Leu Ile Leu
 115 120 125

Glu Asp Ser Arg Asn Asn Phe Leu Ile Gln Met Phe His Tyr Ile Lys
 130 135 140

Thr Ser Leu Ala Pro Leu Pro Cys Tyr Val Tyr Leu Ile Glu His Pro
 145 150 155 160

Ser Leu Lys Tyr Ala Thr Thr Arg Ser Ile Ala Lys Tyr Pro Val Gly
 165 170 175

Ile Glu Val Gly Pro Gln Pro Gln Gly Val Leu Arg Ala Asp Ile Leu
 180 185 190

Asp Gln Met Arg Lys Met Ile Lys His Ala Leu Asp Phe Ile His His
 195 200 205

Phe Asn Glu Gly Lys Glu Phe Pro Pro Cys Ala Ile Glu Val Tyr Lys
 210 215 220

Ile Ile Glu Lys Val Asp Tyr Pro Arg Asp Glu Asn Gly Glu Ile Ala
 225 230 235 240

Ala Ile Ile His Pro Asn Leu Gln Asp Gln Asp Trp Lys Pro Leu His
 245 250 255

Pro Gly Asp Pro Met Phe Leu Thr Leu Asp Gly Lys Thr Ile Pro Leu
 260 265 270

Gly Gly Asp Cys Thr Val Tyr Pro Val Phe Val Asn Glu Ala Ala Tyr
 275 280 285

ES 2 605 305 T3

Tyr Glu Lys Lys Glu Ala Phe Ala Lys Thr Thr Lys Leu Thr Leu Asn
 290 295 300
 Ala Lys Ser Ile Arg Cys Cys Leu His
 305 310

<210> 14

<211> 942

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

atgacttctt gtcacattgc tgaagaacat atacaaaagg ttgctatctt tggaggaacc      60
catgggaatg agctaaccgg agtatttctg gttaagcatt ggctagagaa tggcgctgag      120
attcagagaa cagggctgga ggtaaaacca ttattacta accccagagc agtgaagaag      180
tgtaccagat atattgactg tgacctgaat cgcatttttg accttgaaaa tcttggcaaa      240
aaaatgtcag aagatttgcc atatgaagtg agaagggctc aagaaataaa tcatttattt      300
ggtcmetaag acagtgaaga ttcctatgac attatttttg accttcacaa caccacctct      360
aacatggggg gcactcttat tcttgaggat tccaggaata actttttaat tcagatgttt      420
cattacatta agacttctct ggctccacta ccctgctacg tttatctgat tgagcatcct      480
tccctcaaat atgcgaccac tcgttccata gccaaagtac ctgtgggtat agaagttggg      540
cctcagcctc aaggggttct gagagctgat atcttggatc aaatgagaaa aatgattaaa      600
catgctcttg attttataca tcatttcaat gaaggaaaag aatttcctcc ctgcgccatt      660
gaggctata aaattataga gaaagttgat taccocggg atgaaaatgg agaaattgct      720
gctatcatcc atcctaactc gcaggatcaa gactggaaac cactgcatcc tgggatccc      780
atgtttttaa ctcttgatgg gaagacgatc cactgggcg gagactgtac cgtgtacccc      840
gtgtttgtga atgaggccgc atattacgaa aagaaagaag cttttgcaaa gacaactaaa      900
ctaacgctca atgcaaaaag tattcgctgc tgtttacatt ag                          942
    
```

10

<210> 15

<211> 312

<212> PRT

15 <213> Mus Musculus

<400> 15

ES 2 605 305 T3

Met Thr Ser Cys Val Ala Lys Glu Pro Ile Lys Lys Ile Ala Ile Phe
1 5 10 15

Gly Gly Thr His Gly Asn Glu Leu Thr Gly Val Phe Leu Val Thr His
20 25 30

Trp Leu Arg Asn Gly Thr Glu Val His Arg Ala Gly Leu Asp Val Lys
35 40 45

Pro Phe Ile Thr Asn Pro Arg Ala Val Glu Lys Cys Thr Arg Tyr Ile
50 55 60

Asp Cys Asp Leu Asn Arg Val Phe Asp Leu Glu Asn Leu Ser Lys Glu
65 70 75 80

Met Ser Glu Asp Leu Pro Tyr Glu Val Arg Arg Ala Gln Glu Ile Asn
85 90 95

His Leu Phe Gly Pro Lys Asn Ser Asp Asp Ala Tyr Asp Leu Val Phe
100 105 110

Asp Leu His Asn Thr Thr Ser Asn Met Gly Cys Thr Leu Ile Leu Glu
115 120 125

Asp Ser Arg Asn Asp Phe Leu Ile Gln Met Phe His Tyr Ile Lys Thr
130 135 140

Cys Met Ala Pro Leu Pro Cys Ser Val Tyr Leu Ile Glu His Pro Ser
145 150 155 160

Leu Lys Tyr Ala Thr Thr Arg Ser Ile Ala Lys Tyr Pro Val Gly Ile
165 170 175

Glu Val Gly Pro Gln Pro His Gly Val Leu Arg Ala Asp Ile Leu Asp
180 185 190

Gln Met Arg Lys Met Ile Lys His Ala Leu Asp Phe Ile Gln His Phe
195 200 205

Asn Glu Gly Lys Glu Phe Pro Pro Cys Ser Ile Asp Val Tyr Lys Ile
210 215 220

Met Glu Lys Val Asp Tyr Pro Arg Asn Glu Ser Gly Asp Met Ala Ala
225 230 235 240

Val Ile His Pro Asn Leu Gln Asp Gln Asp Trp Lys Pro Leu His Pro
245 250 255

Gly Asp Pro Val Phe Val Ser Leu Asp Gly Lys Val Ile Pro Leu Gly
260 265 270

Gly Asp Cys Thr Val Tyr Pro Val Phe Val Asn Glu Ala Ala Tyr Tyr
275 280 285

Glu Lys Lys Glu Ala Phe Ala Lys Thr Thr Lys Leu Thr Leu Ser Ala
290 295 300

ES 2 605 305 T3

Lys Ser Ile Arg Ser Thr Leu His
305 310

<210> 16

<211> 939

5 <212> ADN

<213> Mus Musculus

<400> 16

atgacctctt	gtgttgctaa	agaacctatt	aagaagattg	ccatctttgg	agggactcat	60
ggaaatgaac	tgaccggagt	gtttctagtt	actcactggc	taaggaatgg	cactgaagtt	120
cacagagcag	ggctggacgt	gaagccattc	attaccaatc	caagggcggg	ggagaagtgc	180
accagataca	ttgactgtga	cctgaatcgt	gtttttgacc	ttgaaaatct	tagcaaagag	240
atgtctgaag	acttgccata	tgaagtgaga	agggctcaag	aaataaatca	tttattttggt	300
ccaaaaaata	gtgatgatgc	ctatgacctt	gtttttgacc	ttcacaacac	cacttctaac	360
atgggttgca	ctcttattct	tgaggattcc	aggaatgact	ttttaattca	gatgtttcac	420
tatattaaga	cttgcattgg	tccattacc	tgctctgttt	atctcattga	gcatccttca	480
ctcaaatatg	caaccactcg	ttccattgcc	aagtatcctg	ttggtataga	agttggctcct	540
cagcctcacg	gtgtccttag	agctgatatt	ttagaccaa	tgagaaaaat	gataaaacat	600
gctcttgatt	ttatacagca	tttcaatgaa	ggaaaagaat	ttcctccctg	ttctattgac	660
gtctataaaa	taatggagaa	agttgattat	ccaaggaatg	aaagtggaga	catggctgct	720
gttattcatc	ctaactctgca	ggatcaagac	tggaaacat	tgcaccctgg	agatcctgtg	780
tttgtgtctc	ttgatggaaa	agttattcca	ctgggtggag	actgtaccgt	gtaccctgtg	840
tttgtgaatg	aagctgcata	ttatgaaaaa	aaagaagcat	ttgcaaagac	aacaaaacta	900
acactcagcg	caaaaagcat	ccgctccact	ttgcactaa			939

10

<210> 17

<211> 465

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 605 305 T3

```

atggcgacga aggccgtgtg cgtgctgaag ggcgacggcc cagtgcaggg catcatcaat      60
ttcgcagcaga aggaaagtaa tggaccagtg aaggtgtggg gaagcattaa aggactgact      120
gaaggcctgc atggattcca tgttcatgag ttggagata atacagcagg ctgtaccagt      180
gcaggtcctc actttaatcc tctatccaga aaacacgggtg ggccaaagga tgaagagagg      240
catgttggag acttgggcaa tgtgactgct gacaaagatg gtgtggccga tgtgtctatt      300
gaagattctg tgatctcact ctcaggagac cattgcatca ttggccgcac actggtggtc      360
catgaaaaag cagatgactt gggcaaaggt ggaatgaag aaagtacaaa gacaggaaac      420
gctggaagtc gtttggcttg tgggtgaatt gggatcgccc aataa                        465

```

<210> 18

<211> 154

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
 1          5          10          15

Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val
 20          25          30

Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val
 35          40          45

His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His
 50          55          60

Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg
 65          70          75          80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala
 85          90          95

Asp Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys
 100         105         110

Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly
 115         120         125

Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg
 130         135         140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln
 145         150

```

10

ES 2 605 305 T3

<210> 19

<211> 465

<212> ADN

<213> Mus Musculus

5

<400> 19

```
atggcgatga aagcgggtgtg cgtgctgaag ggcgacggtc cgggtgcaggg aaccatccac      60
ttcgagcaga aggcaagcgg tgaaccagtt gtgttgctcag gacaaattac aggattaact      120
gaaggccagc atggggtcca cgtccatcag tatggggaca atacacaagg ctgtaccagt      180
gcaggacctc attttaatcc tcactctaag aaacatgggtg gcccggcgga tgaagagagg      240
catgttggag acctgggcaa tgtgactgct ggaaaggacg gtgtggccea tgtgtccatt      300
gaagatcgtg tgatctcact ctcaggagag cattccatca ttggccgtac aatggtggtc      360
catgagaaac aagatgactt gggcaaaggt ggaaatgaag aaagtacaaa gactggaaat      420
gctgggagcc gcttggcctg tggagtgatt gggattgcgc agtaa                          465
```

10

<210> 20

<211> 154

<212> PRT

<213> Mus Musculus

15

<400> 20

ES 2 605 305 T3

Met Ala Met Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
 1 5 10 15

Gly Thr Ile His Phe Glu Gln Lys Ala Ser Gly Glu Pro Val Val Leu
 20 25 30

Ser Gly Gln Ile Thr Gly Leu Thr Glu Gly Gln His Gly Phe His Val
 35 40 45

His Gln Tyr Gly Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60

Phe Asn Pro His Ser Lys Lys His Gly Gly Pro Ala Asp Glu Glu Arg
 65 70 75 80

His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Gly Lys Asp Gly Val Ala
 85 90 95

Asn Val Ser Ile Glu Asp Arg Val Ile Ser Leu Ser Gly Glu His Ser
 100 105 110

Ile Ile Gly Arg Thr Met Val Val His Glu Lys Gln Asp Asp Leu Gly
 115 120 125

Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg
 130 135 140

Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln
 145 150

<210> 21

<211> 5243

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 21

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt

60

ES 2 605 305 T3

ggtcgcccg	cctcagtgag	cgagcgagcg	cgagagagg	gagtgtagcc	atgctctagg	120
aagatcaatt	caattcacgc	gtcgacattg	attattgact	agttattaat	agtaatcaat	180
tacggggtca	ttagttcata	gcccatatat	ggagttccgc	gttacataac	ttacggtaaa	240
tggcccgct	ggctgaccgc	ccaacgacc	ccgccattg	acgtcaataa	tgacgtatgt	300
toccatagta	acgccaatag	ggactttcca	ttgacgtcaa	tgggtgata	tttacggtaa	360
actgccact	tggcagtaca	tcaagtgtat	catatgcaa	gtacgcccc	tattgacgtc	420
aatgacggta	aatggccgc	ctggcattat	gccagtaca	tgacctatg	ggactttcct	480
acttggcagt	acatctacgt	attagtcac	gctattacca	tgtcgaggcc	acgttctgct	540
tcactctccc	catctcccc	ccctcccac	ccccaat	gtatttatt	atTTTTaat	600
tattttgtgc	agcgatggg	gCGGGGGG	ggggcgcg	ccaggcggg	cgggcgggg	660
cgagggcg	ggcgggcga	ggcgagagg	tgcggcgca	gccaatcaga	gCGGCGGCT	720
ccgaaagttt	ccttttatg	cgagcgcg	gCGGCGGCG	ccctataaaa	agcgaagcg	780
gCGGCGGCG	ggagcaagct	ctagcctcga	gaattcacgc	tggtacctc	tagagcagag	840
ctcgtttagt	gaaccgtcag	ttcgaatcg	ccaccatggt	gagcaaggg	gaggagctgt	900
tcaccggggt	ggtgccatc	ctggtcgag	tggacggcga	cgtaaagcg	cacaagttca	960
gcgtgtccg	cgagggcg	ggcgatgcca	cctacggcaa	gctgaccctg	aagttcatct	1020
gcaccaccg	caagtgcc	gtgcctg	ccaccctg	gaccaccctg	acctacggcg	1080
tgcagtgtt	cagccgtac	cccgaccaca	tgaagcagca	cgacttctt	aagtccgcca	1140
tgcccgaag	ctacgtccag	gagcgacca	tcttcttcaa	ggacgacgg	aactacaaga	1200
cccgcgccga	ggtgaagtt	gagggcgaca	ccctggtgaa	ccgcatcgag	ctgaagggca	1260
tcgacttcaa	ggagacgg	aacatcctg	ggcacaagct	ggagtacaac	tacaacagcc	1320
acaacgtcta	tatcatggc	gacaagcaga	agaacggcat	caaggtgaac	ttcaagatcc	1380
gccacaacat	cgagacgg	agcgtgcag	tcgccgacca	ctaccagcag	aacaccccc	1440
tcggcgacgg	ccccgtgct	ctgcccgaca	accactacct	gagcaccag	tcggccctga	1500
gaaaagacc	caacgagaag	cgcgatcaca	tggtcctgct	ggagttcgtg	accgcccgg	1560
ggatcactct	oggcattgg	gagctgtaca	agtaagtaac	aggtaatg	gatcgctaat	1620
gCGGAAAGC	tcttattc	gtgagatgg	ctggggcacc	atctggggac	cctgacgtga	1680
agtttgtcac	tgactggaga	actcggttg	tcgtctgtg	cgggggcgg	agttatggcg	1740
gtgccgttg	gcagtgcacc	cgtaccttg	ggagcgcg	ccctcgtcgt	gtcgtgacgt	1800
caccggttct	gttggtacct	gctgttgaca	gtgagcgacg	caatgtgact	tcgctgacaa	1860
agctgtgaag	ccacagatg	gctttgtcag	cagtcacatt	gcgctgccta	ctgcctcgga	1920
cttcaaggg	tcgagaattc	agggggggc	cacctgccg	taggtgtg	gtaggctttt	1980
ctccgtcgca	ggacgcagg	ttcgggceta	gggtaggctc	tcctgaatcg	acagggcgg	2040

ES 2 605 305 T3

gacctctggc ggccgcaaca acgcgttcct gaccattcat cctctttctt tttcctgcag 2100
gcttgaggaa gaaatgggat ccgatctttt tccctctgcc aaaaattatg gggacatcat 2160
gaagcccctt gagcatctga cttctggcta ataaggaaa tttattttca ttgcaatagt 2220
gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg cctaggtaga taagtagcat ggcgggttaa 2280
tcattaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 2340
cgctcactga ggccgggga ccaaaggctg cccgacgcc gggctttgcc cgggcggcct 2400
cagtgcgca gcgagcgcgc agccttaatt aacctaatc actggccgtc gttttacaac 2460
gtcgtgactg ggaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt 2520
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg ccctcccaa cagttgcgca 2580
gcctgaatgg cgaatgggac gcgccctgta gcggcgcatt aagcgcggcg ggtgtggtgg 2640
ttacgcgcag cgtgaccgct aacttgcca gcgccctagc gcccgctcct ttcgctttct 2700
tcccttcctt tctcgccacg ttcgccggct tccccgtca agctctaat cgggggctcc 2760
ctttagggtt ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaactt gattagggtg 2820
atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgcccttg acgttgaggt 2880
ccacgttctt taatagtga ctctgttcc aaactggaac aacctcaac cctatctcgg 2940
tctattcttt tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc 3000
tgatttaaca aaaatttaac gcgaatttta acaaatatt aacgcttaca atttaggtgg 3060
cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa 3120
tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa 3180
gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct 3240
tcctgttttt gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg 3300
tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg 3360
ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagt ctgctatgtg gcgcggtatt 3420
atcccgattt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga 3480
cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcattctacg gatggcatga cagtaagaga 3540
attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacctgcg gccaaacttac ttctgacaac 3600
gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgcacaac atgggggatc atgtaactcg 3660
ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac 3720
gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct 3780
agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct 3840
gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg 3900
gtctcgggtt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctccgta tcgtagttat 3960

ES 2 605 305 T3

ctacacgacg gggagtcagc caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg 4020
 tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat 4080
 tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct 4140
 catgacccaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 4200
 gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa 4260
 aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc 4320
 gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta 4380
 gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct 4440
 gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtcct accgggttgg actcaagacg 4500
 atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag 4560
 cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaagcgc 4620
 cacgcttccc gaaggagaaa aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg 4680
 agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcggggtt 4740
 tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg 4800
 gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca 4860
 catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg 4920
 agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc 4980
 ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag 5040
 ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag 5100
 ttagctcact cattaggcac ccaggtttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg 5160
 tggaaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccag 5220
 atttaattaa ggccttaatt agg 5243

<210> 22

<211> 108

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 22

tgctgttgac agtgagcgac atcatcaatt ttccgagcag aactgtgaag ccacagatgg 60
 gttctgctcg aaattgatga tgctgcctac tgcctcggac ttcaaggg 108

ES 2 605 305 T3

<210> 23
<211> 106
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 23

10

tgctgttgac agtgagcgac gcattaaagg atcctgactg actgtgaagc cacagatggg 60
tcagtcagtc ctttaatgcg ctgcctactg cctcggactt caaggg 106

<210> 24
<211> 108
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

20

<400> 24

tgctgttgac agtgagcgac tgcattggatt ctccatgttc atctgtgaag ccacagatgg 60
gatgaacatg gaatccatgc agctgcctac tgcctcggac ttcaaggg 108

25

<210> 25
<211> 106
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 25

ES 2 605 305 T3

	tgctgttgac agtgagcgac aaggatgaag atcgaggcat gctgtgaagc cacagatggg	60
	catgcctctc ttcacacctg ctgcctactg cctcggactt caaggg	106
5	<210> 26 <211> 110 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
10	<223> Oligonucleótido sintético <400> 26	
	tgctgttgac agtgagcgac gcaatgtgac ttcgctgaca aagctgtgaa gccacagatg	60
	ggctttgtca gcagtcacat tgcgctgcct actgcctcgg acttcaaggg	110
15	<210> 27 <211> 108 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético <400> 27	
	tgctgttgac agtgagcgac cgatgtgtct atcttgaaga ttctgtgaag ccacagatgg	60
25	gaatcttcaa tagacacatc ggctgcctac tgcctcggac ttcaaggg	108
30	<210> 28 <211> 106 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
	<223> Oligonucleótido sintético <400> 28	

ES 2 605 305 T3

	<code>tgctgttgac agtgagcgac ggtggaaatg atcagaaagt actgtgaagc cacagatggg</code>	60
	<code>tactttcttc atttcaccg ctgcctactg cctcggactt caaggg</code>	106
	<210> 29	
	<211> 110	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 29	
	<code>tgctgttgac agtgagcgac gctgtagaaa ttcgtatcct gatctgtgaa gccacagatg</code>	60
	<code>ggatcaggat acatttctac agcgctgcct actgcctcgg acttcaaggg</code>	110
15	<210> 30	
	<211> 106	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 30	
	<code>tgctgttgac agtgagcgag gtattaaact tgtcagaatt tagtgaagcc acagatgtaa</code>	60
25	<code>attctgacaa gtttaatacc ctgcctactg cctcggactt caaggg</code>	106
	<210> 31	
	<211> 106	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	

