

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 695**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2011 PCT/US2011/020939**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11088081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2011 E 11733293 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2524037**

54 Título: **Repeticiones terminales invertidas restrictivas para vectores virales**

30 Prioridad:

12.01.2010 US 294181 P

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

27.09.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**HEWITT, CURTIS y
SAMULSKI, RICHARD JUDE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 683 695 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

Repeticiones terminales invertidas restrictivas para vectores virales

5 Declaración de apoyo federal

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno en virtud de GM0529299, HL066973, HL051818, AI072176 otorgados por los Institutos Nacionales de Salud y AI007419 otorgado por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 Campo de la invención

Esta invención se refiere a repeticiones terminales invertidas de parvovirus modificadas (ITR) que no interactúan funcionalmente con proteínas Rep grandes de tipo silvestre, proteínas Rep sintéticas que interactúan funcionalmente con las ITR modificadas, y métodos de uso de las mismas para la administración de ácidos nucleicos a una célula o un sujeto. Las modificaciones proporcionan una nueva interacción Rep-ITR que puede limitar la movilización del vector, aumentando la seguridad de los vectores virales.

20 Antecedentes de la invención

Los virus adenoasociados (AAV) son miembros de la familia *Parvoviridae* y de los géneros *Dependovirus*. Los serotipos 1 a 4 fueron identificados originalmente como contaminantes de preparaciones de adenovirus (Carter y Laughlin (1984) en, *The Parvoviruses* páginas 67-152 Nueva York, N.Y.) mientras que el tipo 5 se aisló de una verruga del paciente que era positiva para el VPH. Hasta la fecha, se han generado doce clones moleculares que representan los serotipos de AAV humano/primate (Bantel-Schaal et al. (1999) *J. Virol.* 73: 939; Chiorini et al. (1997) *J. Virol.* 71: 6823; Chiorini et al. (1999) *J. Virol.* 73: 1309; Gao et al. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 11854; Mori et al. (2004) *Virol.* 330: 375; Muramatsu et al. (1996) *Virol.* 221: 208; Ruffing et al. (1994) *J. Gen. Virol.* 75: 3385; Rutledge et al. (1998) *J. Virol.* 72: 309; Schmidt et al. (2008) *J. Virol.* 82: 8911; Srivastava et al. (1983) *J. Virol.* 45: 555; Xiao et al. (1999) *J. Virol.* 73: 3994). Estos clones han proporcionado reactivos valiosos para estudiar la biología molecular de la infección específica del serotipo. La transducción de estos virus da como resultado de manera natural infecciones latentes, con la finalización del ciclo de vida que generalmente requiere funciones adyuvantes no asociadas con los productos del gen viral AAV. Como resultado, todos estos serotipos se clasifican como no patógenos y se cree que comparten un perfil de seguridad similar al AAV tipo 2 más ampliamente estudiado. (Carter y Laughlin (1984) en, *The Parvoviruses* páginas 67-152 Nueva York, N.Y.).

La comprensión general de los mecanismos requeridos para la función en los orígenes de replicación ha crecido enormemente desde que se caracterizaron los primeros orígenes procariotas. Mientras que las interacciones ADN-proteína necesarias para la replicación en procariotas, eucariotas inferiores y bacteriófagos son generalmente bien entendidas, los mecanismos empleados en la mayoría de los eucariotas superiores y virus de vertebrados, tales como AAV, todavía están siendo determinados. Las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV et al. Parvovirus actúan como el origen de la replicación. Estos elementos flanquean el genoma corto, de cadena sencilla y poseen típicamente una estructura secundaria en forma de T. Las estrategias de replicación del género *Dependovirus*, incluidas las de AAV, han sido bien caracterizadas. Las proteínas virales no estructurales o de replicación (Rep) son los únicos factores necesarios para interactuar con la ITR con el fin de catalizar la replicación (Im y Muzyczka (1990) *Cell* 61: 447). La mayoría de los serotipos de AAV poseen orígenes de replicación altamente conservados con interacciones intercambiables ADN-proteína. Sin embargo, las proteínas Rep de varios serotipos interactúan exclusivamente con su ITR afín. El descubrimiento de los mecanismos que impulsan la especificidad de Rep-ITR promete ayudar en nuestra comprensión de las interacciones ADN-proteína en los orígenes virales de replicación. Estos hallazgos también prometen arrojar luz sobre cómo las proteínas eucarióticas y procariotas logran selectividad para los sustratos de ADN.

El gen *rep* del AAV codifica cuatro proteínas multifuncionales (Hermonat et al. (1984) *J. Virol.* 51: 329; Tratschin et al. (1984) *J. Virol.* 51: 611; Mendelson et al. (1986) *J. Virol.* 60: 823; Trempe et al. (1987) *Virol.* 161: 18) que se expresan a partir de dos promotores en las unidades de mapa 5 (p5) y 19 (p19). Las proteínas Rep más grandes transcritas del promotor p5 (Rep78 y Rep68) son esencialmente idénticas, excepto por los terminales carboxilo únicos generados a partir de transcritos no empalmados (Rep78) y empalmados (Rep68), respectivamente (Srivastava et al., (1983) *J. Virol.* 45: 555). Las dos proteínas Rep más pequeñas, Rep52 y Rep40, se transcriben a partir del promotor p19 y representan truncamientos amino terminales de Rep78 y Rep68, respectivamente.