ES 2 605 305 T3

<400> 31

tgctggttgac agtgagcgcac gatgctctaa tcggttctat caagtgaagc cacagatggt 60

gatagaacct tagagcatcg ctgcctactg cctcggactt caaggg 106

<210> 32

5 <211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 32

cgaaatacat acttctttac attccatt 28

15 <210> 33

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 33

cgaatggaat gtaaagaagt atgtattt 28

25

<210> 34

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 34

35 cgaaacaac accattgtca cactccatt 29

ES 2 605 305 T3

	<210> 35	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5		
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 35	
10	cgaatggagt gtgacaatgg tgttggtt 29	
	<210> 36	
	<211> 72	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 36	
	cгаааасаа аасасасас аассаааа ааасасас асаассаа асаасасас	60
	асасасас аа	72
	<210> 37	
25	<211> 72	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 37	
	cgaatggaat gtaaagaagt atgtattgga atgtaaagaa gtatgtattg gaatgtaaag	60
	aagtatgtat tt	72

ES 2 605 305 T3

<210> 38
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 38

10

cgaacaaac accattgtca cactccaaca aacaccattg tcacactcca acaaacacca 60
ttgtcacact ccatt 75

<210> 39
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

20

<400> 39

cgaatggagt gtgacaatgg tgtttgttgg agtgtgacaa tgggtgttgt tggagtgtga 60
caatggtgtt tgttt 75

25

<210> 40
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 40
cgaatacat acttcttac attccaaca acaccattgt cacactccat t 51

35

ES 2 605 305 T3

<210> 41
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 41
10 cgaatggagt gtgacaatgg tgttgtgg aatgtaaaga agtatgtatt t 51

<210> 42
<211> 173
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 42

ttcgaactcg agatacatatc ttctttacat tccaatacat acttctttac attccaatac 60
atacttcttt acattccacc atggactagt acaaacacca ttgtcacact ccaacaaaca 120
ccattgtcac actccaacaa acaccattgt cacactccag cggccgcttc gaa 173

25 <210> 43
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 43
atcgggcccg actgcagttt cagcgtttg 29

35 <210> 44

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 44

cgcgggcccg actttacatt acacacaa 29

10

<210> 45

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 45

20

cgcgggcccg actgatgtgt gagagagac 29

<210> 46

<211> 29

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

30

<400> 46

cgcgggcccg acttccggcc tcccgaggc 29

<210> 47

<211> 20

35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 47
 5 tgaagctgaa gcctgtgatg 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 48
 15 gagcacctga cagcattgaa 20

<210> 49
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 49
 25 ctgagcaaca gctcatggaa 20

<210> 50
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 50

ttacttctgg caccacacca 20

<210> 51

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 51

tggtgtggtg ccagaagtaa 20

<210> 52

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 52

caacagatgg ctggcaacta 20

25 <210> 53

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 53

tgggagtggc acctcca 18

35

<210> 54

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 54

cgaccactac cagcagaaca 20

10 <210> 55

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 55

ctgtacagc tcgtccatgc 20

20

<210> 56

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 56

30 aatggcctca gaatgactgc 20

<210> 57

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 57

agtcgctttc acagccaaa 20

5

<210> 58

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 58

15

atgccaacac agtgctgtct gg 22

<210> 59

<211> 22

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

25

<400> 59

tgcttgctga tccacatctg ct 22

<210> 60

<211> 22

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

35

<400> 60

tgagtgatga caatggtgtt tg 22

<210> 61
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 61
10 aactatacaa cctactacct ca 22

<210> 62
<211> 22
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 62
20 agcctatcct ggattacttg aa 22

<210> 63
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
30

<400> 63
acagttcttc aactggcagc tt 22

<210> 64
35 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 605 305 T3

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 64

5 ctctgtatcg ttccaatttt agtata 26

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un rAAV que comprende (i) una proteína de la cápside que comprende la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 9 y (ii) un ácido nucleico que comprende un promotor operativamente unido con un transgén para su uso en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA); en el que el rAAV va a administrarse a tejido del sistema nervioso central (SNC) de un sujeto por administración intratecal, y opcionalmente también se administra por administración intracerebral.
2. El rAAV para el uso de la reivindicación 1, en el que el rAAV va a administrarse a tejido del SNC de un sujeto por administración intratecal y por administración intracerebral.
- 10 3. El rAAV para el uso de la reivindicación 2, en el que la administración intracerebral es una administración intraventricular.
4. El rAAV para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la administración intratecal es en la región cervical del canal espinal del sujeto.
5. El rAAV para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la administración intratecal es en la región torácica del canal espinal del sujeto.
- 15 6. El rAAV para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la administración intratecal es en la región lumbar del canal espinal del sujeto.
7. El rAAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la dosis del rAAV para administración intratecal o intracerebral está en un intervalo de 10^{10} copias de genoma a 10^{11} copias de genoma.
- 20 8. El rAAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el transgén codifica un ARN inhibidor que se une específicamente a ARNm de SOD1 e inhibe la expresión de SOD1 en el sujeto.
9. El rAAV para el uso de la reivindicación 8, en el que el ARN inhibidor tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 26.
10. El rAAV para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el rAAV se formula en una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

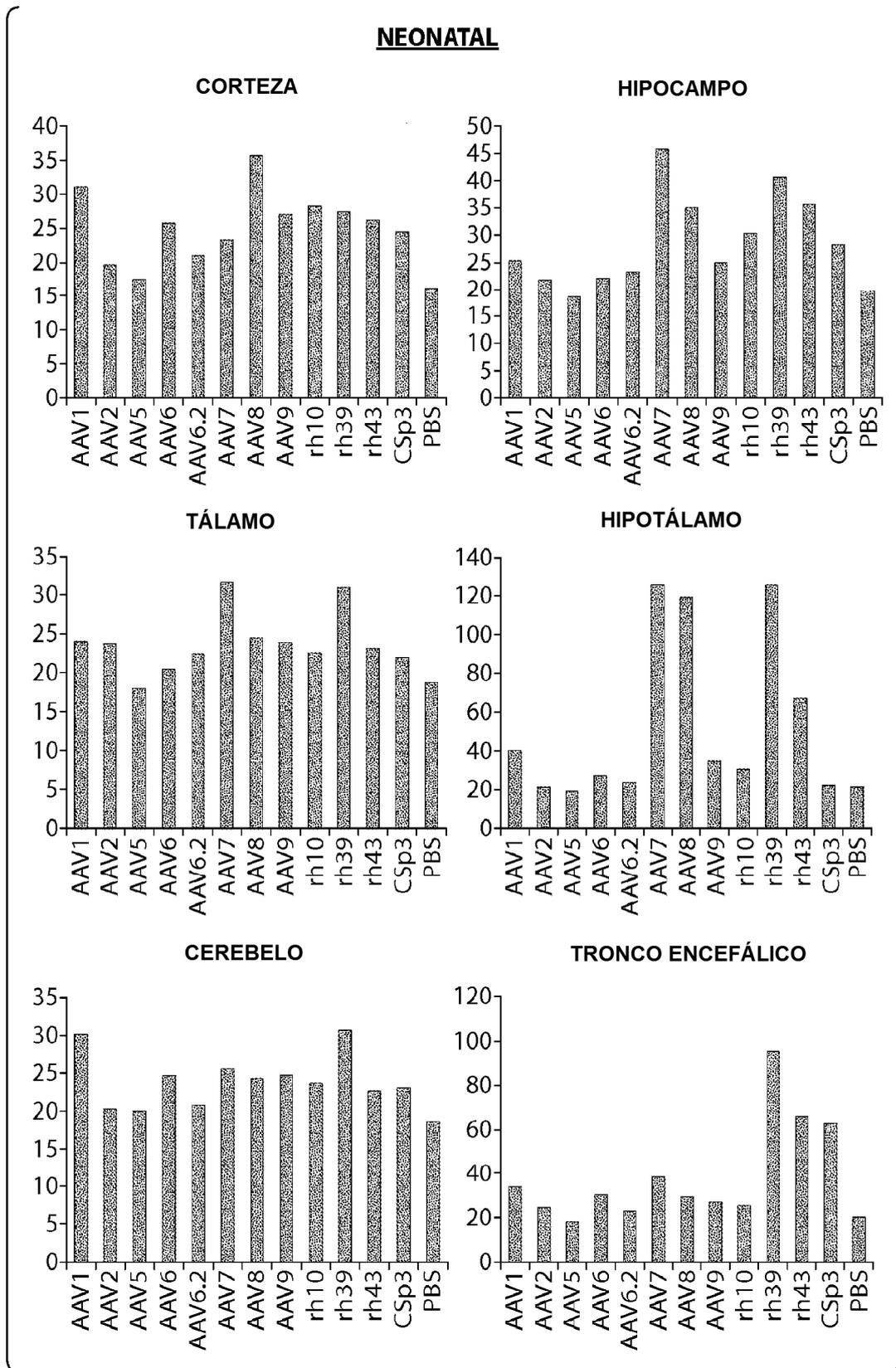


Fig. 1-1

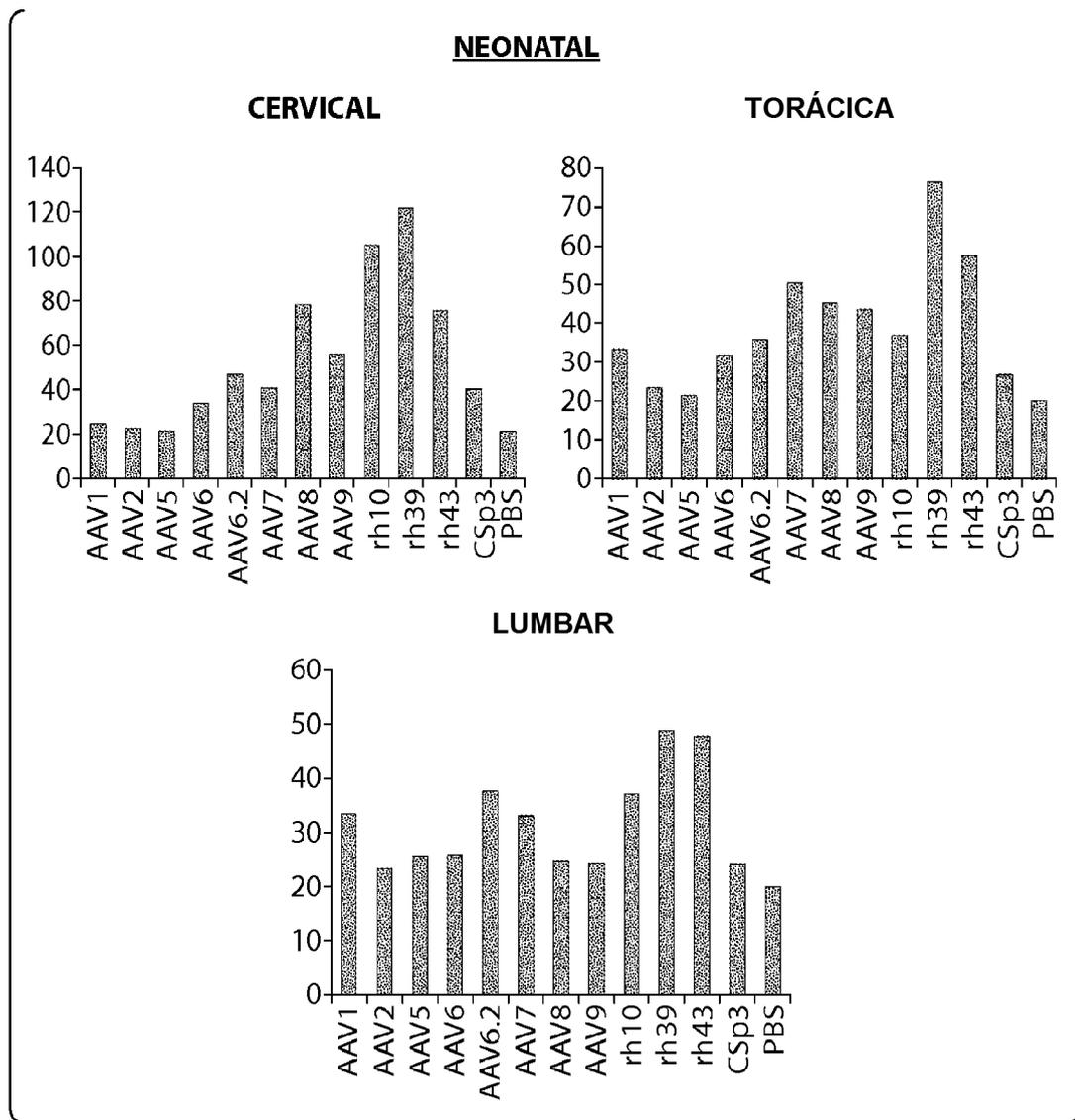


Fig. 1-2

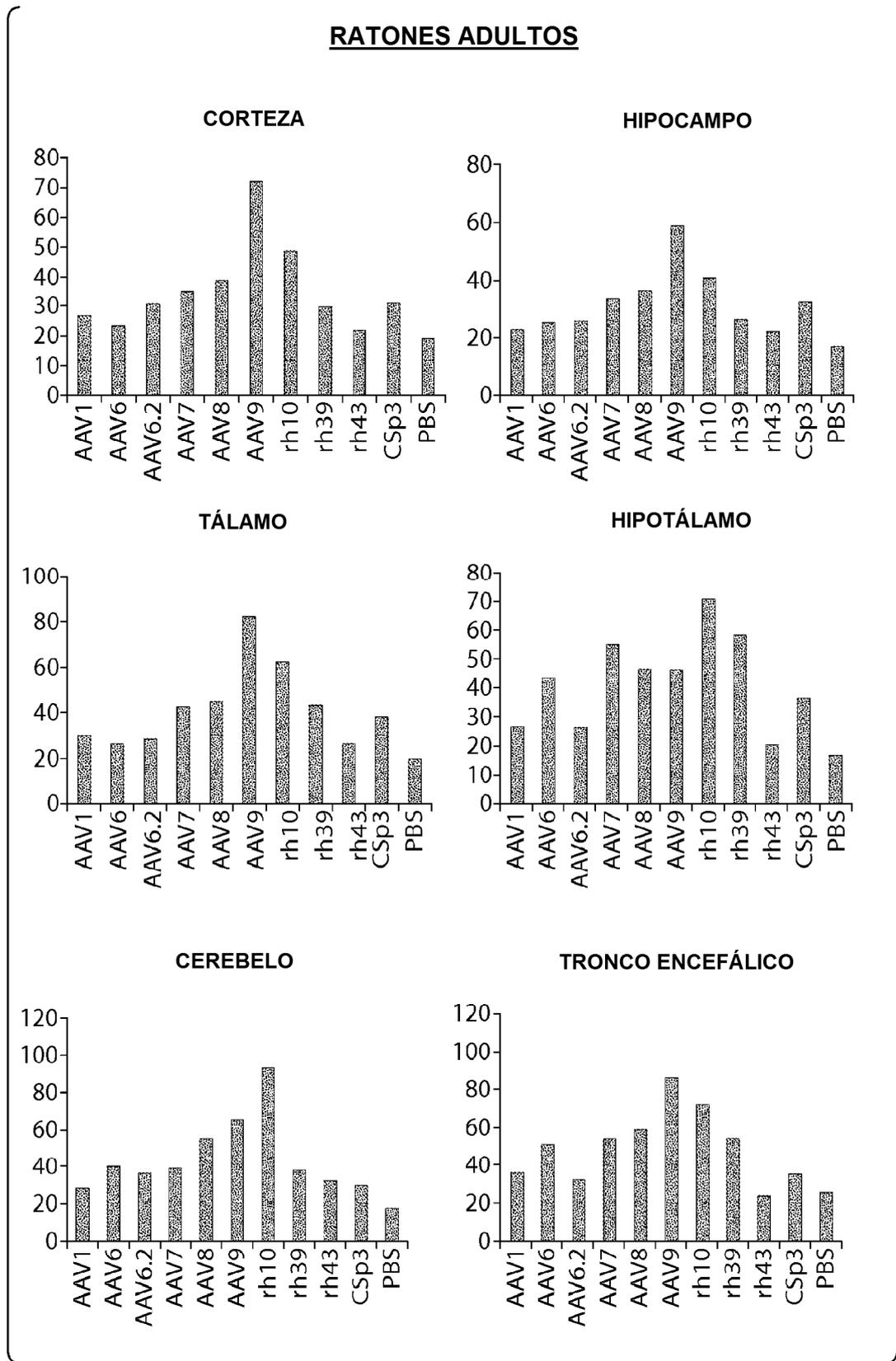


Fig. 2-1

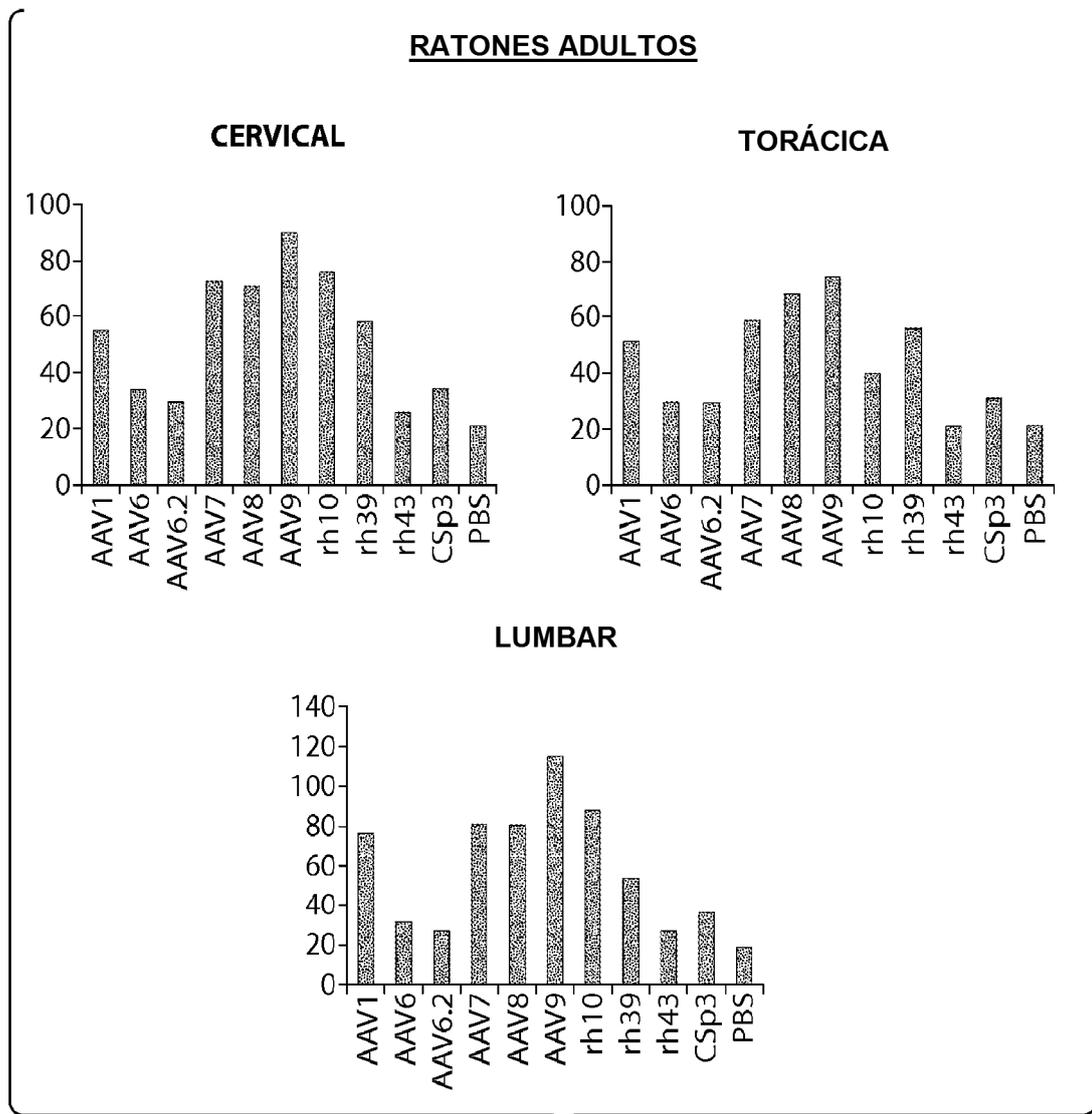


Fig. 2-2

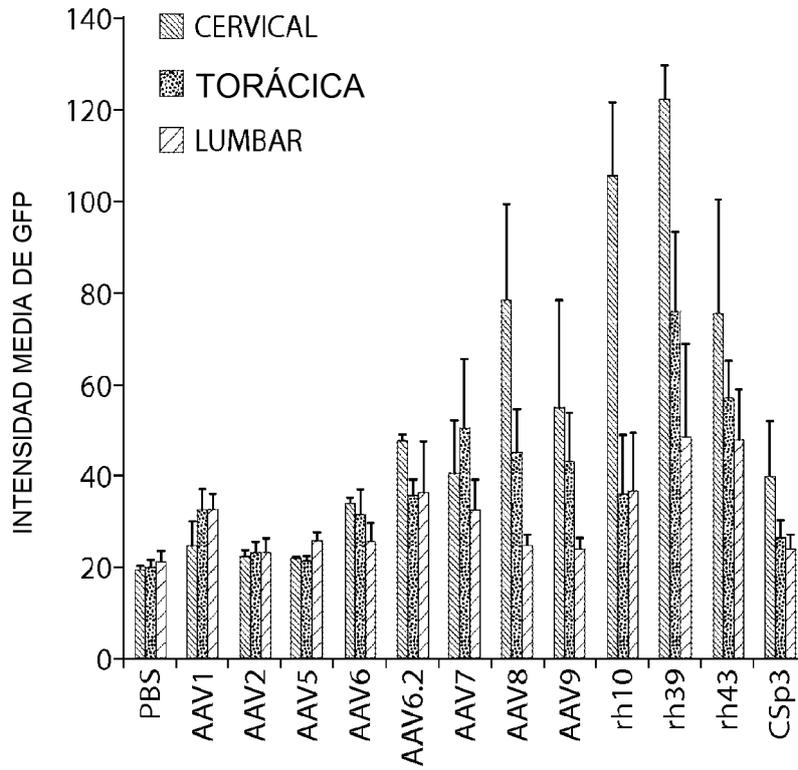


Fig. 3

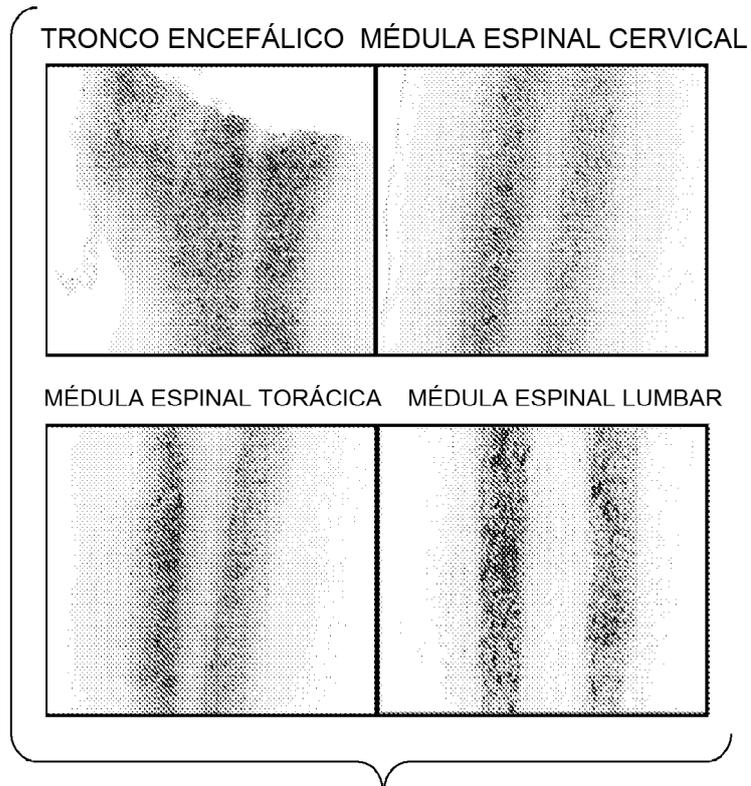


Fig. 4A

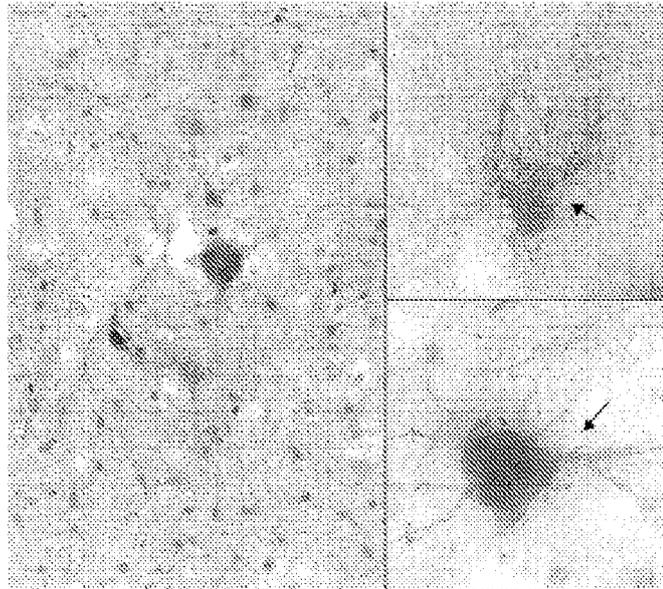


Fig. 4B

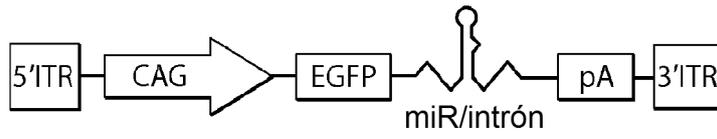


Fig. 5A

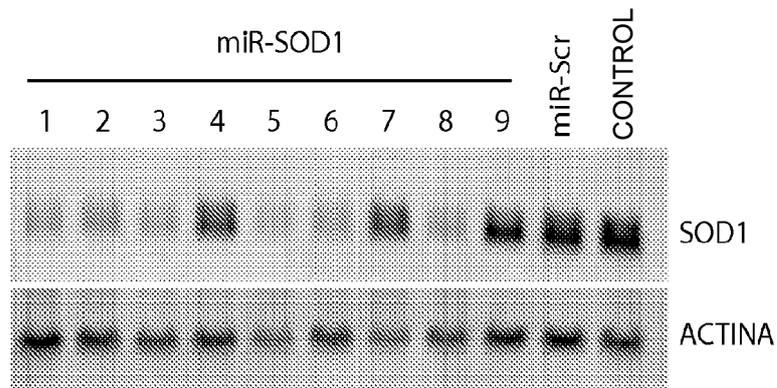


Fig. 5B

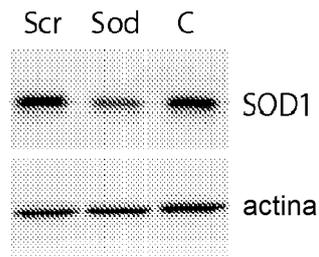


Fig. 5C

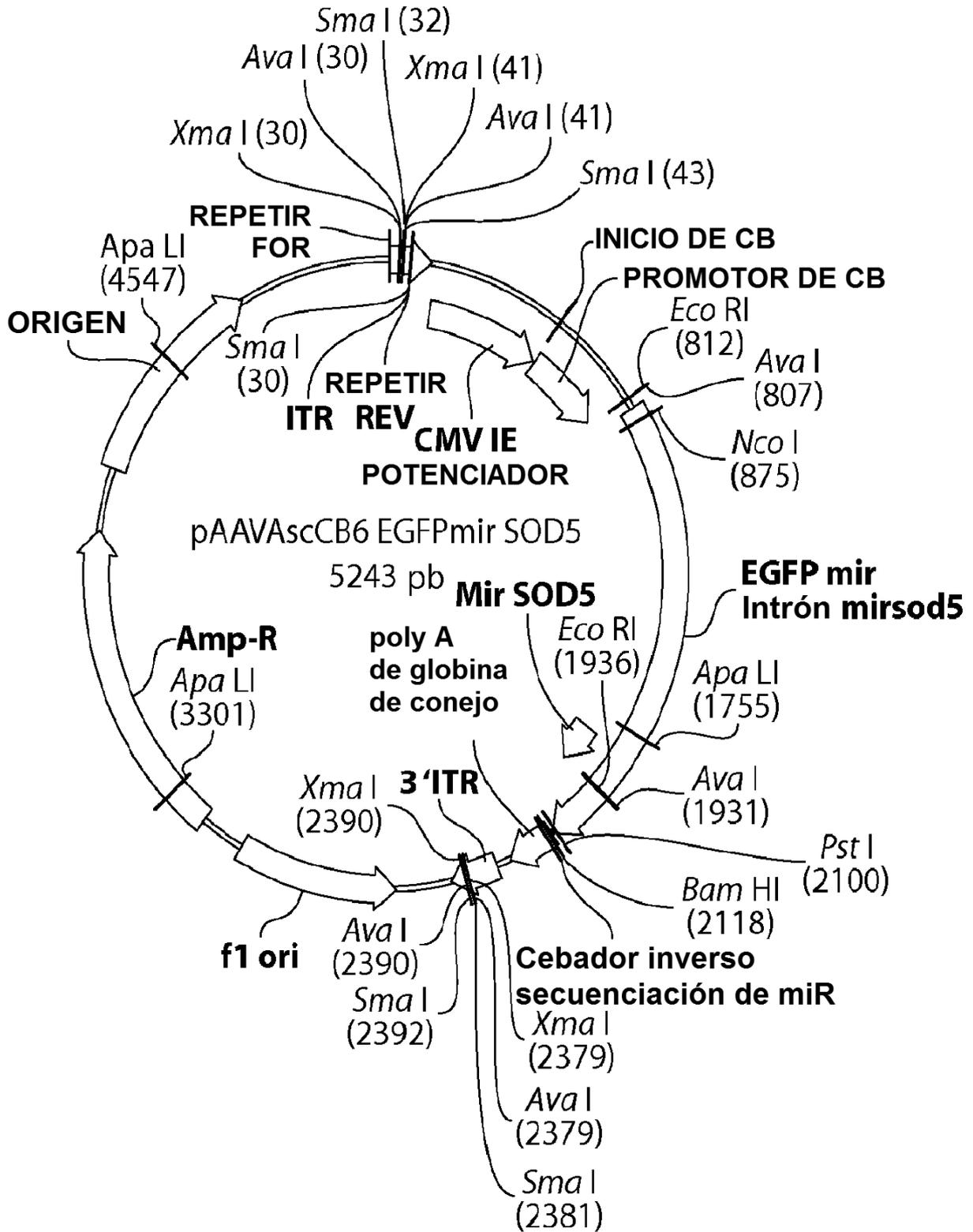


Fig. 5D

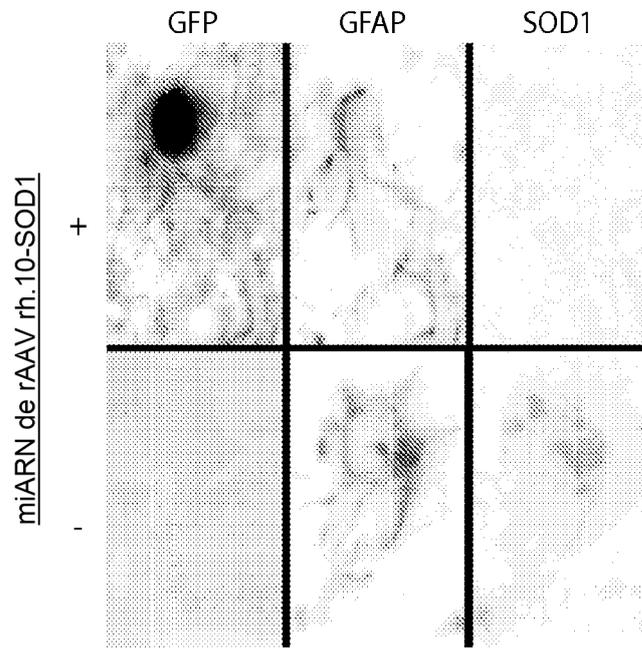