Se han caracterizado diversas actividades bioquímicas de Rep78 y Rep68 como implicadas en la replicación del AAV. Estos incluyen unión específica a la ITR del AAV (Ashktorab et al. (1989) *J. Virol.* 63: 3034; Im et al. (1989) *J. Virol.* 63: 3095; Snyder et al. (1993) *J. Virol.* 67: 6096) y escisión de endonucleasa específica del sitio en el sitio de resolución terminal (*trs*) (Im et al. (1990) *J. Virol.* 63: 447; Im et al. (1992) *J. Virol.* 66: 1119; Snyder et al., (1990) *Cell* 60: 105; Snyder et al. (1990) *J. Virol.* 64: 6204). Rep78/68 también posee ADN-ADN helicasa dependiente de ATP (Im et al., (1990) *J. Virol.* 63: 447; Im et al. (1992) *J. Virol.* 66: 1119) y ADN-ARN helicasa así como actividades de ATPasa (Wonderling et al. (1995) *J. Virol.* 69: 3542). Además de estas actividades implicadas en la replicación,

Rep78/68 también regula la transcripción de los promotores virales (Beaton et al. (1989) J. Virol. 63: 4450; Labow et al. (1986) J. Virol. 60: 251; Tratschin et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 2884; Kyostio et al. (1994) J. Virol. 68: 2947; Pereira et al. (1997) J. Virol. 71: 1079), y ha demostrado que media en la integración dirigida viral (Xiao, W., (1996), "Characterization of cis and trans elements essential for the targeted integration of Recombinant adeno-associated virus plasmid vectors", tesis de doctorado, Universidad de Carolina del Norte- Chapel Hill; Balague et al. (1997) J. Virol. 71: 3299; La Martina et al. (1998) J. Virol. 72: 7653; Pieroni et al. (1998) Virol. 249: 249).

Al igual que las proteínas Rep, las ITR del AAV están implicadas en casi todos los aspectos del ciclo de vida viral. La estructura secundaria de la ITR es necesaria para cebar la síntesis de la segunda cadena para permitir la transcripción de los genes virales (Hauswirth y Berns (1977) J. Virol. 78: 488). Las proteínas Rep de longitud completa contienen una región de unión a ADN N-terminal única que reconoce específicamente la ITR en el elemento de unión a Rep de 16 nt (RBE) y en la punta de uno de los tallos de la horquilla conocidos como RBE' (Figura 1A). (Ryan et al. (1996) J. Virol. 70: 1542; Brister y Muzyczka (2000) J. Virol. 74: 7762). Las moléculas Rep se multimerizan en la ITR permitiendo que el C-terminal de Rep, actuando como una helicasa SF3 dependiente de ATP, desenrolle la ITR y forme una horquilla interna putativa (Im y Muzyczka (1990) Cell 61: 447; Hermonat y Batchu (1997) FEBS Lett. 20: 180). Esta horquilla, (en este documento, denominada "tallo de corte") contiene el sitio de resolución terminal (trs) donde Rep corta la ITR de una manera específica del sitio (Brister y Muzyczka (1999) J. Virol. 73: 9325). Esta escisión de ADN es importante para la replicación de la ITR cerrada y para iniciar rondas posteriores de replicación genómica. Los genomas replicados pueden experimentar replicación nuevamente o pueden encapsularse en presencia de las proteínas Rep más pequeñas (King et al., (2001) EMBO J. 20: 3282).

Se han publicado las secuencias de ITR de doce serotipos de AAV humano/primate. Estas secuencias muestran típicamente un 80% o más de conservación de nucleótidos y se segregan en dos grupos (Hewitt et al. (2009) J. Virol. 83: 3919). Las proteínas Rep de AAV2 (Rep2) son capaces de funcionar en la ITR de todos los serotipos de AAV conocidos, excepto los de AAV5 (ITR5; Hewitt et al. (2009) J. Virol. 83: 3919; Grimm et al. (2006) J. Virol. 80: 426). Consistentemente, las proteínas Rep de AAV5 (Rep5) no pueden catalizar la replicación de la ITR de AAV2 (ITR2).

La especificidad replicativa entre estos serotipos no existe al nivel de la unión, ya que Rep2 y Rep5 se pueden unir indistintamente a ITR2 o ITR5 (Chiorini et al. (1999) J. Virol. 73: 4293). En cambio, la especificidad se crea por la incapacidad de Rep para escindir la ITR del serotipo opuesto. Esto ocurre a pesar de la alta conservación entre la secuencia de ITR2 y de ITR5, la estructura secundaria y la ubicación de los elementos necesarios para la interacción de Rep (RBE, RBE', trs, tallo de corte). El documento US20040197895 enseña un polinucleótido que comprende al menos una repetición terminal invertida (ITR) de parvovirus, donde dicha ITR comprende: (a) un primer elemento estructural (sitio de corte) que interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande (Rep68 y/o Rep78 de un primer adenovirus asociado (AAV2) pero no interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande de un segundo AAV y (b) un segundo elemento estructural (sitio de unión) que interactúa funcionalmente con la proteína Rep grande (Rep78 /68 de MV78 modificado) del segundo AAV (AAV5) pero no interactúa funcionalmente con la proteína Rep grande del primer AAV, en donde la ITR interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande del AAV sintético (Rep78/68 de AAV5 modificado). El documento US20040197895 también enseña una proteína Rep grande sintética (Rep78/68 de AAV5 modificado) que comprende una primera porción (sitio de corte) que funcionalmente interactúa con un primer elemento estructural (sitio de corte) de una ITR de parvovirus (ITR parvoviral) y una segunda parte (sitio de unión) que interactúa funcionalmente con un segundo elemento estructural (sitio de unión) de una ITR de parvovirus (ITR parvoviral).