Fig. 6A

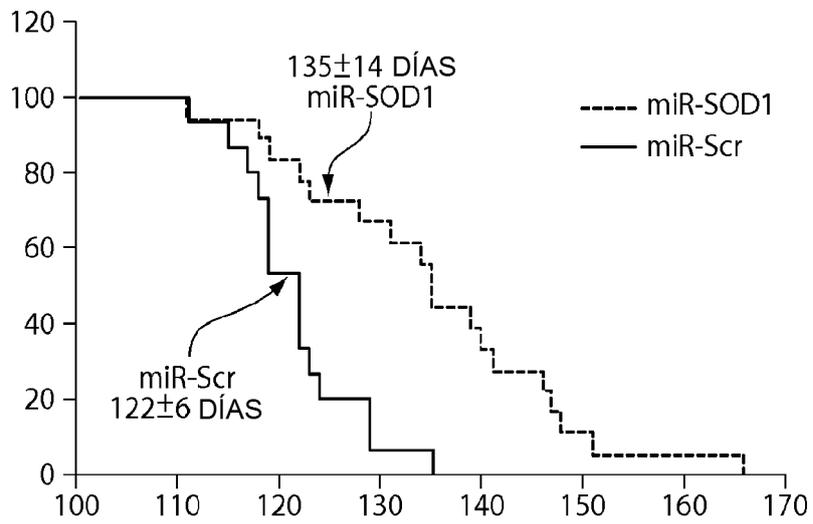


Fig. 6B

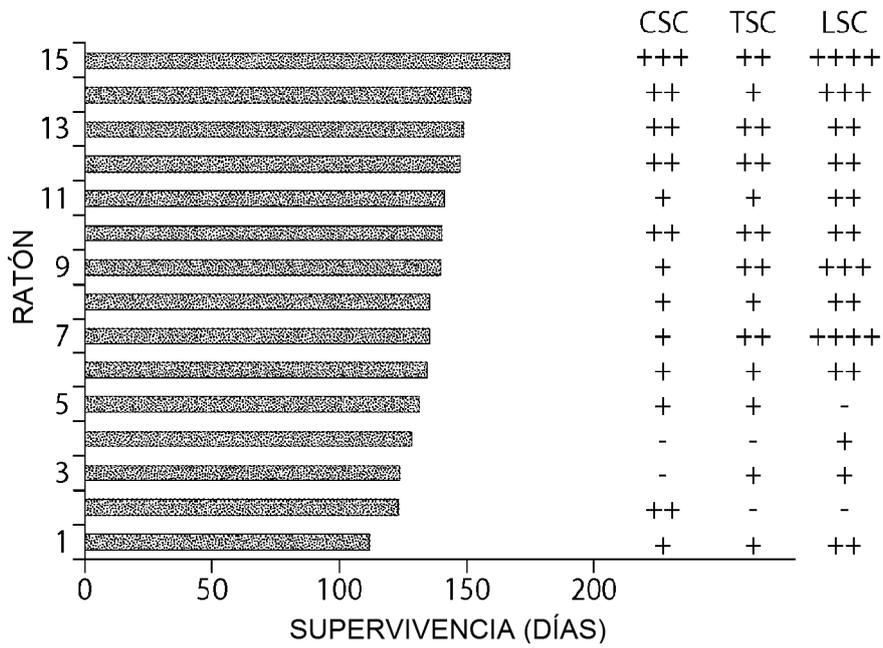


Fig. 7A

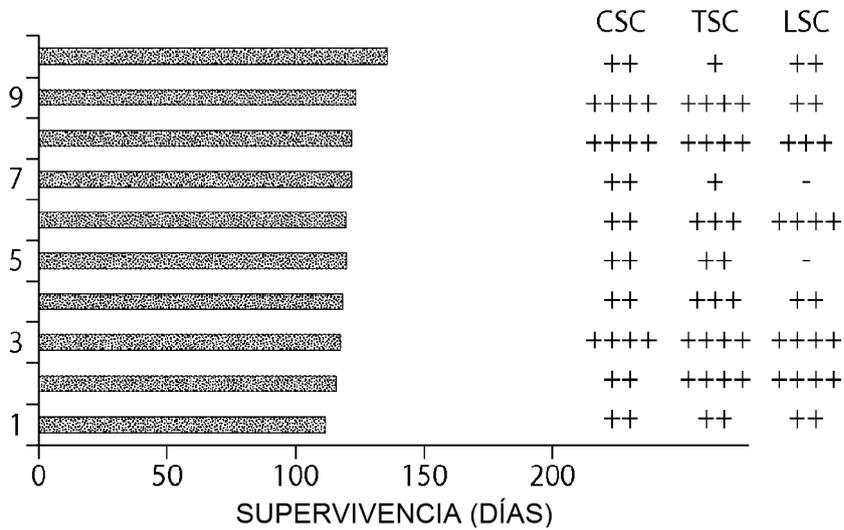


Fig. 7B

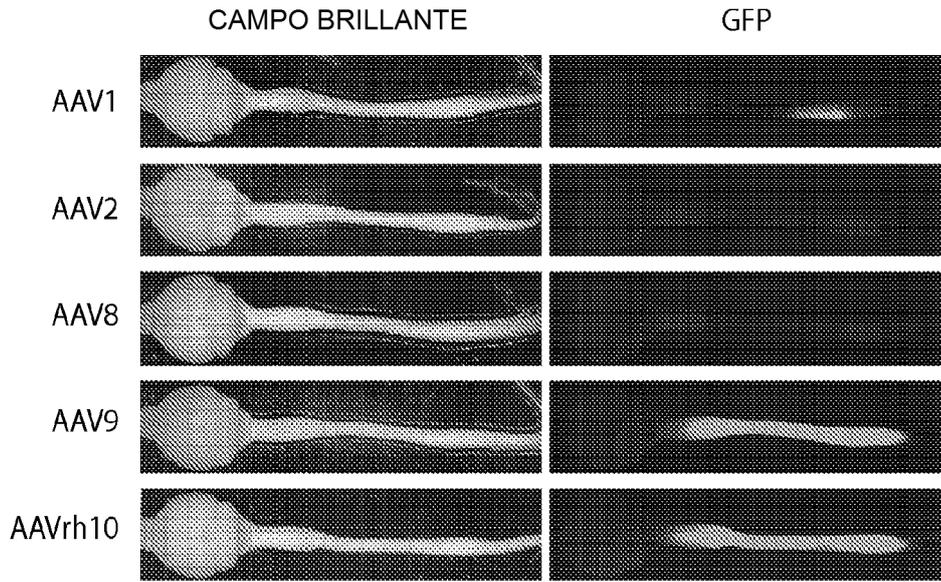


Fig. 8

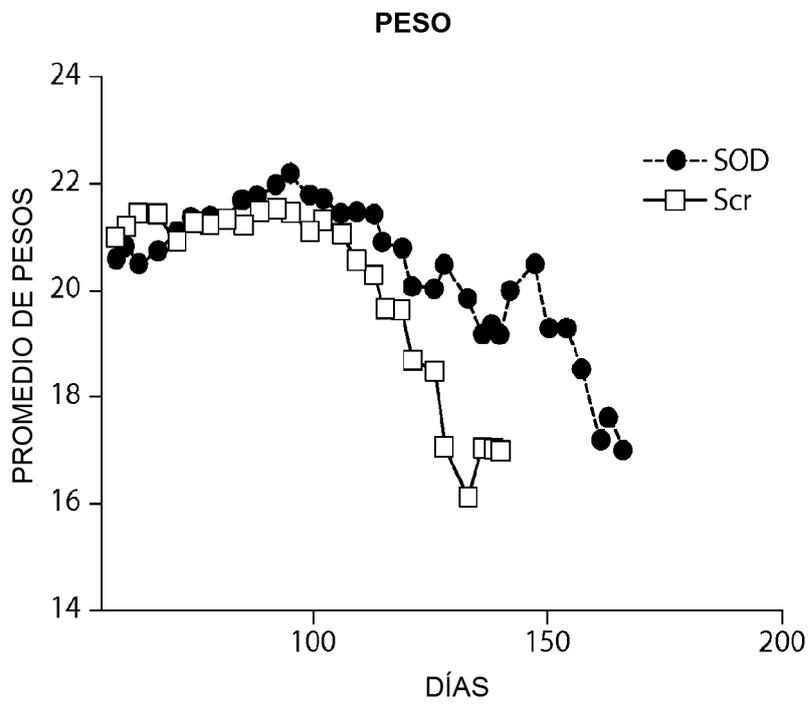


Fig. 9

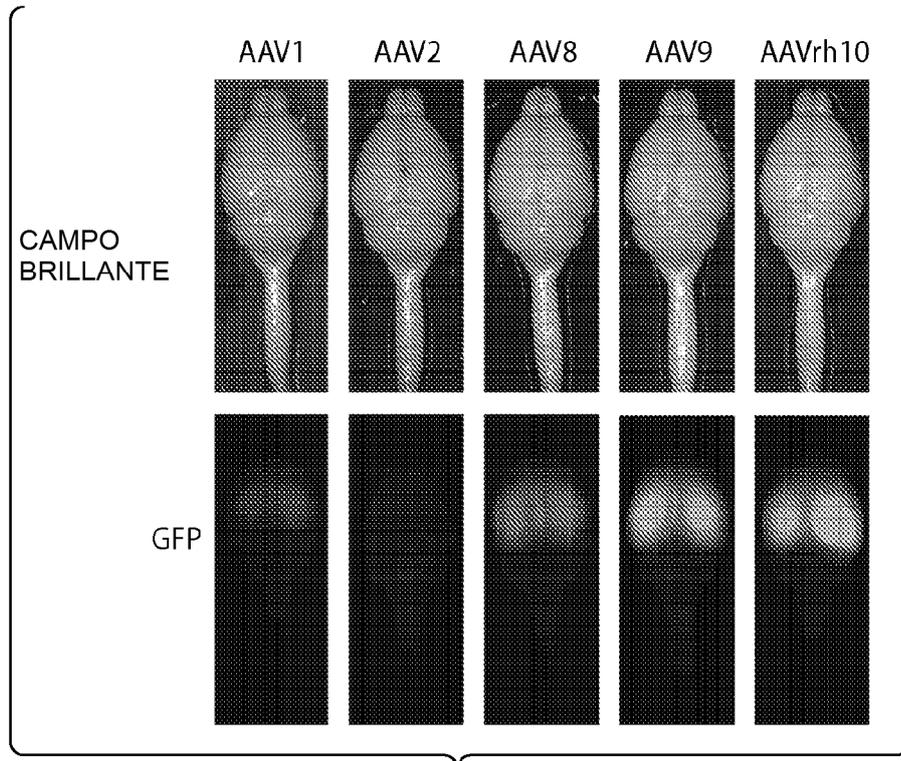


Fig. 10

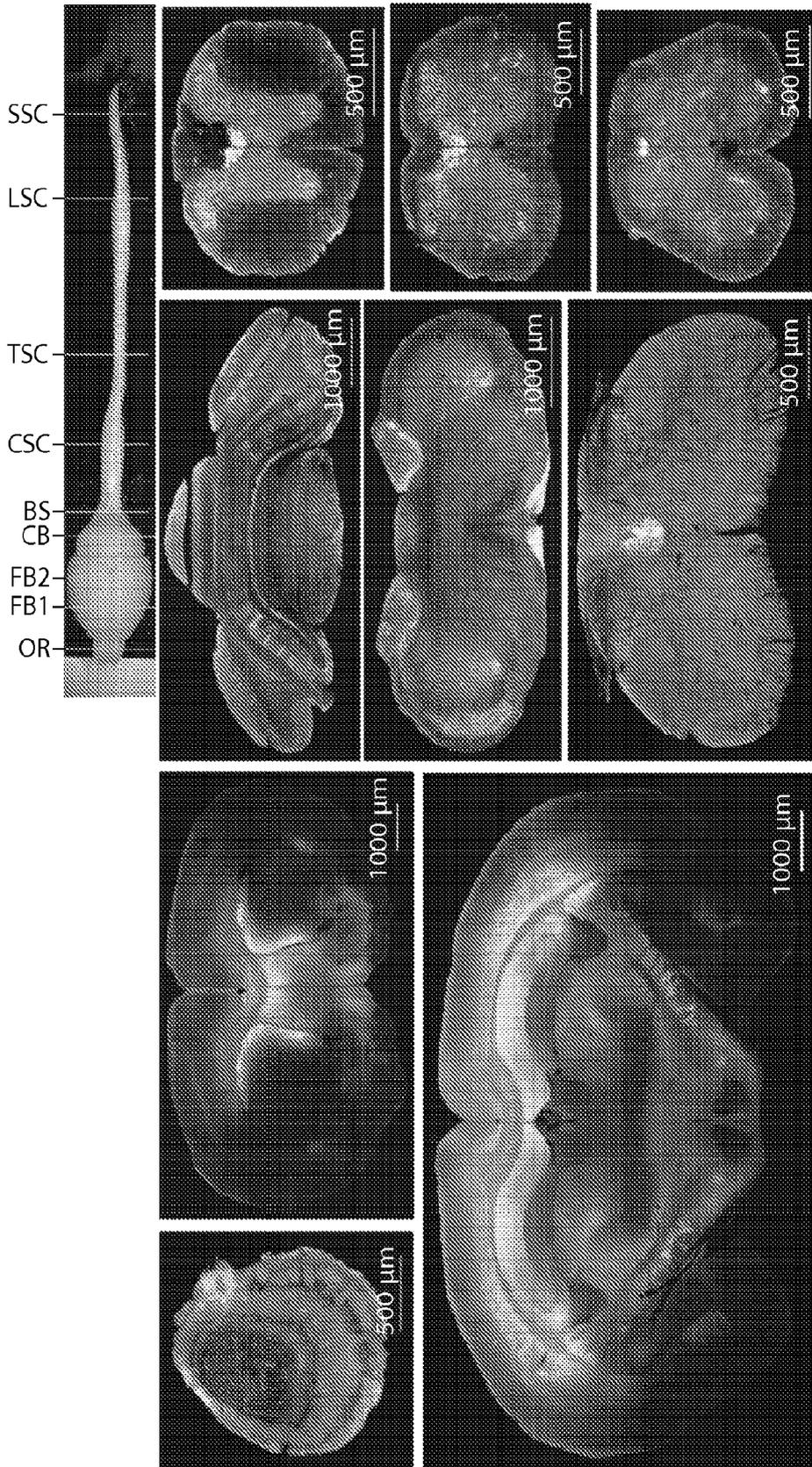


Fig. 11

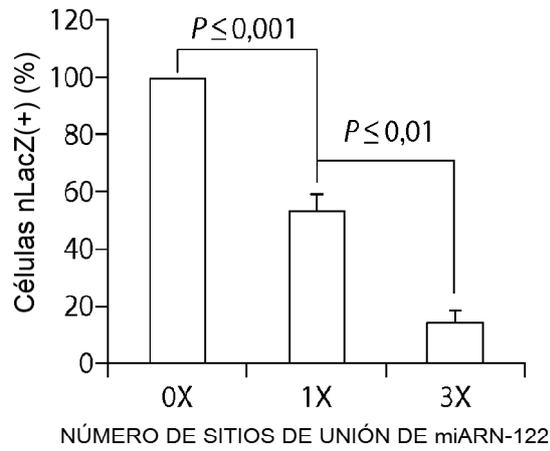


Fig. 12A

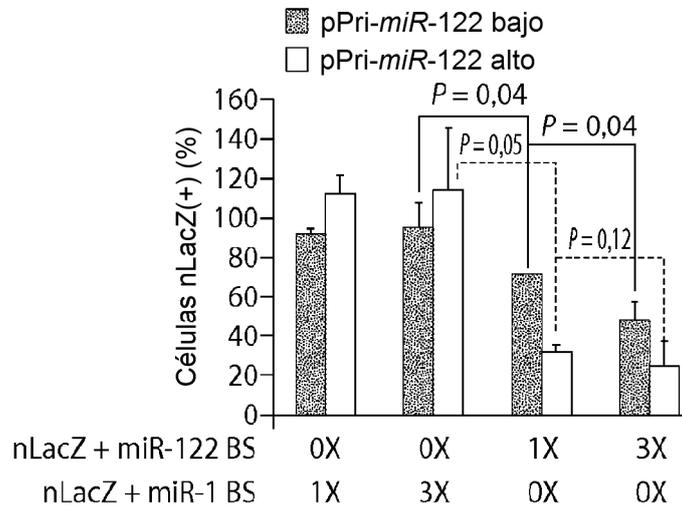


Fig. 12B

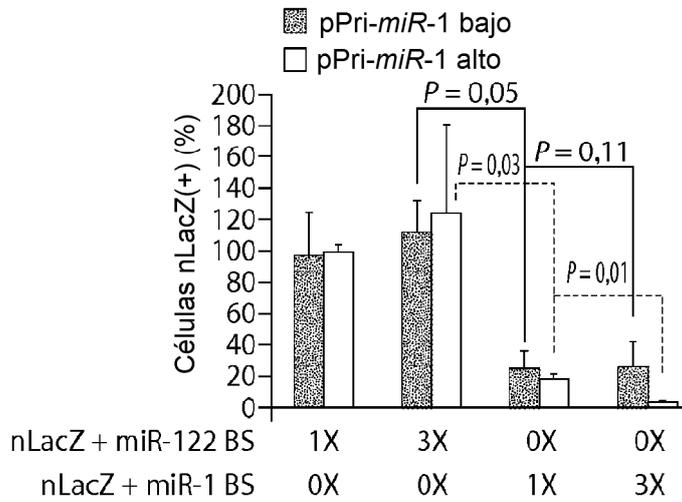


Fig. 12C

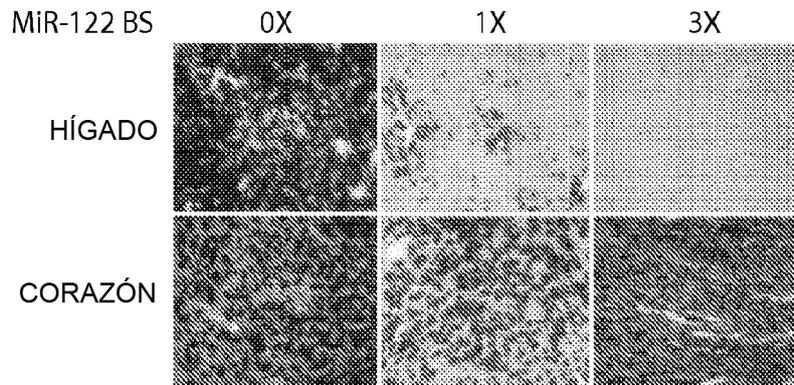