Todos los vectores de AAV actuales en ensayos clínicos utilizan ITR2. Sin embargo, el uso de ITR2 con fines terapéuticos crea un riesgo de seguridad debido a la ubicuidad de AAV2 en la población humana, así como a otros AAV cuyas proteínas Rep pueden replicar ITR2. De esta manera, los vectores rAAV tienen el potencial de ser "movilizados" fuera del tejido objetivo en diferentes tejidos del cuerpo o en otros individuos en la población (Hewitt et al. (2009) J. Virol. 83: 3919).

La presente invención proporciona una solución para la movilización de vectores mediante la creación de una nueva interacción Rep-ITR. Un vector que utiliza esta nueva interacción no puede ser movilizado por uno o más de los serotipos de AAV de tipo silvestre que infectan a humanos, ni los serotipos no humanos que pueden potencialmente infectar huéspedes humanos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de mecanismos únicos a nivel de ADN y proteína para lograr la especificidad de Rep-ITR y utiliza estos factores para crear nuevos orígenes de replicación de AAV. De este modo, un aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido que comprende al menos una repetición terminal invertida (ITR) de parvovirus, en el que dicha ITR comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 21. La ITR interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande sintética de AAV sintética. La invención se refiere además a un vector viral y a una partícula de parvovirus recombinante que comprende el polinucleótido de la invención. Se proporcionan adicionalmente formulaciones farmacéuticas que comprenden una partícula de virus de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere a una proteína Rep grande sintética que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79. La invención se refiere además a polinucleótidos que codifican la proteína Rep grande sintética y vectores y células que comprenden el polinucleótido.

5 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir una partícula de parvovirus recombinante, que comprende proporcionar a una célula permisiva para la replicación de parvovirus: (a) una plantilla de parvovirus recombinante que comprende (i) una secuencia de nucleótidos heteróloga, y (ii) la secuencia de repetición terminal de parvovirus de la invención; (b) un polinucleótido que codifica una proteína Rep de la invención; en condiciones
10 suficientes para la replicación y el empaquetamiento de la plantilla de parvovirus recombinante; mediante el cual se producen partículas de parvovirus recombinantes en la célula.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para suministrar un ácido nucleico a una célula, que comprende introducir en una célula la partícula de parvovirus recombinante de la invención.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a una partícula de parvovirus recombinante de la invención para uso en un método de tratamiento de un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método administrar al sujeto mamífero una célula que se ha puesto en contacto con la partícula de parvovirus recombinante en condiciones suficientes para que el genoma del vector de partícula de parvovirus entre en la célula o administre al sujeto mamífero la partícula de parvovirus recombinante.
20

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el vector viral, la partícula de parvovirus recombinante, el vector o la célula de la invención.

25 Además, la presente invención también contempla que, en algunas realizaciones de la invención, cualquier característica o combinación de características expuesta en la presente invención puede excluirse u omitirse.

Para ilustrar adicionalmente, si, por ejemplo, la memoria descriptiva indica que un aminoácido particular puede seleccionarse de A, G, I, L y/o V, esta expresión también indica que el aminoácido puede seleccionarse de cualquier subconjunto de este o estos aminoácidos, por ejemplo, A, G, I o L; A, G, I o V; A o G; solo L, etc. como si cada una de tales subcombinación se estableciera expresamente aquí. Además, dicha expresión también indica que uno o más de los aminoácidos especificados pueden ser rechazados. Por ejemplo, en realizaciones particulares, el aminoácido no es A, G o I; no es A; no es G o V; etc. como si cada uno de esos posibles rechazos se expusiera expresamente en la presente memoria.
30

35 Estos y otros aspectos de la invención se exponen con más detalle en la descripción de la invención a continuación.

Breve descripción de los dibujos

40 Las Figuras 1A-1B muestran la clonación y caracterización de ITR quiméricas. (A) Secuencia y estructura de ITR2 (SEQ ID NO: 17) (negro) e ITR5 (SEQ ID NO: 18) (azul) mostradas con incorporación de sitios *SfiI* para clonación (verde). Longitud en nt de los elementos ITR indicados encima de los corchetes. RBE está en una caja. RBE' está indicado por un círculo sombreado. El tallo de corte se extruye con una flecha que indica el sitio de corte y la caja rayada que indica el trs. Se muestran las cuatro ITR quiméricas iniciales generadas (SEQ ID NOS: 19-22) (derecha). (B) Ensayo de replicación y cuantificación de Rep quiméricas. Los productos de replicación de la ITR indicada y Rep2 o Rep5 se analizaron mediante transferencia Southern. Se indican especies replicantes monoméricas (m) y dímeras (d). El nivel de replicación de cada muestra se midió mediante análisis densitométrico y se comparó con la replicación de tipo silvestre.
45

Las Figuras 2A-2D muestran la relación de la altura del tallo de corte y la secuencia con la especificidad de Rep-ITR. (A) Secuencia del tallo de corte en un contexto de ITR2 (SEQ ID NOS: 17, 18, 23, 25, 30, 32, 28). La flecha indica el sitio trs. Los corchetes indican la altura de los tallos putativos en nt desde la base del tallo hasta el sitio de corte putativo. Los valores de ΔG predichos para las horquillas están por debajo. El análisis de transferencia Southern de las ITR replicado por Rep2 o Rep5 se muestra a continuación. (B) Cuantificación de las transferencias Southern en relación con la replicación de ts de (A). (C) Igual que (A), excepto que los tallos de corte indicados se usaron en un contexto de ITR5 (SEQ ID NOS: 17, 18, 24, 26, 35). (D) Cuantificación de las transferencias Southern en relación con la replicación de ts de (C).
50

Las Figuras 3A-3D muestran el efecto del espaciado del tallo de corte de RBE sobre la especificidad de Rep-ITR. (A) Los mutantes de ITR2 se sintetizaron con la separación indicada entre el RBE y el tallo de corte (SEQ ID NOS: 17, 31, 33). (B) Análisis de transferencia Southern de las ITR representadas en (A) replicadas por Rep2 o Rep5 (izquierda). Cuantificación de transferencias Southern relativas a la replicación de ts (derecha). (C) Mutantes de ITR5 sintetizados como en (A) (SEQ ID NO: 34, 18, 37, 38). (D) Análisis de transferencia Southern y cuantificación de (C).
55

Las Figuras 4A-4D demuestran que el espaciador de ITR5 actúa como RBE para Rep5. (A) Los mutantes de ITR5 se sintetizaron con la secuencia RBE indicada y espaciadora (SEQ ID NOS: 18, 40, 39, 42). Los corchetes indican repeticiones tetranucleotídicas individuales unidas por monómeros de Rep. Ambas cadenas de la secuencia de ITR5 de ts se muestran para ilustrar la conservación con el motivo GAGY (indicado por *). Solo una cadena mostrada en otros. (B) Análisis de transferencia Southern de las ITR representadas en (A) replicadas por Rep2 o Rep5 (izquierda). Cuantificación de transferencias Southern relativas a la replicación de ts (derecha). (C) Se generaron
60

mutantes de ITR2 con las secuencias de RBE y del espaciador indicadas (SEQ ID NOS: 17, 29, 41, 43). (D) Análisis y cuantificación de transferencia Southern para (C).

Las Figuras 5A-5E muestran la clonación y caracterización de Rep quiméricas (A) Un alineamiento de los terminales N de Rep2 (SEQ ID NO: 114) y Rep5 (SEQ ID NO: 118). (*) representa aminoácidos conservados. (:) y (.) indican sustituciones conservadoras. (^) indica residuos implicados en las interacciones de unión de RBE. (') indica residuos que participan en el sitio activo endonucleolítico. (+) indica residuos implicados en la unión de RBE'. (B) Rep quiméricas creadas y su capacidad de replicar vectores flanqueados por ITR2 o ITR5. Los números indican la posición del aminoácido (aa) del cambio de una Rep por otra. (+) indica la presencia de replicación, (-) indica la ausencia. (C) Transferencia Western para la expresión de las Rep quiméricas. (D) Transferencia Southern que demuestra la replicación de un vector de ITR2 o ITR5 por las Rep quiméricas. Obsérvese que el vector de ITR5 es de 500 pb más grande que el vector de ITR2. (E) Nivel de replicación de las Rep quiméricas relativas a Rep2 o Rep5 de ts.

Las Figuras 6A-6G muestran la caracterización de regiones Rep implicadas en la especificidad de ITR. (A) Rep quiméricas y su capacidad para replicar vectores flanqueados por ITR2 o ITR5. Los números indican la posición del aa del cambio de una Rep por otra. (+) indica la presencia de replicación, (-) indica la ausencia. Se indican las regiones 1 y 2 implicadas en la especificidad de Rep-ITR. (B) Transferencia Western para la expresión de Rep quiméricas. (C) Transferencia Southern que demuestra la replicación de un vector de ITR2 o ITR5 por las Rep quiméricas. Obsérvese que el vector de ITR5 es 500 pb más grande que el vector de ITR2. (D) Modelo estructural que ilustra las dos regiones de Rep. La estructura de Rep2 es azul, Rep5 es púrpura. La tirosina nucleofílica está indicada. El círculo rayado negro indica la diferencia estructural pronosticada de la región 1 en el surco principal de la ITR. (E) Modelo estructural como en (D). La tirosina nucleofílica está indicada. (F) Vista estructural detallada de la región 1. Se muestran las cadenas laterales de residuos no conservados de Rep5 (púrpura) y Rep2 (azul). Se indican tres residuos de Rep5 implicados en la unión de RBE'. (G) Vista estructural detallada de la región 2. Las cadenas laterales de los residuos del sitio activo se muestran en negro. Las cadenas laterales de residuos no conservados en esta región se muestran para Rep2 (azul) y Rep5 (púrpura). La tirosina nucleofílica está indicada, al igual que la Rep2 Asn-155 adyacente.

Las Figuras 7A-7C muestran un modelo de especificidad de Rep-ITR. (A) Transferencia Southern de ADN de Hirt que demuestra la replicación del vector de ITR indicado por la Rep indicada. (B) Tabla que indica la presencia (+) o ausencia (-) de replicación del gel de (A). (C) Modelo de un nuevo origen de replicación de AAV. La ITR quimérica puede ser replicada solo por una proteína Rep quimérica. La secuencia de Rep5 en la región 1 (azul) es necesaria para el RBE ampliado de ITR5 (púrpura). La secuencia Rep2 en la región 2 (amarilla) es necesaria para funcionar en un tallo de corte de ITR2 (cian).