Fig. 13A

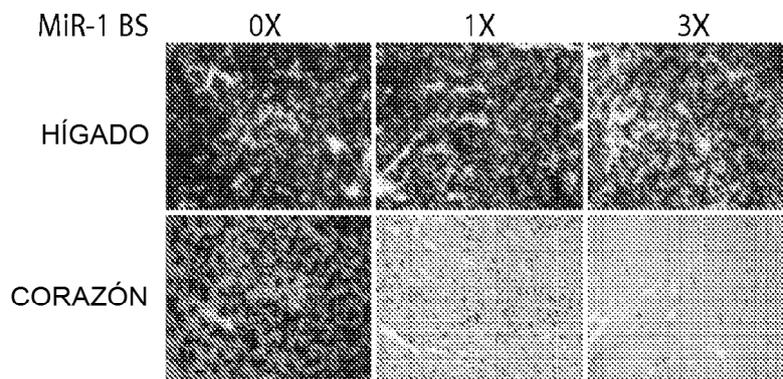


Fig. 13B

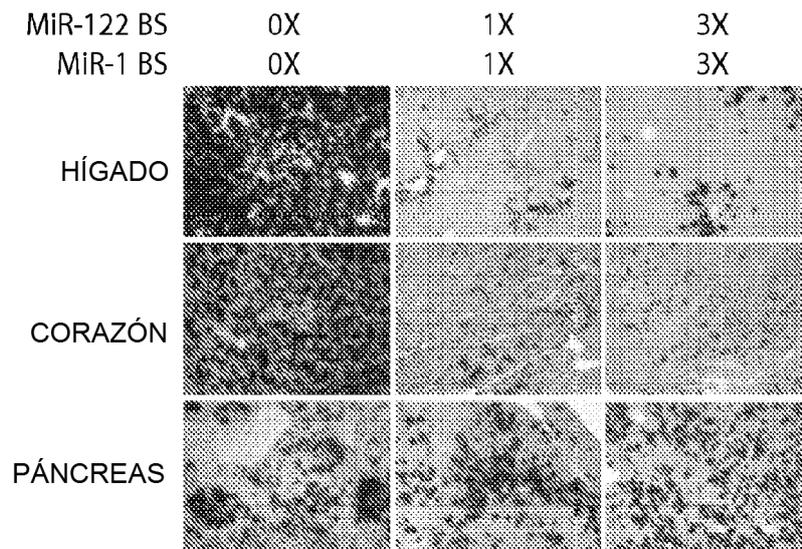


Fig. 13C

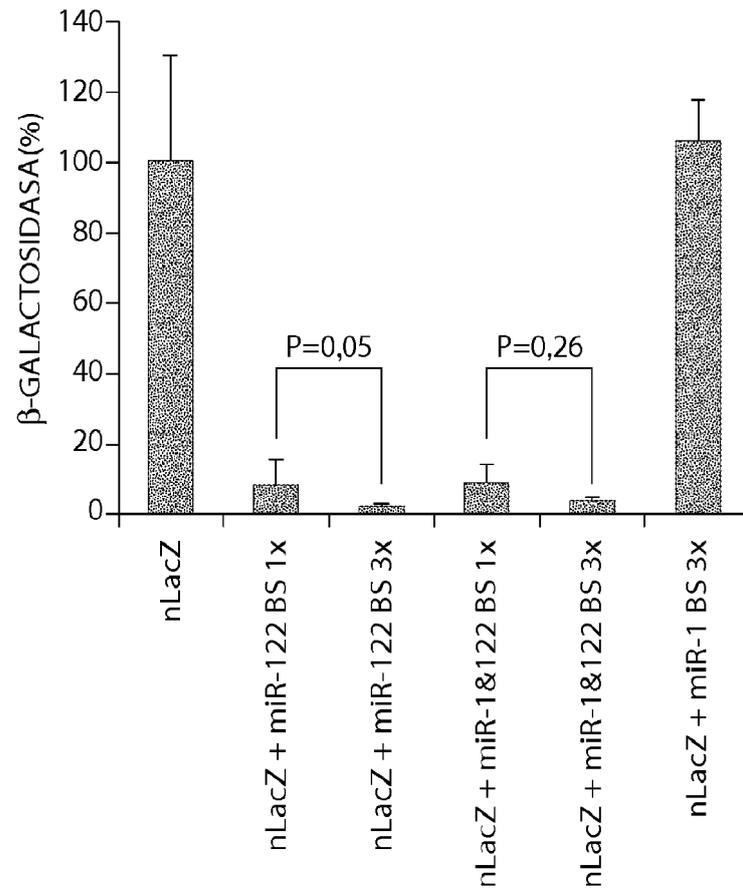


Fig. 13D

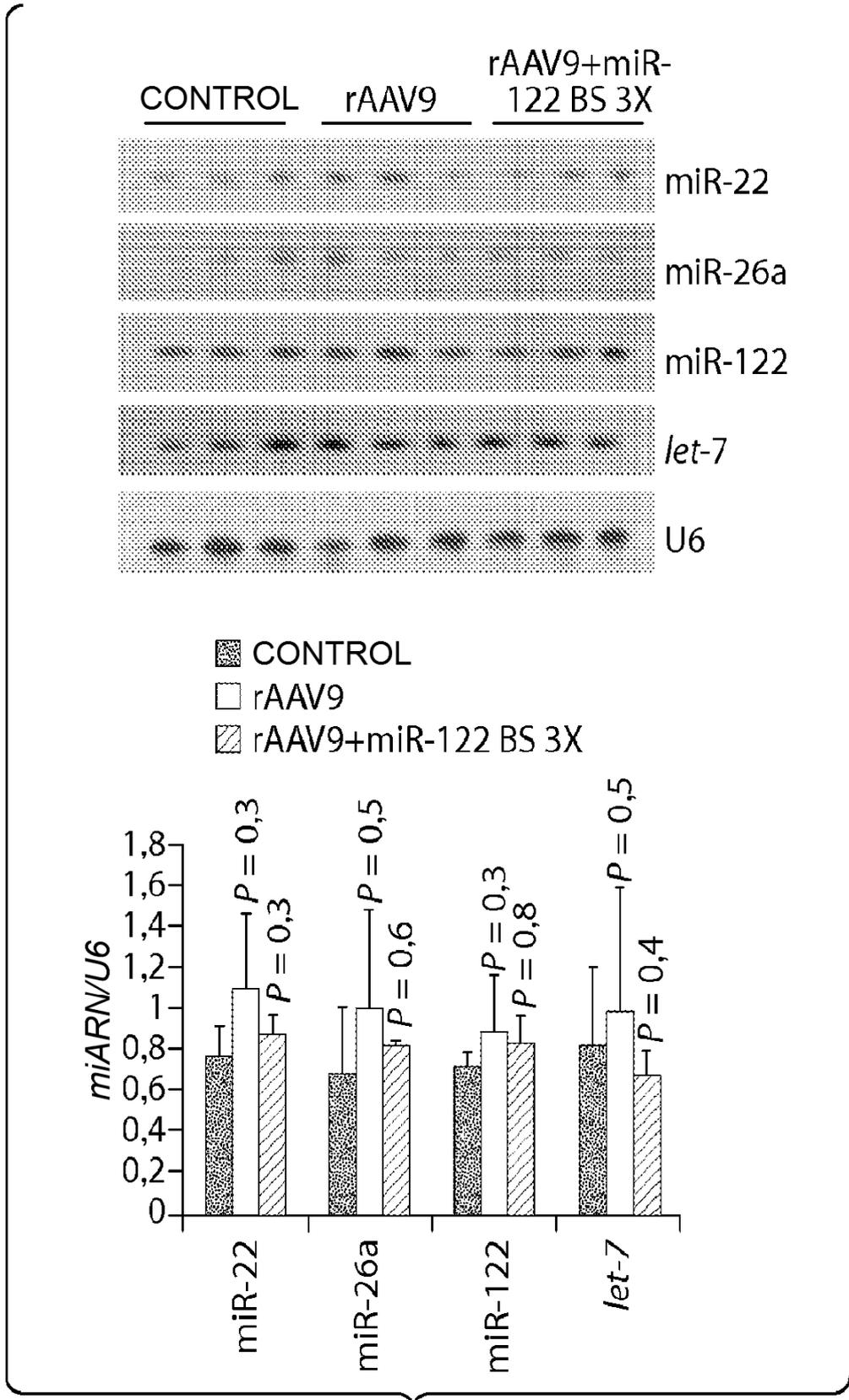


Fig. 14A

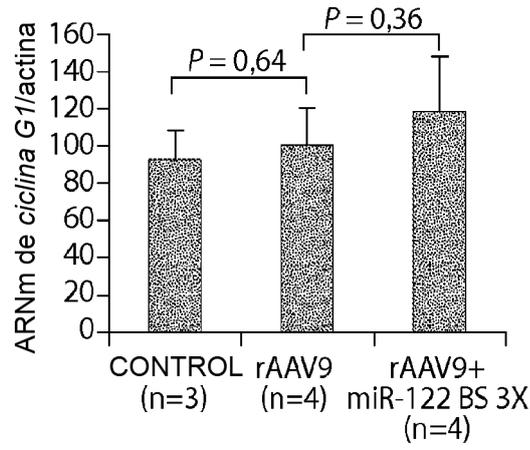


Fig. 14B

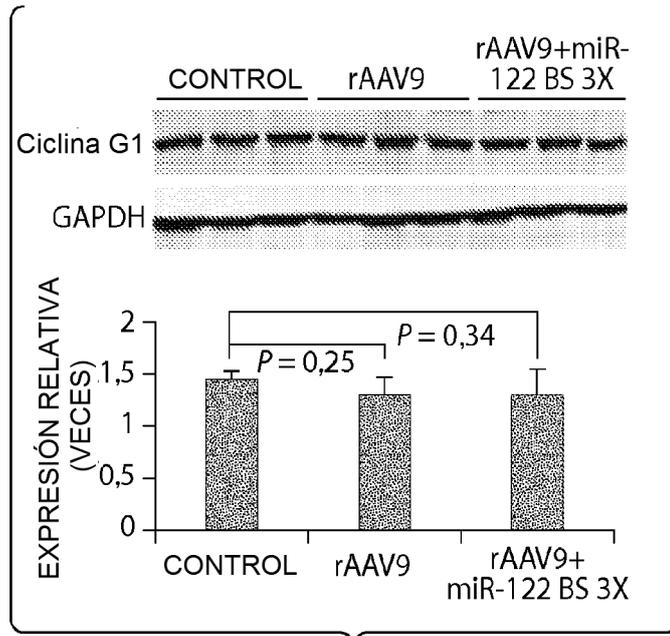


Fig. 14C

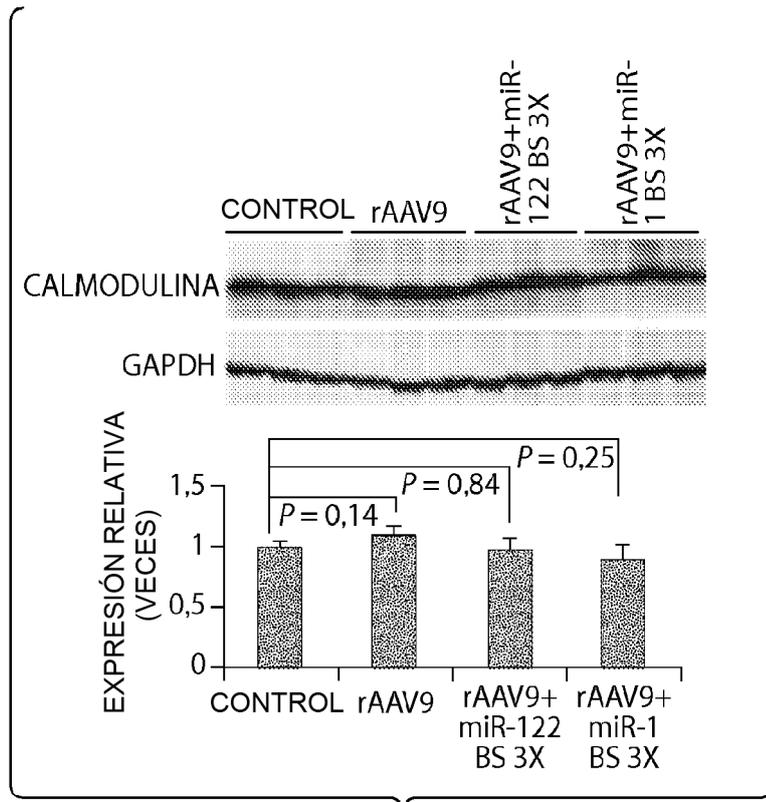


Fig. 14D

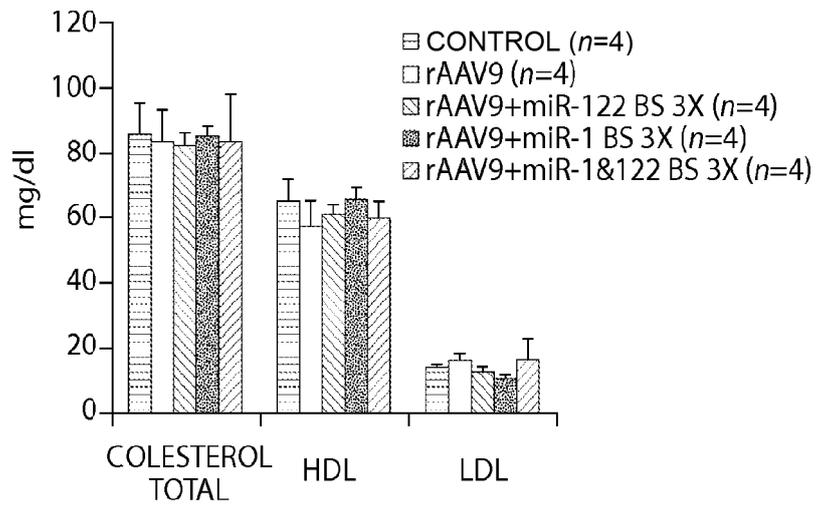


Fig. 14E

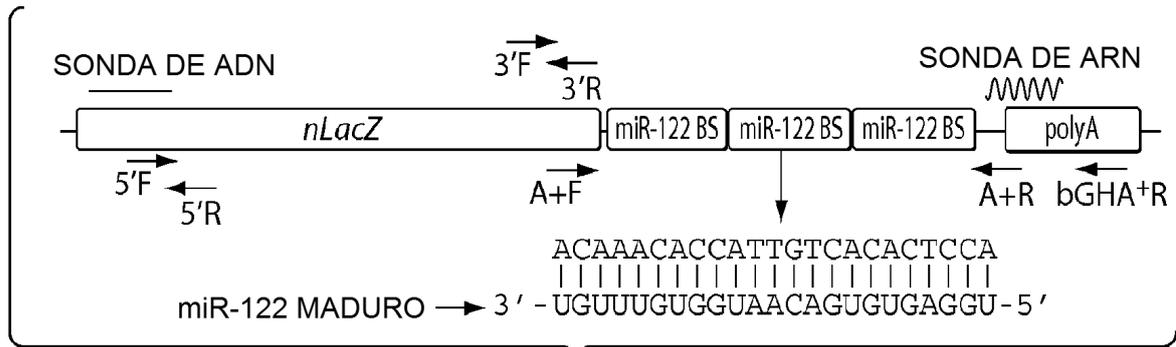


Fig. 15A

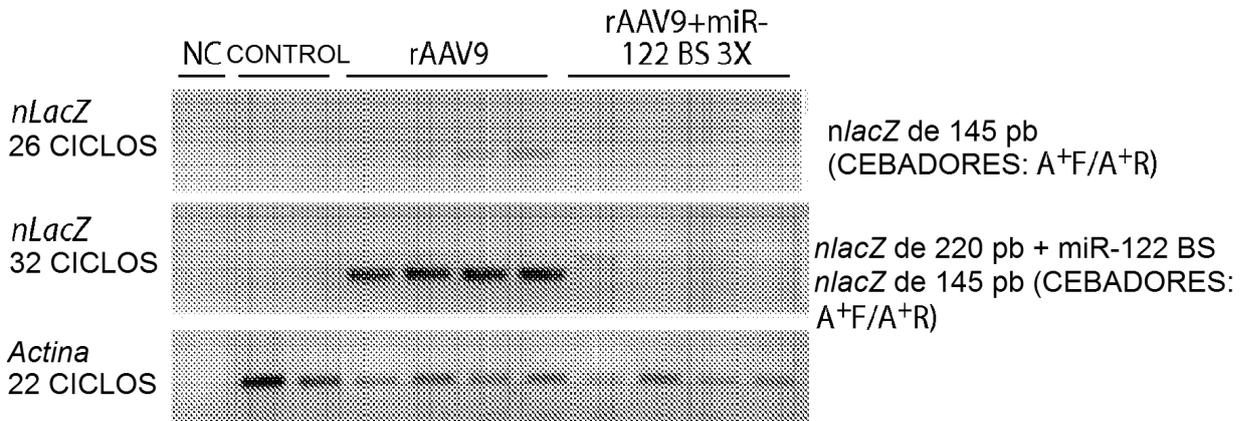


Fig. 15B

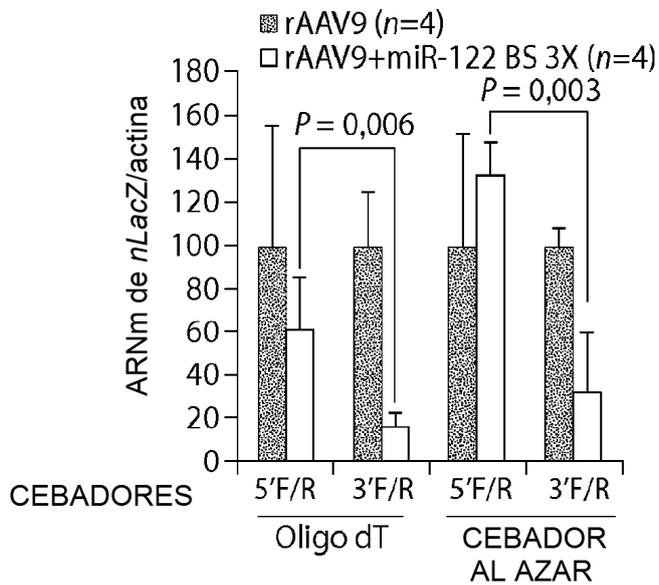


Fig. 15C