La Figura 8 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-1; número de acceso del GenBank NC 002077; SEQ ID NO: 1.

La Figura 9 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-2; número de acceso del GenBank NC 001401; SEQ ID NO: 2.

La Figura 10 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-3A; número de acceso del GenBank NC 001729; SEQ ID NO: 3.

La Figura 11 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-3B; número de acceso del GenBank NC 001863; SEQ ID NO: 4.

La Figura 12 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-4; número de acceso del GenBank NC 001829; SEQ ID NO: 5.

La Figura 13 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-5; número de acceso del GenBank NC 006152; SEQ ID NO: 6.

La Figura 14 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-6; número de acceso del GenBank NC 001862; SEQ ID NO: 7.

La Figura 15 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-7; número de acceso del GenBank AF 513851; SEQ ID NO: 8.

La Figura 16 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-8; número de acceso del GenBank AF 513852; SEQ ID NO: 9.

La Figura 17 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-9; número de acceso del GenBank AX 753250; SEQ ID NO: 10.

La Figura 18 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-11; número de acceso del GenBank AY 631966; SEQ ID NO: 11.

La Figura 19 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para AAV-13; número de acceso del GenBank EU 285562; SEQ ID NO: 12.

La Figura 20 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para parvovirus B19; número de acceso del GenBank NC 000883; SEQ ID NO: 13.

La Figura 21 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para virus diminuto de ratón (MVM); número de acceso del GenBank NC 001510; SEQ ID NO: 14.

La Figura 22 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para parvovirus de ganso; número de acceso del GenBank NC 001701; SEQ ID NO: 15.

La Figura 23 muestra una secuencia de ADN genómico ilustrativa para el parvovirus de serpiente 1; número de acceso del GenBank NC 006148; SEQ ID NO: 16.

La Figura 24 proporciona una lista a modo de ejemplo de las ITR quiméricas que se sintetizaron como parte de los Ejemplos descritos a continuación: ITR2 (SEQ ID NO: 17), ITR5 (SEQ ID NO: 18), ITR5 + 2SNS (SEQ ID NO: 19),

ITR2 + 5SNS (SEQ ID NO: 20), ITR5 + 2NS (SEQ ID NO: 21), ITR2 + 5NS (SEQ ID NO: 22), ITR2-TA (SEQ ID NO: 23), ITR5 + TA (SEQ ID NO: 24), ITR2-GC (SEQ ID NO: 25), ITR5 + GC (SEQ ID NO: 26), ITR2-2 nt (SEQ ID NO: 27), ITR2 5 nt (SEQ ID NO: 28), ITR2 + 7 (SEQ ID NO: 29), ITR2 9 nt (SEQ ID NO: 30), ITR2 10 nt (SEQ ID NO: 31), ITR2 11 nt (SEQ ID NO: 32), ITR2 15 nt (SEQ ID NO: 33), ITR5 3 nt (SEQ ID NO: 34), ITR5 6 nt (SEQ ID NO: 35), ITR5 9 pb NS (SEQ ID NO: 36), ITR5 21 nt (SEQ ID NO: 37), ITR5 30 nt (SEQ ID NO: 38), ITR5 GAGY (SEQ ID NO: 39), ITR5 no GAGY (SEQ ID NO: 40), ITR2 + 8 nt GAGY (SEQ ID NO: 41), RBE Espaciador de ITR5 (SEQ ID NO: 42), ITR2 + RBE Espaciador de 8-8 (SEQ ID NO: 43), ITR5 con horquillas ITR2 (SEQ ID NO: 44), ITR2 sin horquillas (SEQ ID NO: 45), ITR2 T1 (SEQ ID NO: 46), ITR2 T2 (SEQ ID NO: 47), ITR2 T2 # 2 (SEQ ID NO: 48), ITR2 T3 (SEQ ID NO: 49), ITR2 T4 (SEQ ID NO: 50), ITR5 + 3 nt Espaciador e ITR5 NS (SEQ ID NO: 51) e ITR2 pHpa8 (SEQ ID NO: 52).

La Figura 25 proporciona una lista ilustrativa de las proteínas Rep quiméricas que se sintetizaron como parte de los Ejemplos descritos a continuación: Rep52aa73 (SEQ ID NO: 53), Rep52aa84 (SEQ ID NO: 54), Rep52aa110 (SEQ ID NO: 55), Rep52aa126 (SEQ ID NO: 56), Rep52aa138 (SEQ ID NO: 57), Rep52aa160 (SEQ ID NO: 58), Rep52aa175 (SEQ ID NO: 59), Rep52aa187 (SEQ ID NO: 60), Rep52aa207 (SEQ ID NO: 61), Rep25aa73 (SEQ ID NO: 62), Rep25aa77 (SEQ ID NO: 63), Rep25aa97 (SEQ ID NO: 64), Rep25aa116 (SEQ ID NO: 65), Rep25aa125 (SEQ ID NO: 66), Rep25aa141 (SEQ ID NO: 67), Rep25aa149 (SEQ ID NO: 68), Rep25aa166 (SEQ ID NO: 69), Rep25aa187 (SEQ ID NO: 70), Rep25aa216 (SEQ ID NO: 71), Rep525aa110-148 (SEQ ID NO: 72), Rep525aa146-187 (SEQ ID NO: 73), Rep525aa110-187 (SEQ ID NO: 74), Rep252aa97-146 (SEQ ID NO: 75), Rep252aa149-187 (SEQ ID NO: 76), y Rep252aa97-187 (SEQ ID NO: 77).

La Figura 26 muestra las secuencias tanto de nucleótidos como de aminoácidos de una proteína Rep quimérica de la invención: Rep52aa146 (SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79, respectivamente).

La Figura 27 muestra tanto las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos de una proteína Rep quimérica de la invención: Rep52aa147 (SEQ ID NO: 80 y SEQ ID NO: 81, respectivamente).

La Figura 28 muestra tanto las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos de una proteína Rep quimérica de la invención: Rep52aa151 (SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 83, respectivamente).

La Figura 29 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de proteínas Rep40 de AAV1 (SEQ ID NO: 84), AAV2 (SEQ ID NO: 85), AAV3A (SEQ ID NO: 86), AAV3B (SEQ ID NO: 87), AAV4 (SEQ ID NO: 88), AAV5 (SEQ ID NO: 89), AAV6 (SEQ ID NO: 90), AAV7 (SEQ ID NO: 91) y AAV8 (SEQ ID NO: 92), así como una secuencia consenso (SEQ ID NO: 93). Los guiones indican espacios en la secuencia y el sombreado indica posiciones de homología de secuencia.

La Figura 30 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de proteínas Rep52 de AAV1 (SEQ ID NO: 94), AAV2 (SEQ ID NO: 95), AAV3A (SEQ ID NO: 96), AAV3B (SEQ ID NO: 97), AAV4 (SEQ ID NO: 98), AAV5 (SEQ ID NO: 99), AAV6 (SEQ ID NO: 100), AAV7 (SEQ ID NO: 101) y AAV8 (SEQ ID NO: 102), así como secuencia consenso (SEQ ID NO: 103). Los guiones indican espacios en la secuencia y el sombreado indica posiciones de homología de secuencia.

La Figura 31 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de proteínas Rep68 de AAV1 (SEQ ID NO: 104), AAV2 (SEQ ID NO: 105), AAV3A (SEQ ID NO: 106), AAV3B (SEQ ID NO: 107), AAV4 (SEQ ID NO: 108), AAV5 (SEQ ID NO: 109), AAV6 (SEQ ID NO: 110), AAV7 (SEQ ID NO: 111) y AAV8 (SEQ ID NO: 112). Los guiones indican espacios en la secuencia y el sombreado indica posiciones de homología de secuencia.

La Figura 32 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de proteínas Rep78 de AAV1 (SEQ ID NO: 113), AAV2 (SEQ ID NO: 114), AAV3A (SEQ ID NO: 115), AAV3B (SEQ ID NO: 116), AAV4 (SEQ ID NO: 117), AAV5 (SEQ ID NO: 118), AAV6 (SEQ ID NO: 119), AAV7 (SEQ ID NO: 120) y AAV8 (SEQ ID NO: 121), así como una secuencia consenso (SEQ ID NO: 122). Los guiones indican espacios en la secuencia y el sombreado indica posiciones de homología de secuencia.

La Figura 33 muestra la secuencia de nucleótidos de ITR de serpiente utilizada en el Ejemplo 9 (SEQ ID NO: 123).

La Figura 34 muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido vector eGFP de ITR de serpiente (SEQ ID NO: 124) usada para sintetizar el vector de serpiente descrito en el Ejemplo 9.

La Figura 35 muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido pSnRepCap2 (SEQ ID NO: 125) usado para sintetizar el vector de serpiente descrito en el Ejemplo 9.

La Figura 36 muestra un diagrama de síntesis de ITR. (A) La ITR se sintetizó en dos piezas (azul oscuro y azul claro) superpuestas a través de un tallo de horquilla con el sitio *SfiI* (naranja). (B) Cada mitad se amplificó por PCR antes de la digestión y la clonación. (C) La triple ligadura adecuada con GFP de pUC18-CMV produjo una ITR en formato DD.

Descripción detallada

La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

Las secuencias de nucleótidos se presentan en este documento solo con cadena sencilla, en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha, a menos que se indique específicamente lo contrario. Los nucleótidos y aminoácidos están representados en este documento de la manera recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB, o (para aminoácidos) por el código de una letra, o el código de tres letras, ambos de acuerdo con 37 CFR

§1.822 y el uso establecido. Véase, por ejemplo, el Manual de usuario de PatentIn, 99-102 (noviembre de 1990) (Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos).

5 Excepto que se indique lo contrario, los métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica pueden usarse para la construcción de constructos de parvovirus y rAAV recombinantes, vectores de empaquetamiento que expresan las secuencias de Rep y/o Cap de parvovirus, y células de empaquetamiento transfectadas en forma transitoria y estable. Tales técnicas son conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, SAMBROOK et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2a Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); AUSUBEL et al. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc.,
10 Nueva York).

Definiciones

15 Los siguientes términos se usan en la descripción de este documento y en las reivindicaciones adjuntas:

Las formas singulares "un" y "uno, una" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20 Además, el término "aproximadamente", como se usa en este documento cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de la longitud de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica, dosis, tiempo, temperatura y similares, pretende abarcar variaciones de 20%, 10%, 5%, 1%, 0,5% o incluso 0,1% de la cantidad especificada.

También como se usa en el presente documento, "y/o" se refiere a cualquiera y todas las posibles combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como a la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").
25

30 Como se usa en el presente documento, la frase de transición "que consiste esencialmente en" se debe interpretar como que abarca los materiales o etapas enumerados "y aquellos que no afectan materialmente a la característica o características básicas y nuevas" de la invención reivindicada (por ejemplo, replicación de rAAV). Véase, In re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 USPQ 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); véase también MPEP § 2111.03. Por lo tanto, el término "que consiste esencialmente en" como se usa en el presente documento no debe interpretarse como equivalente a "que comprende".