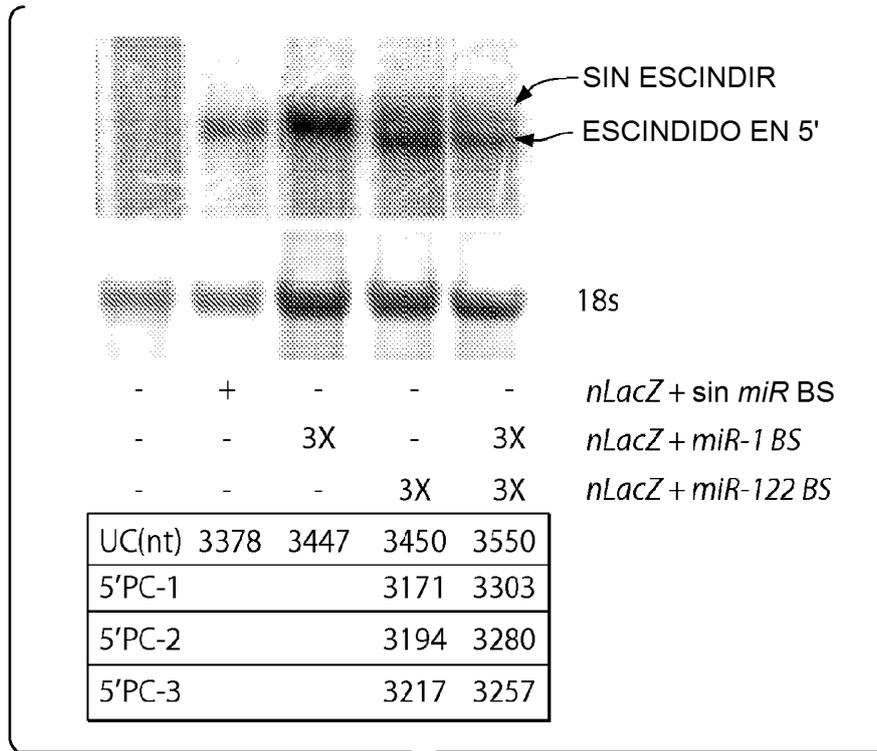


Fig. 15D

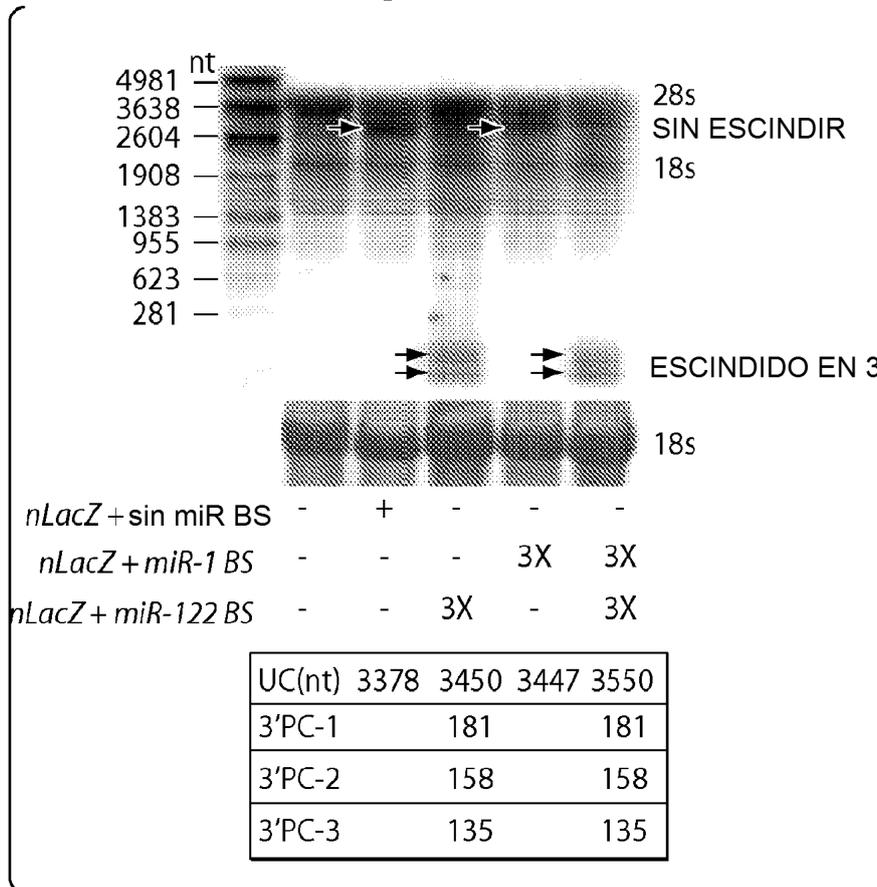


Fig. 15E

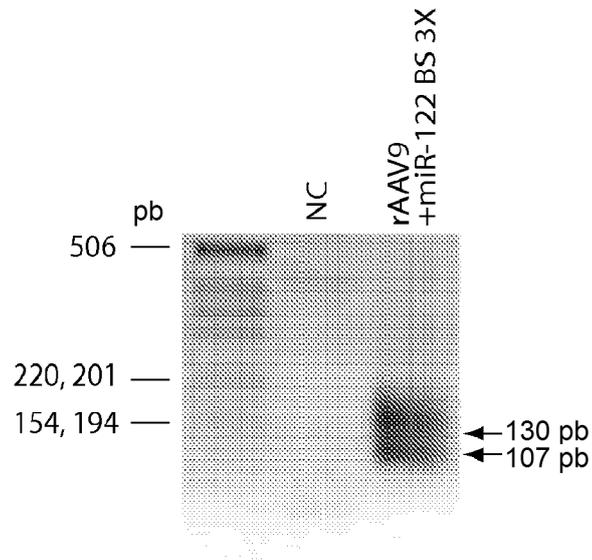


Fig. 15F

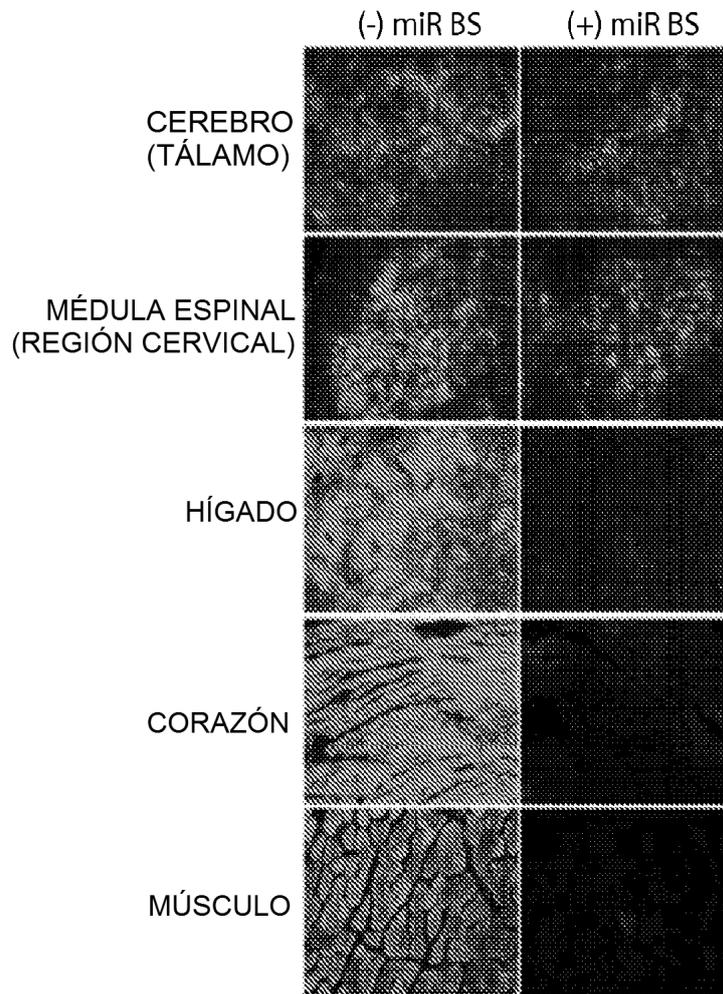


Fig. 17A

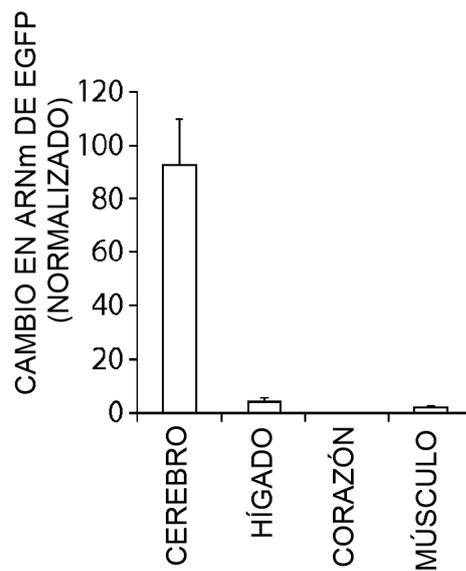


Fig. 17B

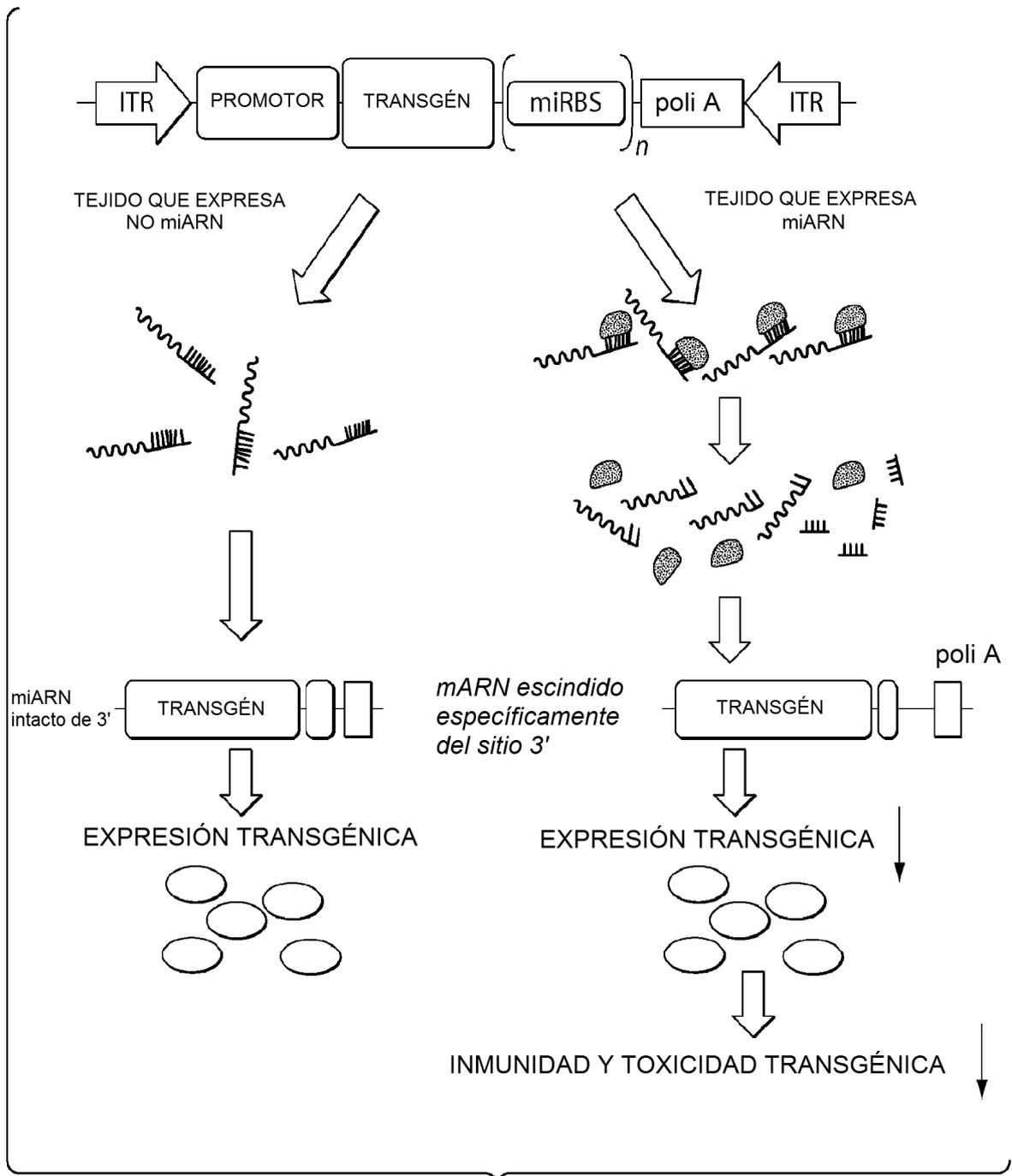


Fig. 18

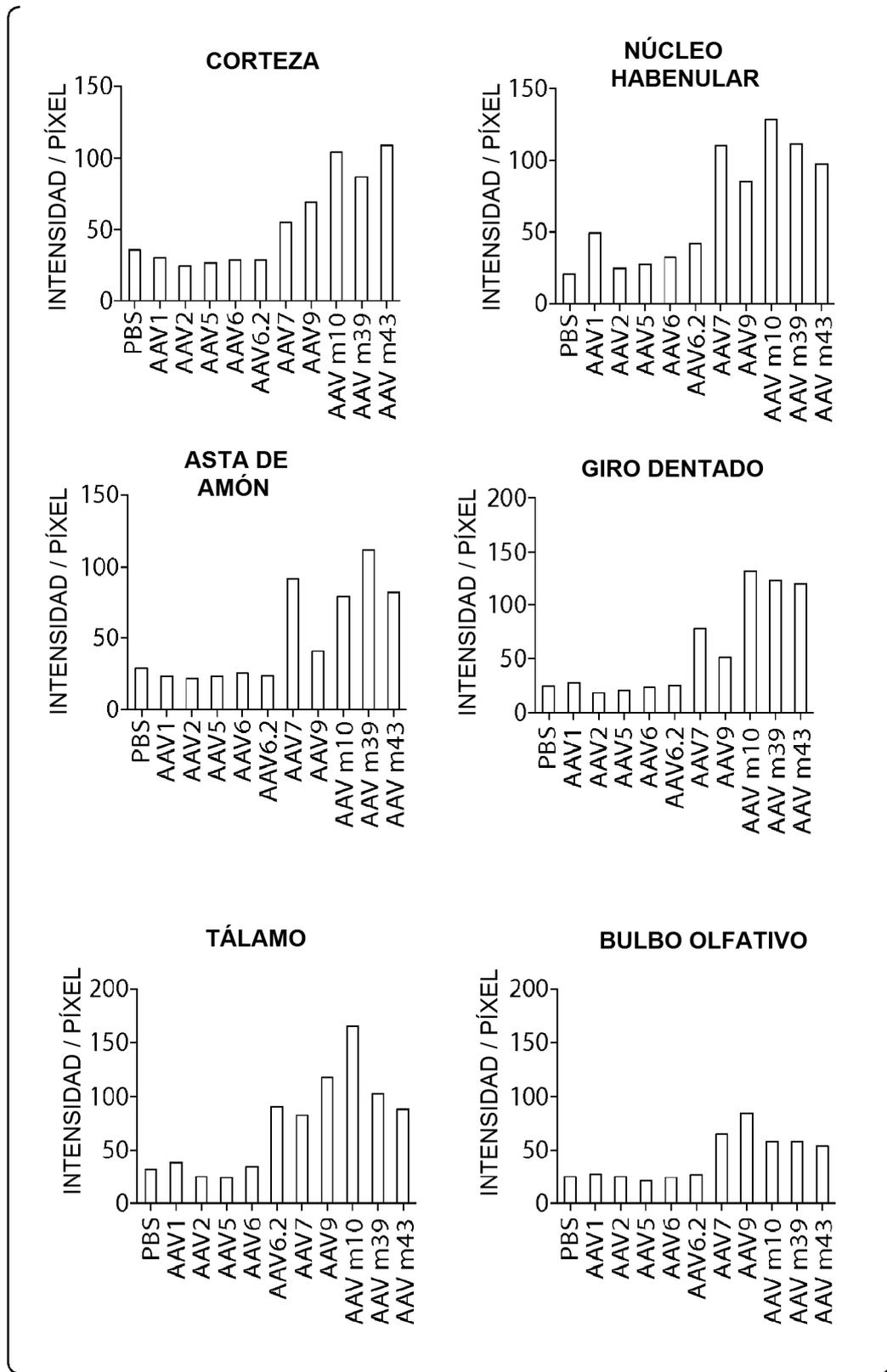


Fig. 19A-1

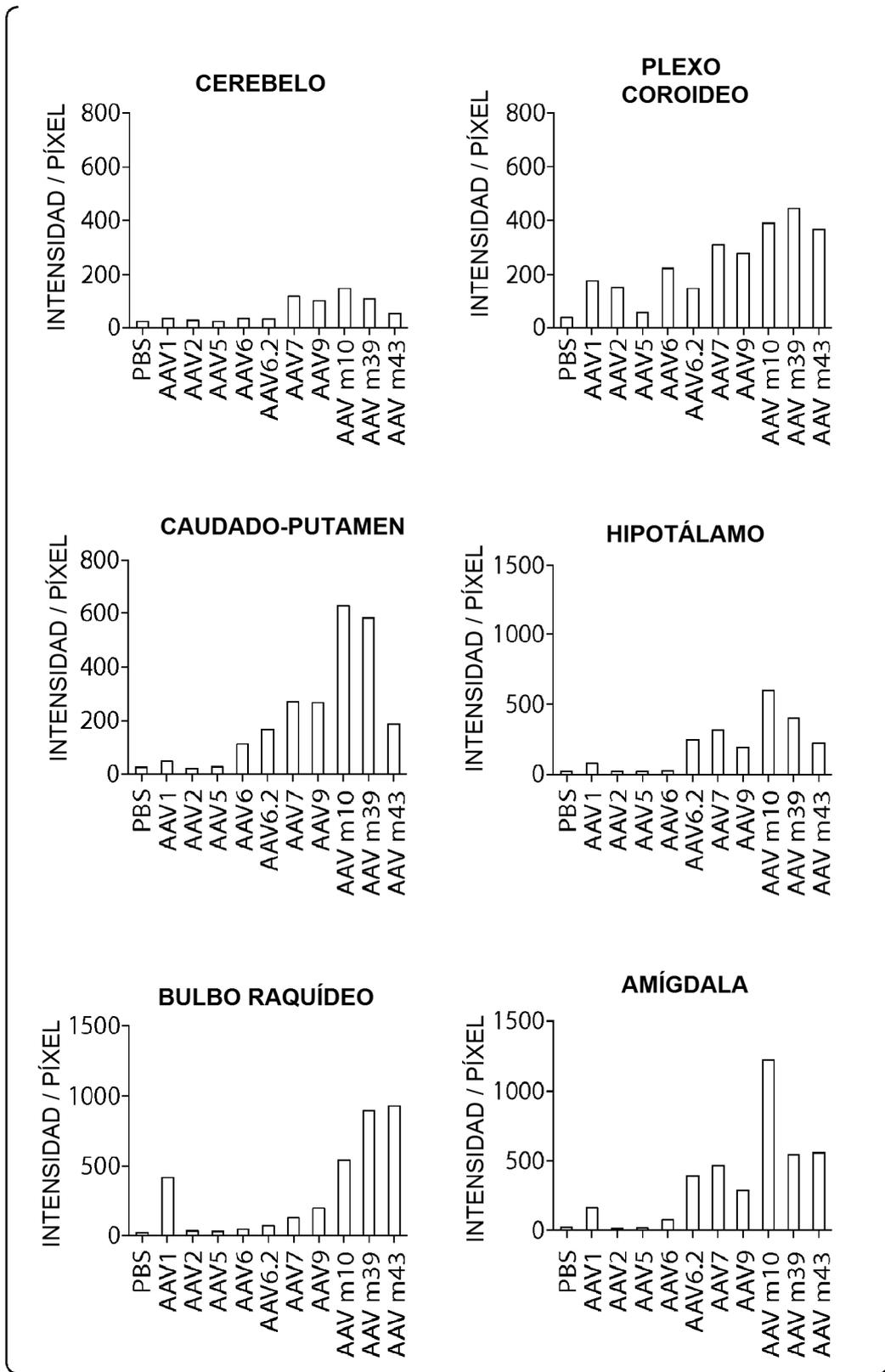


Fig. 19A-2

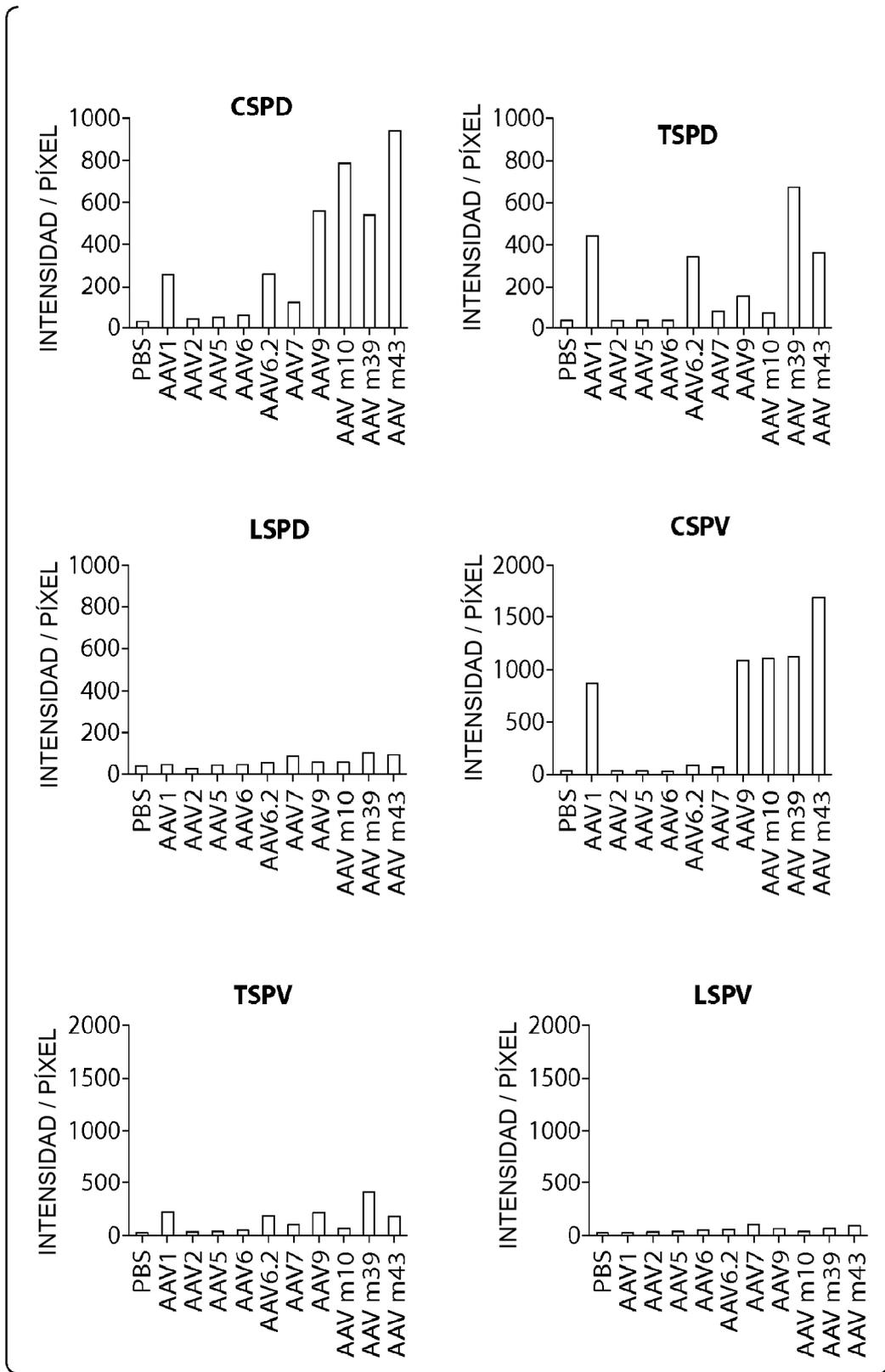


Fig. 19A-3

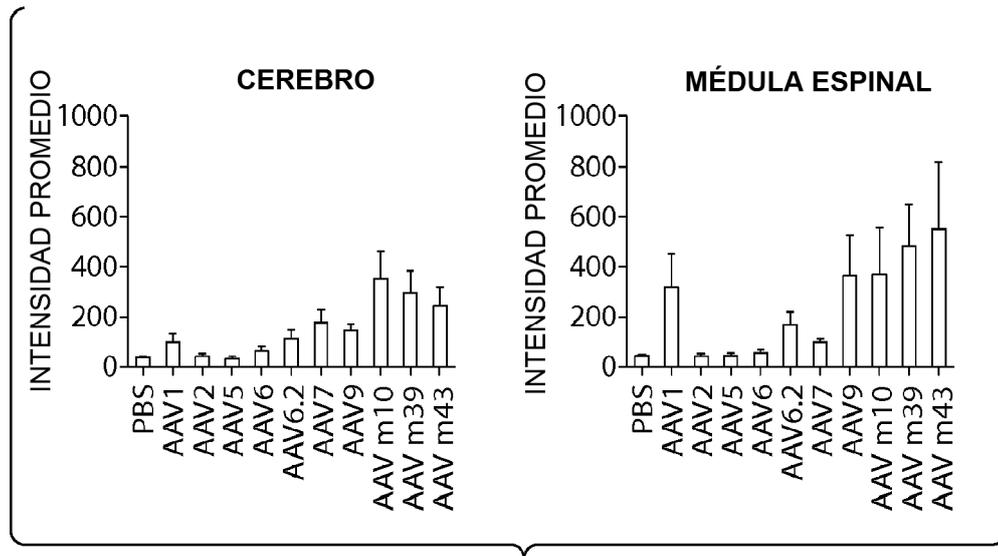


Fig. 19B

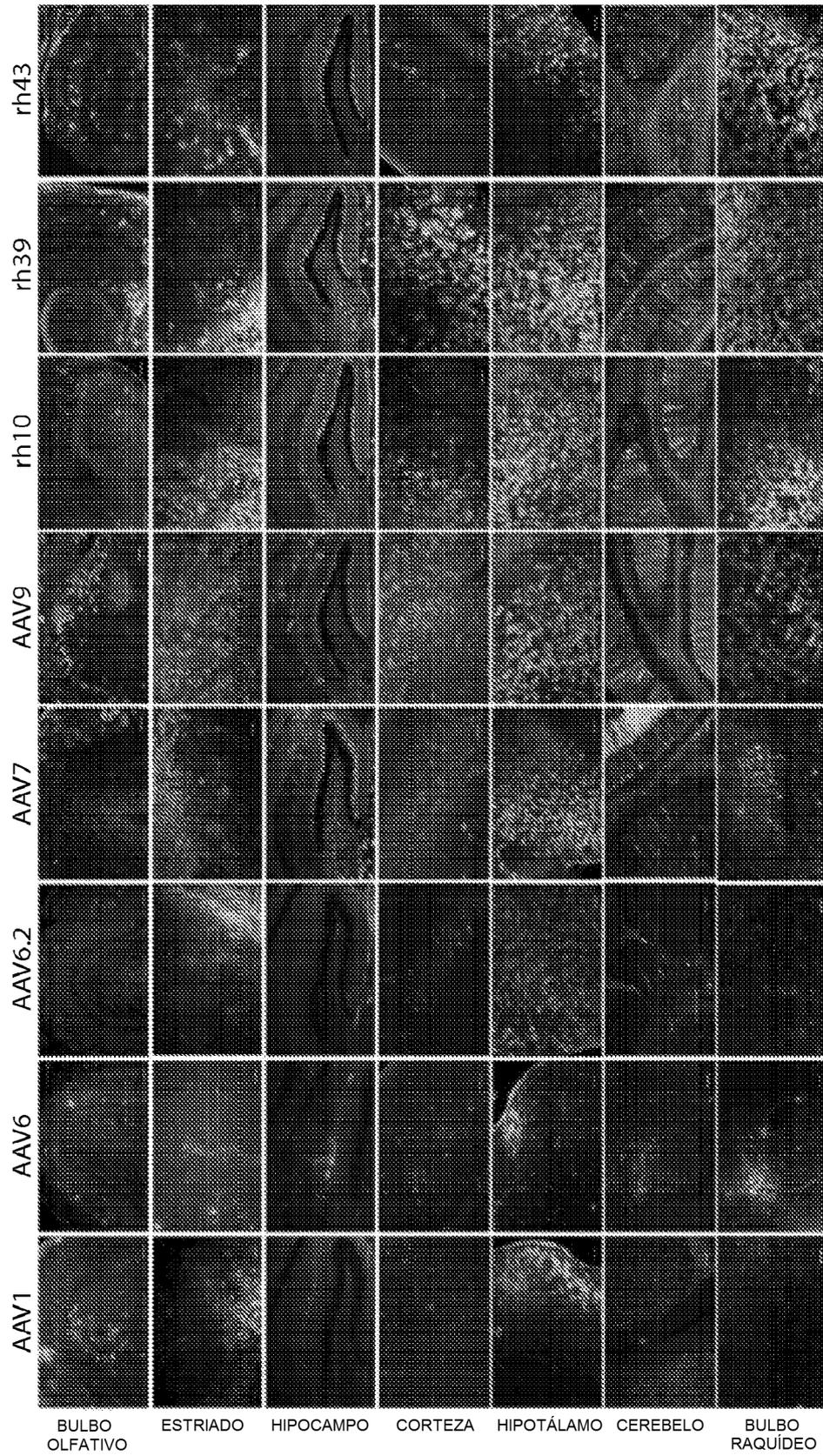


Fig. 20