35 El término "parvovirus", como se usa en el presente documento, abarca la familia *Parvoviridae*, que incluye parvovirus y dependovirus que se replican de manera autónoma. Los parvovirus autónomos incluyen miembros del género *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus* y *Contravirus*. Los ejemplos de parvovirus autónomos incluyen, pero no se limitan a, virus diminutos de ratón, parvovirus bovino, parvovirus canino, parvovirus de pollo, virus de panleucopenia felina, parvovirus felino, parvovirus de ganso, parvovirus HI, parvovirus de pato moscovita, parvovirus de serpiente y virus B19 (véanse, por ejemplo, las Figuras 20-23). Los expertos en la técnica conocen otros parvovirus autónomos. Véase, por ejemplo, FIELDS et al. VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4a ed.,
40 Lippincott-Raven Publishers).

45 El género *Dependovirus* contiene los virus adenoasociados (AAV), que incluyen, pero no se limitan a, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV tipo 12, AAV tipo 13, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV de cabra, AAV de serpiente, AAV equino y AAV ovino. Véase, por ejemplo, Figs. 8-19; FIELDS et al. VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4ª ed., Lippincott-Raven Publishers); y Tabla 1.

50 Como se usa en el presente documento, el término "virus adenoasociado" (AAV) incluye, pero no se limita a, AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV tipo 12, AAV tipo 13, AAV de serpiente, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, AAV de cabra, AAV de camarón y cualquier otro AAV hasta ahora conocido o más tarde descubierto. Véase, por ejemplo, FIELDS et al. VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (4a ed., Lippincott-Raven Publishers). Se han identificado varios serotipos y clados de AAV relativamente nuevos (véase, por ejemplo, Gao et al. (2004) J. Virol. 78: 6381; Moris et al. (2004) Virol. 33: 375; y Tabla 1).
55

60 Las partículas y genomas de parvovirus de la presente invención pueden ser, pero no se limitan a, AAV. Las secuencias genómicas de diversos serotipos de AAV y los parvovirus autónomos, así como las secuencias de las ITR nativas, las proteínas Rep y las subunidades de la cápside son conocidas en la técnica. Dichas secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas tales como el GenBank. Véase, por ejemplo, las Figs. 8-23; números de acceso del GenBank NC_002077, NC_001401, NC_001729, NC_001863, NC_001829, NC_001862, NC_008863, NC_001701, NC_001510, NC_006152, NC_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, AY631966, AX753250, EU285562, NC_001358, NC_001540, AF513851, AF513852 y AY530579; las divulgaciones que se incorporan aquí por referencia para la enseñanza de secuencias de parvovirus y de ácido nucleico de AAV y de aminoácidos. Véase también, por ejemplo, Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virol. 73: 939; Chiorini et al. (1997) J. Virol.
65

71: 6823; Chiorini et al. (1999) J. Virol. 73: 1309; Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 11854; Moris et al. (2004) Virol. 33: 375-383; Mori et al. (2004) Virol. 330: 375; Muramatsu et al. (1996) Virol. 221: 208; Ruffing et al. (1994) J. Gen. Virol. 75: 3385; Rutledge et al. (1998) J. Virol. 72: 309; Schmidt et al. (2008) J. Virol. 82: 8911; Shade et al., (1986) J. Virol. 58: 921; Srivastava et al. (1983) J. Virol. 45: 555; Xiao et al. (1999) J. Virol. 73: 3994; publicaciones internacionales de patente WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y la patente de Estados Unidos No. 6.156.303; cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia para la enseñanza de secuencias de parvovirus y ácido nucleico de AAV y de aminoácidos. Véase también la Tabla 1. Xiao, X., (1996) proporciona una descripción temprana de las secuencias de ITR de AAV1, AAV1 y AAV1. "Characterization of Adeno-associated virus (AAV) DNA replication and integration", Ph.D. Disertación, Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh, PA (incorporada en este documento en su totalidad).

El término "tropismo" como se usa en la presente memoria se refiere a la entrada del virus en la célula, opcionalmente y preferiblemente seguido por la expresión (por ejemplo, transcripción y, opcionalmente, traducción) de secuencias llevada a cabo por el genoma viral en la célula, por ejemplo, para un virus recombinante, expresión de la secuencia o secuencias heterólogas de nucleótidos. Los expertos en la materia apreciarán que la transcripción de una secuencia heteróloga de ácido nucleico del genoma viral puede no iniciarse en ausencia de factores que actúa en forma trans, por ejemplo, para un promotor inducible o una secuencia de ácido nucleico regulada de otro modo. En el caso de AAV, la expresión génica del genoma viral puede ser de un provirus integrado en forma estable, de un episoma no integrado, así como de cualquier otra forma en la que el virus pueda entrar dentro de la célula.

Como se usa en el presente documento, "transducción" o "infección" de una célula por un parvovirus o AAV significa que el parvovirus/AAV entra en la célula para establecer una infección activa (es decir, lítica). Como se usa en este documento, la "transducción" de una célula por AAV significa que el AAV entra en la célula para establecer una infección latente. Véase, por ejemplo, FIELDS et al. VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (tercera edición, Lippincott-Raven Publishers).