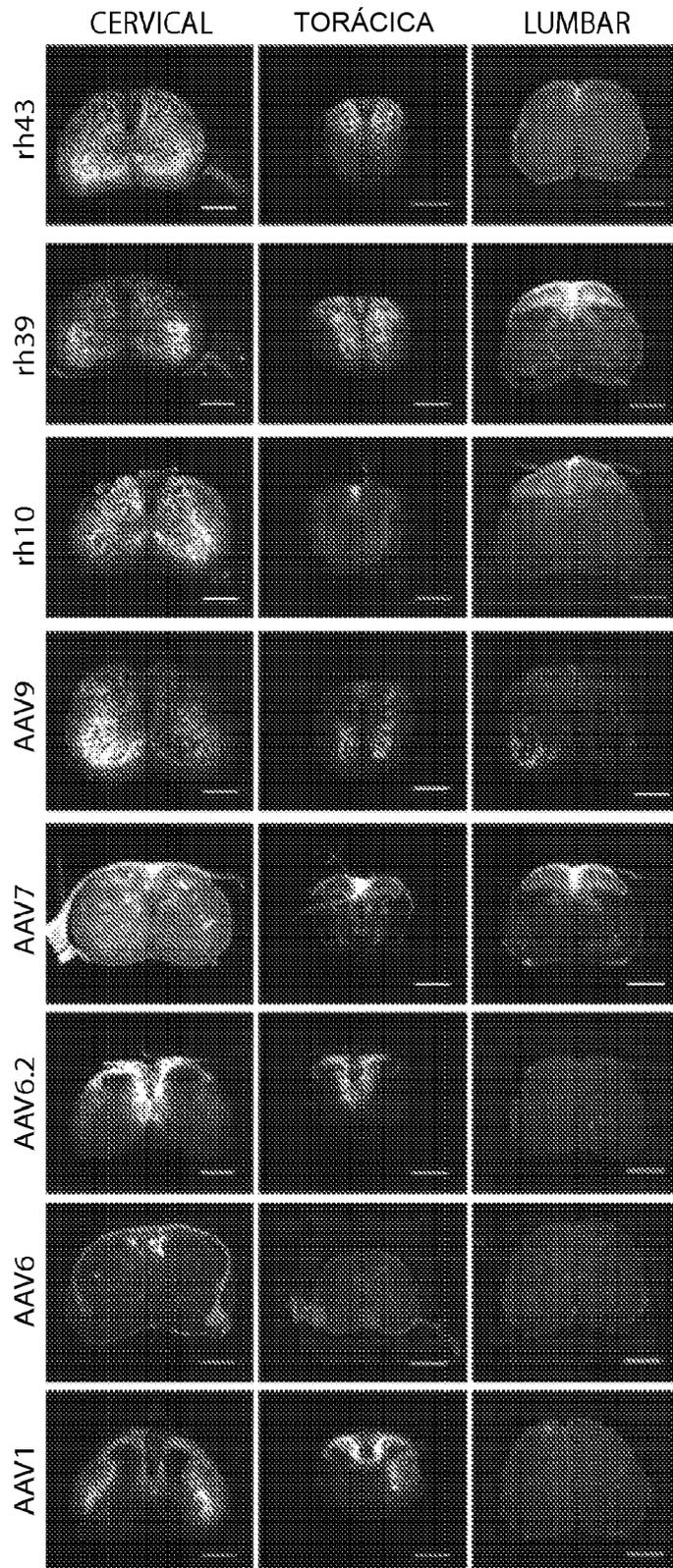


Fig. 21

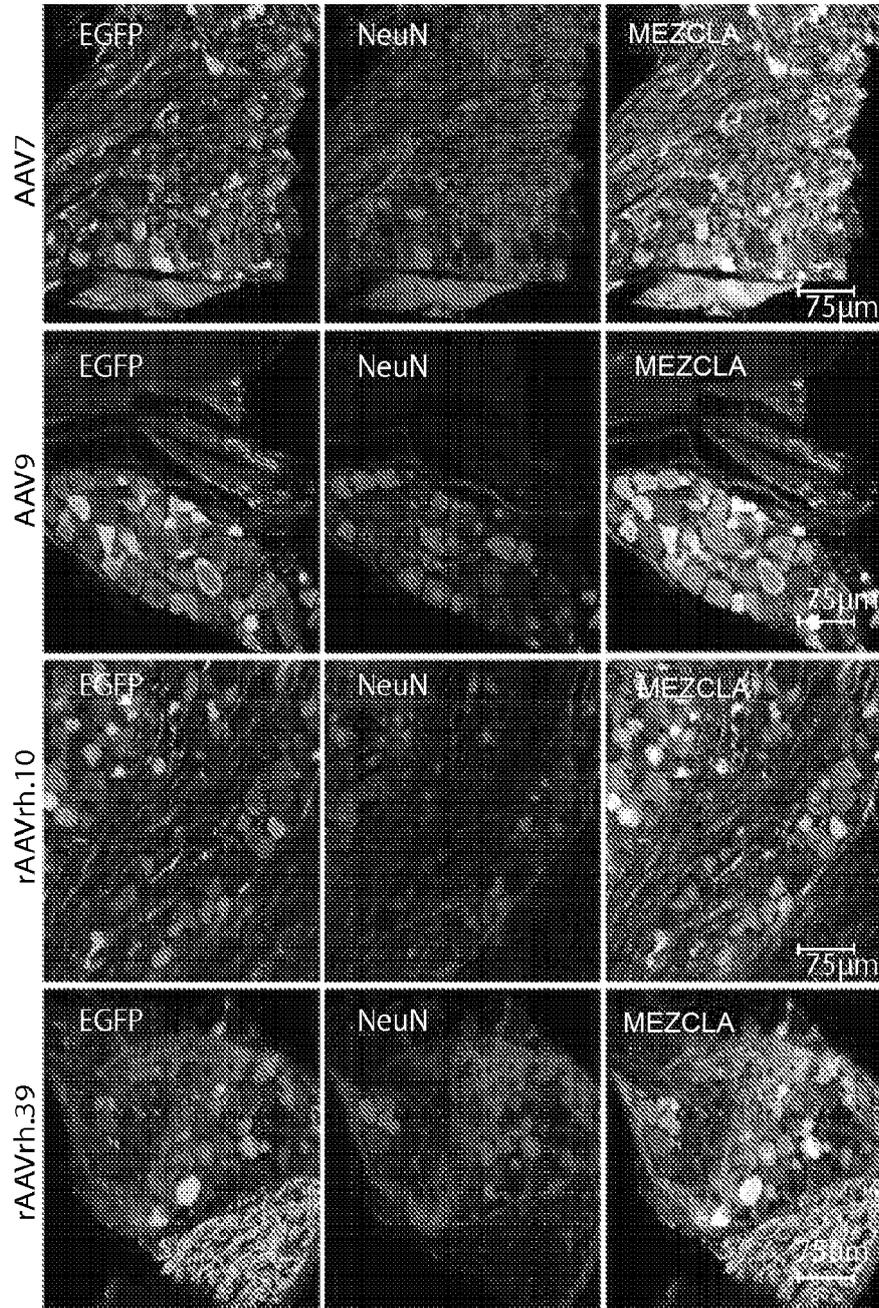


Fig. 22

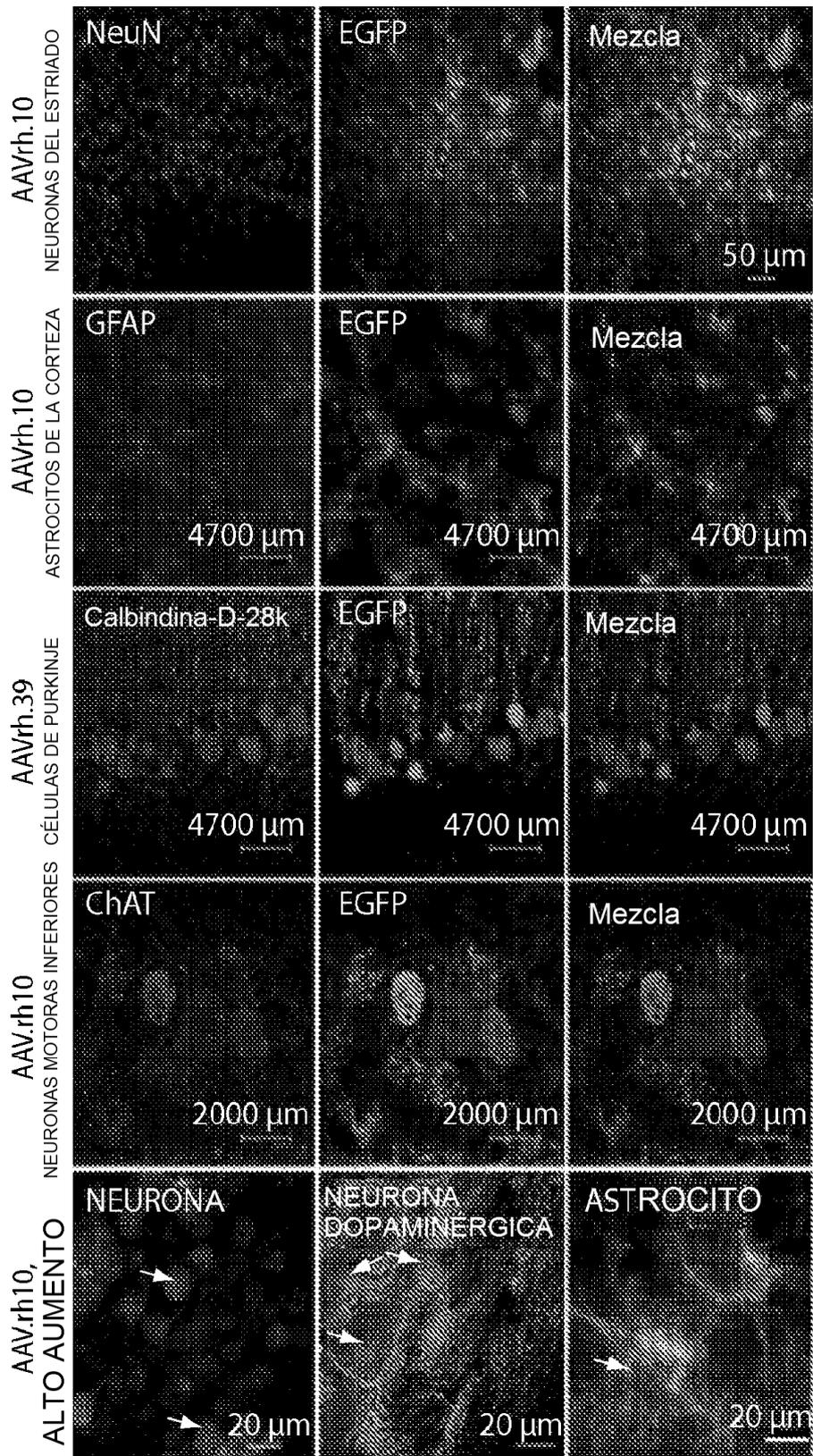


Fig. 23

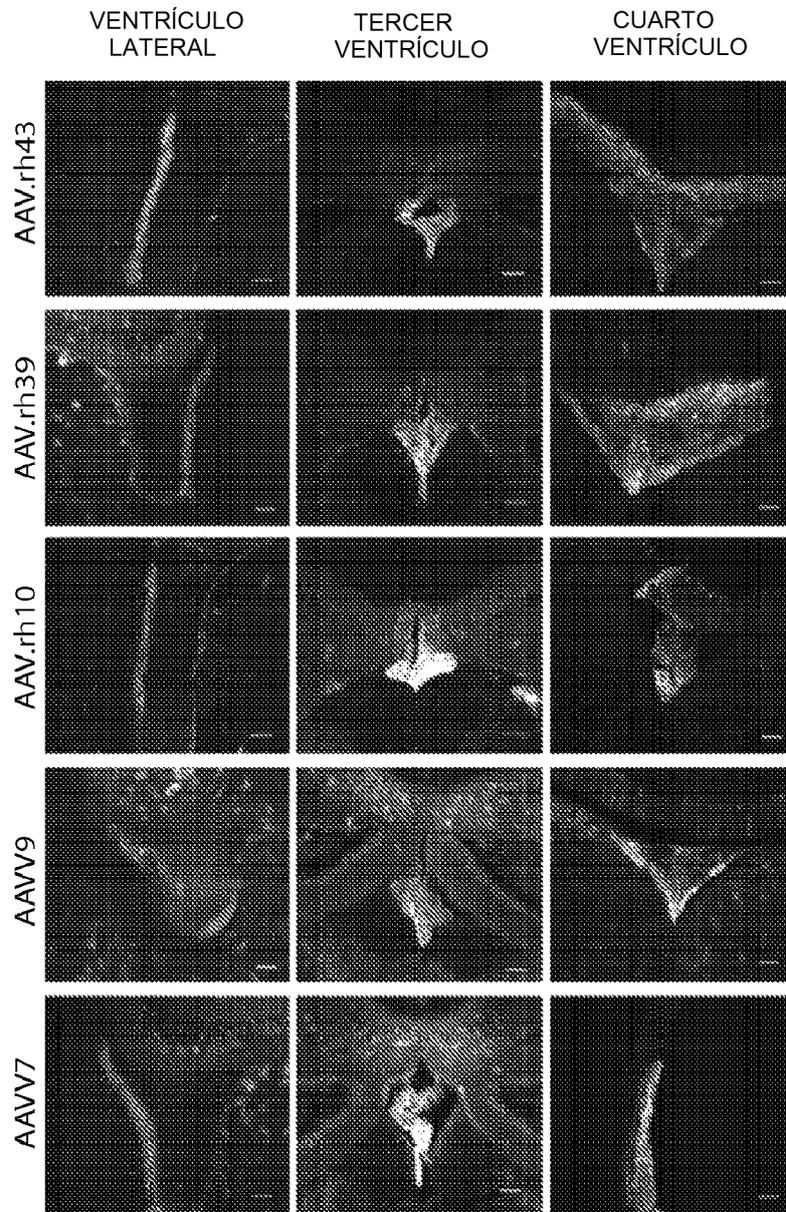


Fig. 24

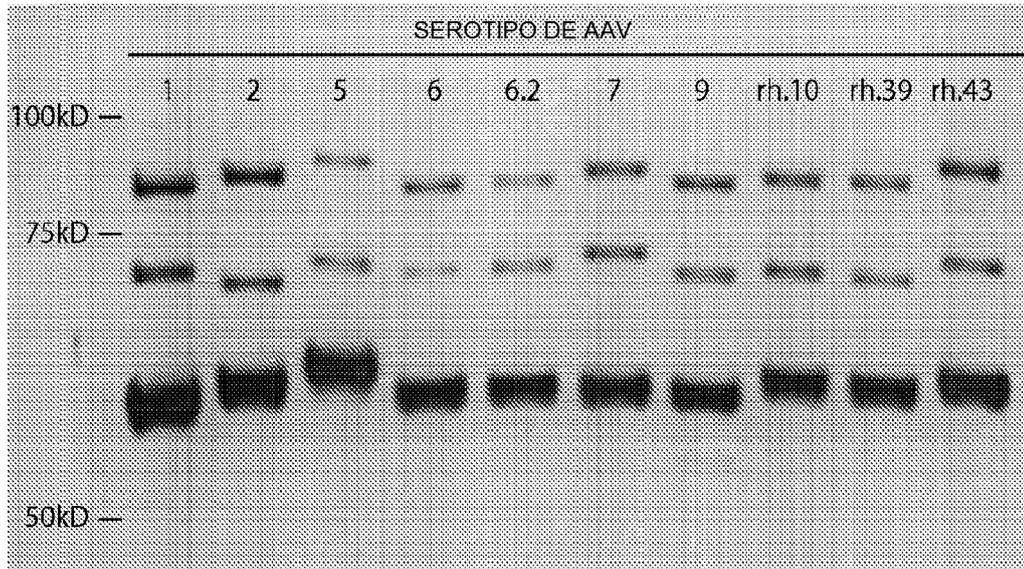


Fig. 25A

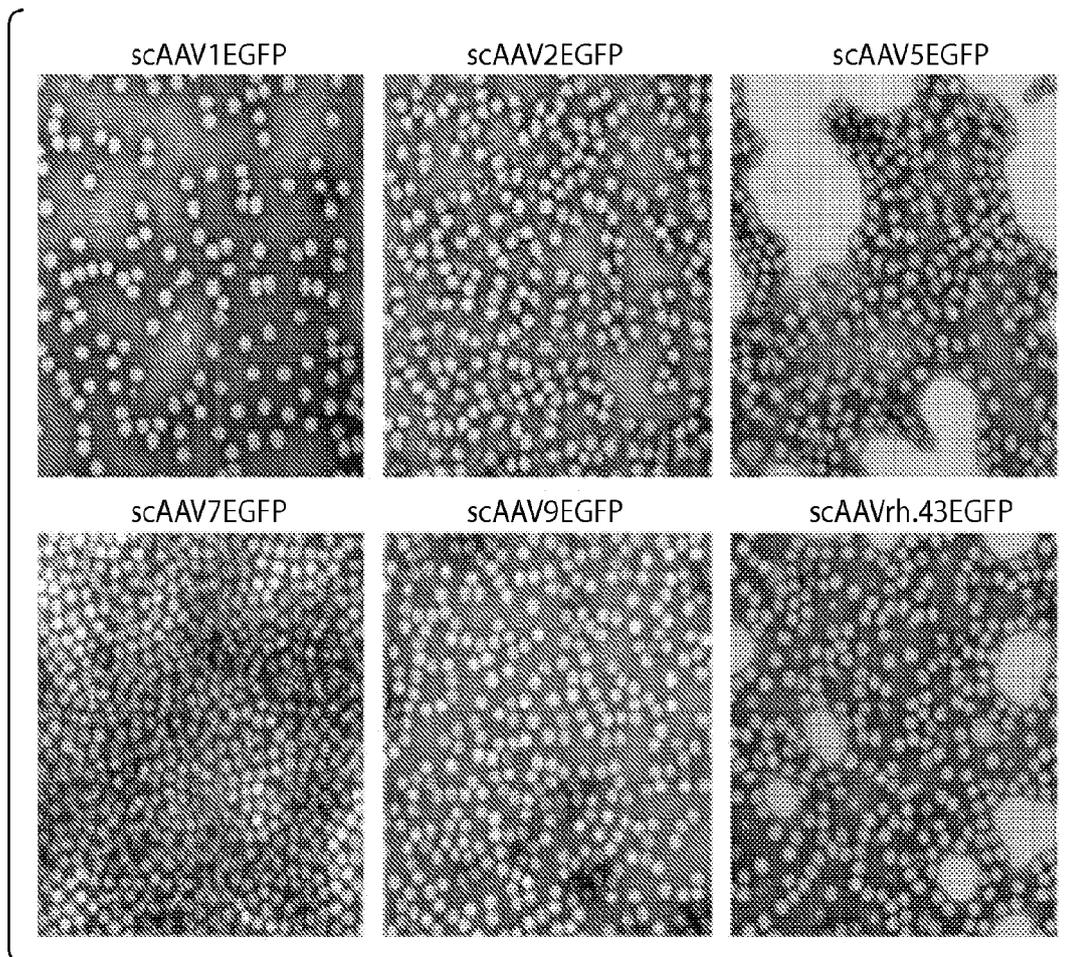


Fig. 25B

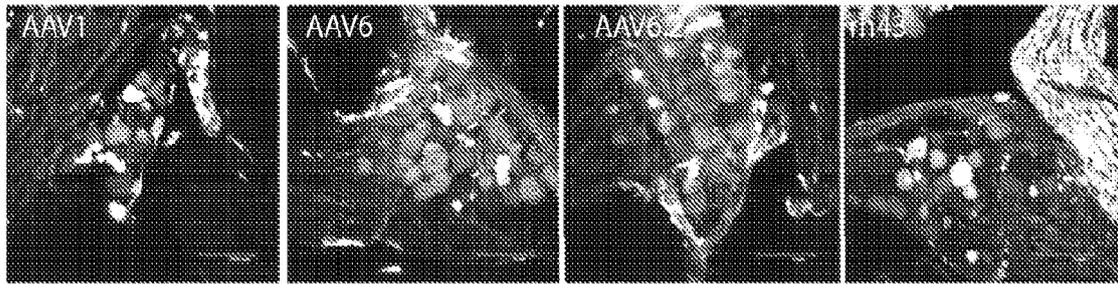


Fig. 26

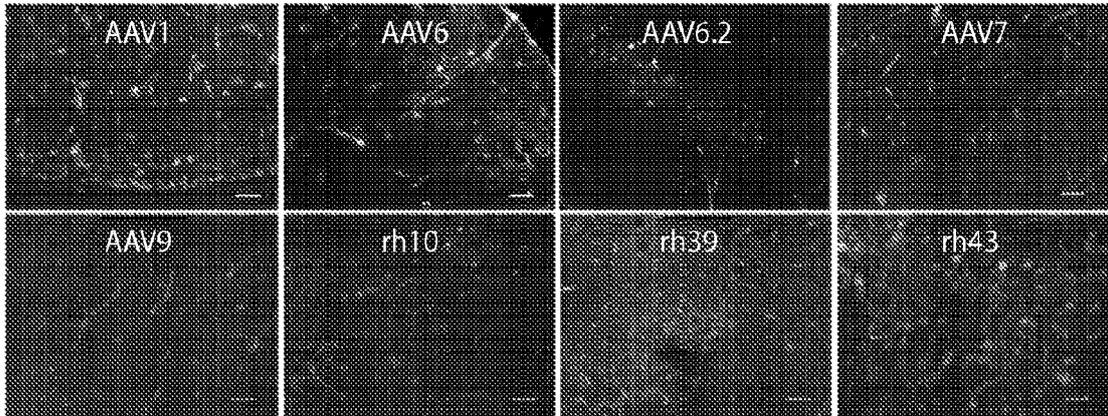


Fig. 27A

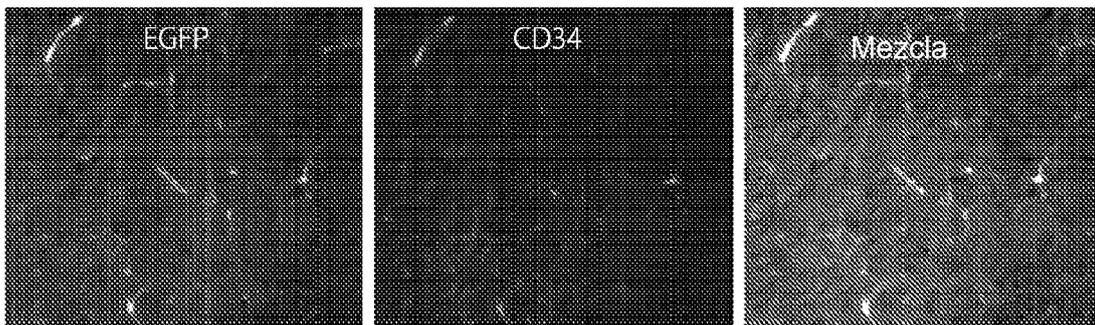


Fig. 27B



Fig. 28

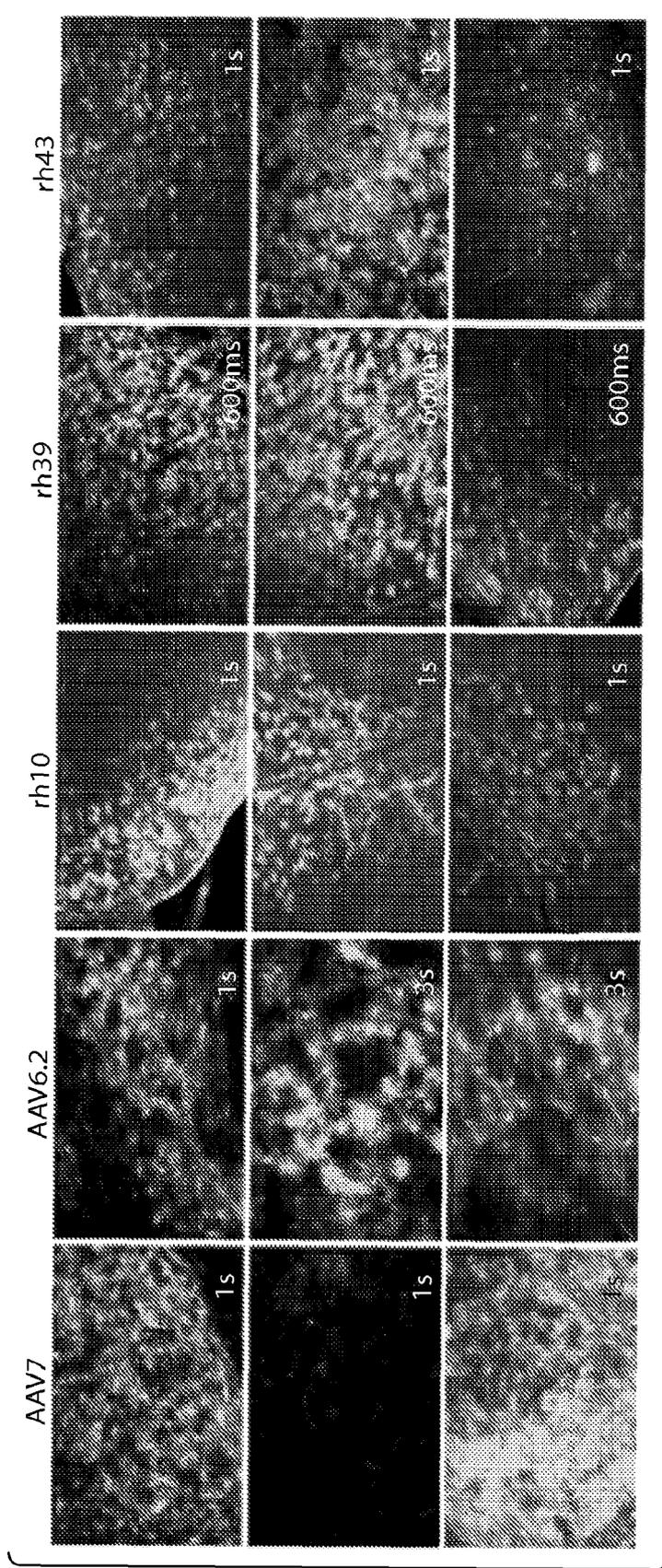


Fig. 29

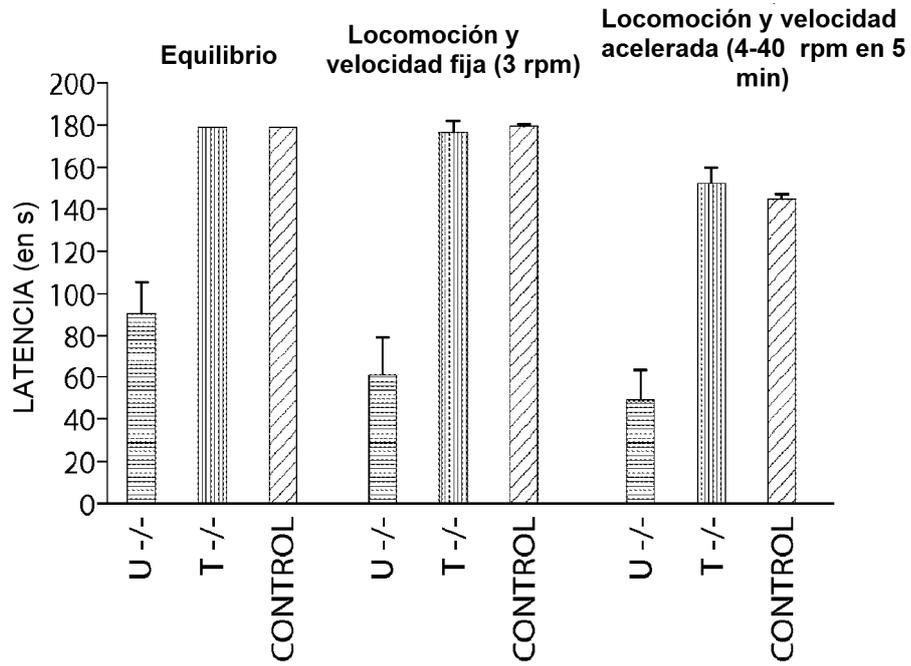


Fig. 30A

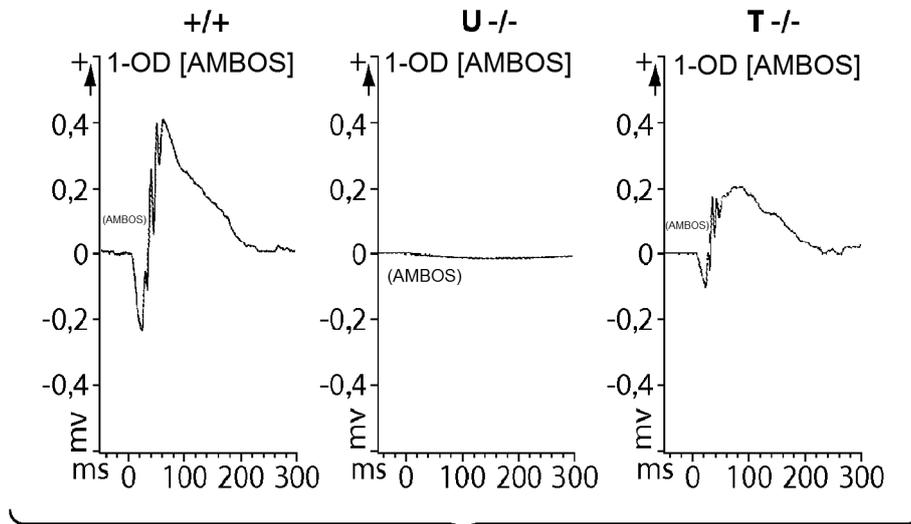


Fig. 30B

Eliminación de NAA en orina

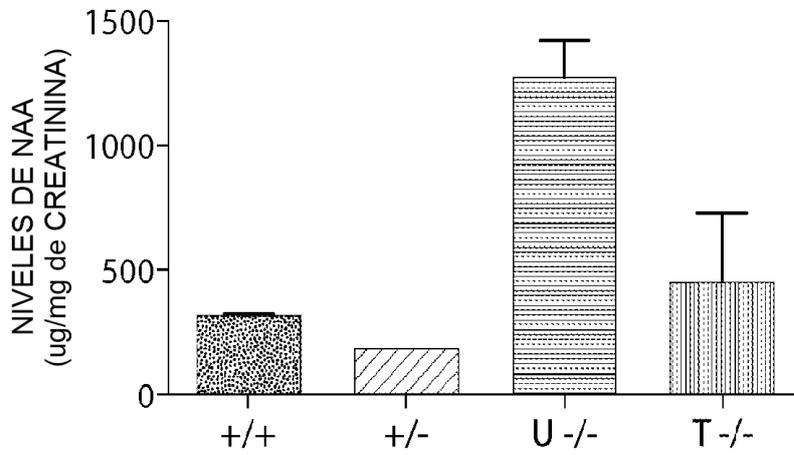


Fig. 30C

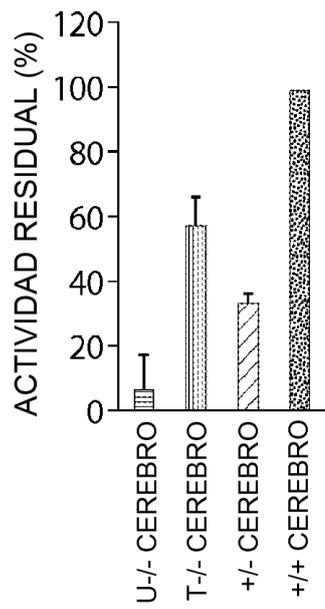


Fig. 30D

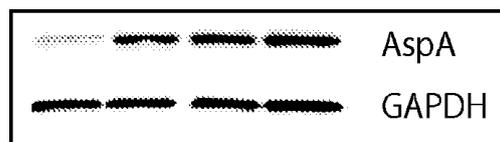


Fig. 30E

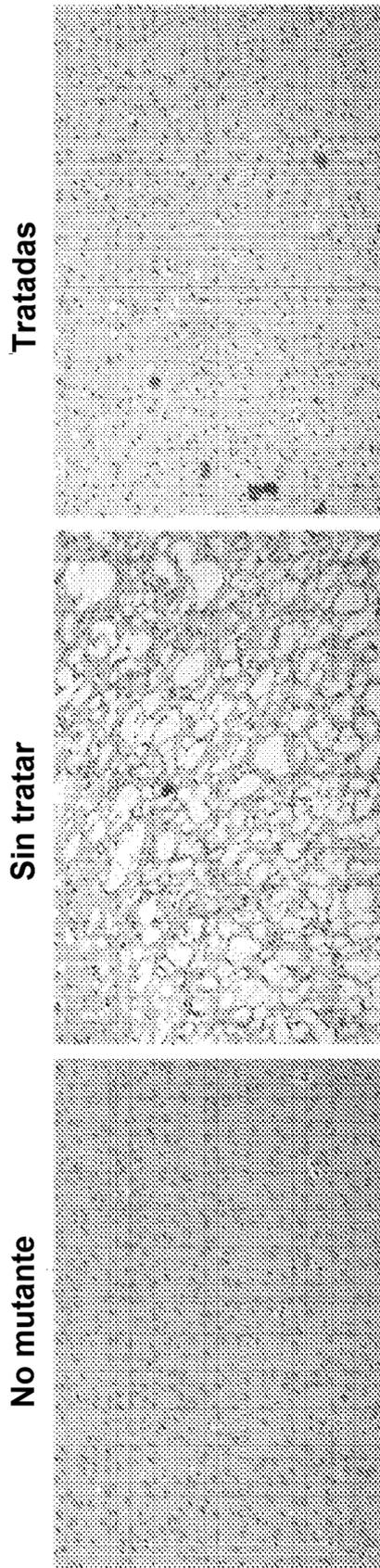


Fig. 31A

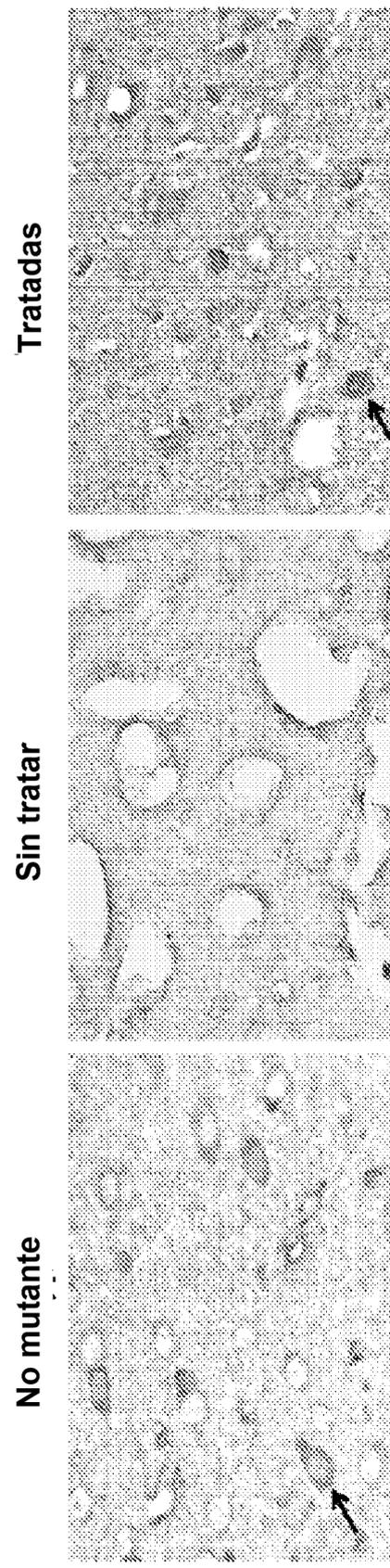


Fig. 31B

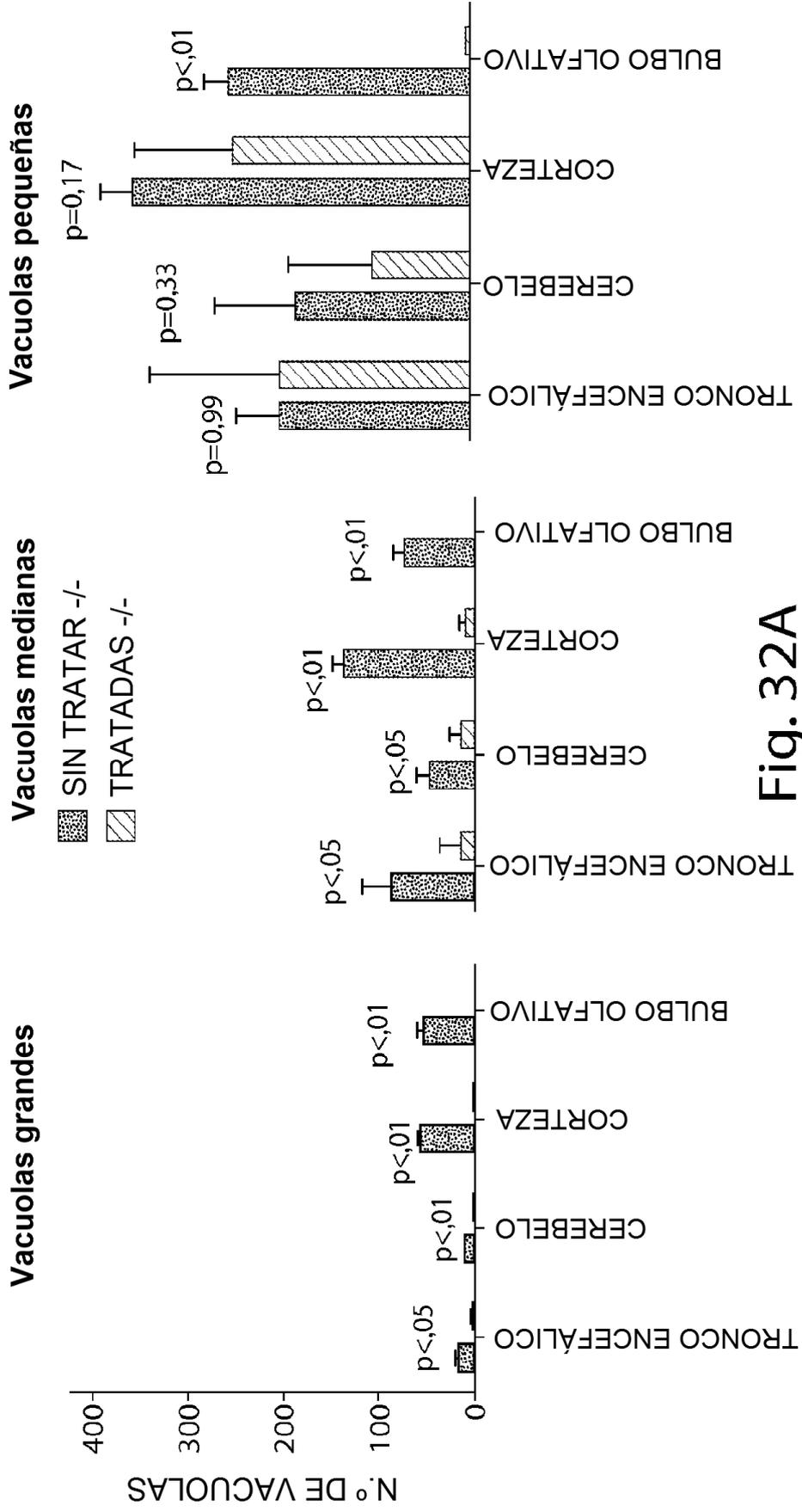


Fig. 32A



Fig. 32B

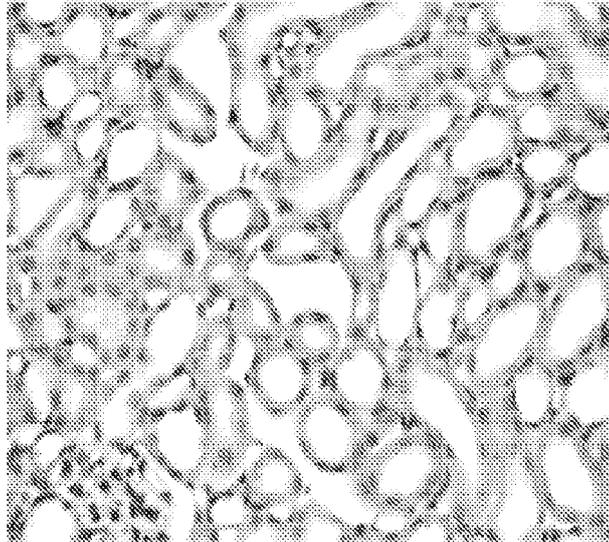


Fig. 33A

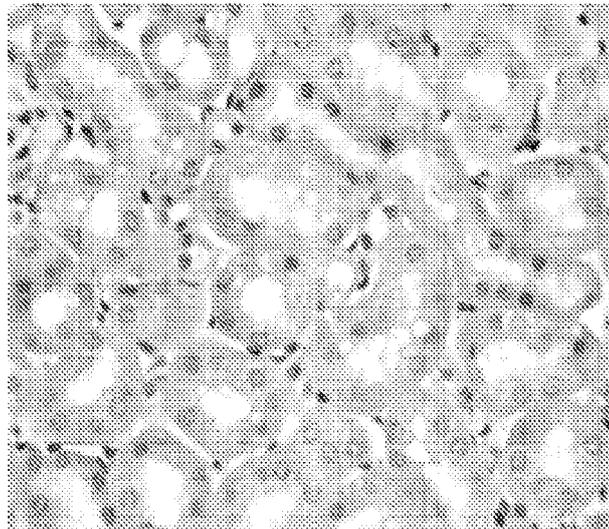


Fig. 33B

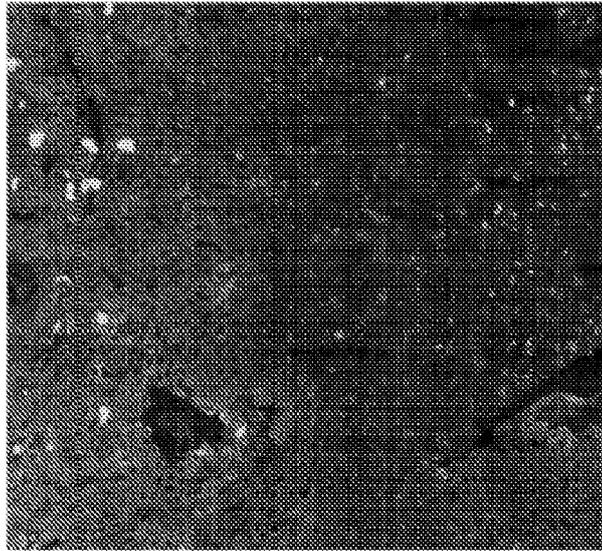


Fig. 33C

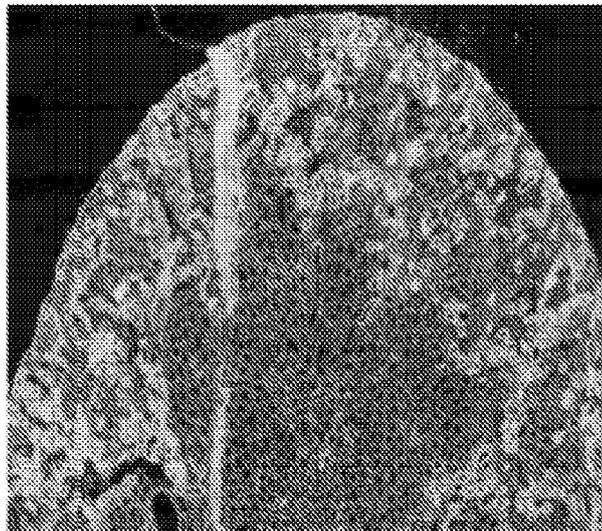


Fig. 33D