Tabla 1

Genomas completos	Número de acceso del GenBank		Número de acceso del GenBank		Número de acceso del GenBank
		Hu T88	AY695375	Clado E	
Virus adenoasociado 1	NC_002077, AF063497	Hu T71	AY695374	Rh38	AY530558
Virus adenoasociado 2	NC_001401	Hu T70	AY695373	Hu66	AY530626
Virus adenoasociado 3	NC_001729	Hu T40	AY695372	Hu42	AY530605
Virus adenoasociado 3B	NC_001863	Hu T32	AY695371	Hu67	AY530627
Virus adenoasociado 4	NC_001829	Hu T17	AY695370	Hu40	AY530603
Virus adenoasociado 5	Y18065, AF085716	Hu LG15	AY695377	Hu41	AY530604
Virus adenoasociado 6	NC_001862			Hu37	AY530600
AAV aviar ATCC VR-865	AY186198, AY629583, NC_004828	Clado C		Rh40	A Y530559
Cepa DA-1 del AAV aviar	NC_006263, AY629583	Hu9	AY530629	Rh2	A Y243007
AAV bovino	NC_005889, AY388617	Hu10	AY530576	Bb1	A Y243023
		Hu11	AY530577	Bb2	A Y243022
Clado A		Hu53	AY530615	Rh10	AY243015
AAV1	NC_002077, AF063497	Hu55	AY530617	Hu17	AY530582
AAV6	NC_001862	Hu54	AY530616	Hu6	AY530621
Hu.48	AY530611	Hu7	AY530628	Rh25	A Y530557
Hu 43	AY530606	Hu18	AY530583	Pi2	AY530554
Hu 44	AY530607	Hu15	AY530580	Pi1	AY530553
Hu 46	AY530609	Hu16	AY530581	Pi3	AY530555
		Hu T88	AY695375	Clado E	
		Hu25	AY530591	Rh57	A Y530569
Clado B		Hu60	AY530622	Rh50	A Y530563

Hu. 19	AY530584	Ch5	AY243021	Rh49	A Y530562
Hu. 20	AY530586	Hu3	AY530595	Hu39	AY530601
Hu 23	AY530589	Hu1	AY530575	Rh58	A Y530570
Hu22	AY530588	Hu4	AY530602	Rh61	A Y530572
Hu24	AY530590	Hu2	AY530585	Rh52	A Y530565
Hu21	AY530587	Hu61	AY530623	Rh53	A Y530566
Hu27	AY530592			Rh51	A Y530564
Hu28	AY530593	Clado D		Rh64	A Y530574
Hu 29	AY530594	Rh62	AY530573	Rh43	A Y530560
Hu63	AY530624	Rh48	AY530561	AAV8	AF513852
Hu64	AY530625	Rh54	AY530567	Rh8	A Y242997
Hu13	AY530578	Rh55	AY530568	Rh1	A Y530556
Hu56	AY530618	Cy2	AY243020		
Hu57	AY530619	AAV7	AF513851	Clado F	
Hu49	AY530612	Rh35	AY243000	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu58	AY530620	Rh37	AY242998	Hu31	AY530596
Hu34	AY530598	Rh36	AY242999	Hu32	AY530597
Hu35	AY530599	Cy6	AY243016		
AAV2	NC 001401	Cy4	AY243018	Aislado clonal	
Hu45	AY530608	Cy3	AY243019	AAV5	Y18065, AF085716
Hu47	AY530610	Cy5	AY243017	AAV 3	NC_ 001729
Hu51	AY530613	Rh13	AY243013	AAV 3B	NC_ 001863
Hu52	AY530614			AAV4	NC_ 001829
Hu T41	AY695378			Rh34	AY243001
Hu S17	AY695376			Rh33	AY243002
				Rh32	AY243003

Los términos "porción 5'" y "porción 3'" son términos relativos para definir una relación espacial entre dos o más elementos. Por lo tanto, por ejemplo, una "porción 3'" de un polinucleótido indica un segmento del polinucleótido que está secuencia abajo de otro segmento. El término "porción 3'" no pretende indicar que el segmento esté necesariamente en el extremo 3' del polinucleótido, o incluso que esté necesariamente en la mitad 3' del polinucleótido, aunque puede serlo. Asimismo, una "porción 5'" de un polinucleótido indica un segmento del polinucleótido que está secuencia arriba de otro segmento. El término "porción 5'" no pretende indicar que el segmento esté necesariamente en el extremo 5' del polinucleótido, o incluso que esté necesariamente en la mitad 5' del polinucleótido, aunque puede serlo.

Como se usa en este documento, el término "polipéptido" abarca tanto péptidos como proteínas, a menos que se indique lo contrario.

Un "polinucleótido" es una secuencia de bases de nucleótidos, y pueden ser secuencias híbridas de ARN, ADN o ADN-ARN (que incluyen tanto nucleótidos naturales como no naturales), y pueden ser secuencias de ADN de cadena sencilla o de cadena doble.

El término "identidad de secuencia", como se usa en este documento, tiene el significado estándar en la técnica. Como se conoce en la técnica, se pueden usar varios programas diferentes para identificar si un polinucleótido o polipéptido tiene identidad o similitud de secuencia con una secuencia conocida. La identidad o similitud de secuencia se puede determinar usando técnicas estándar conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), el programa de secuencia Best Fit descrito por Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12: 387 (1984), preferiblemente usando las configuraciones predeterminadas, o por inspección.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos por pares. También puede trazar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del

método de alineación progresiva de Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35: 351 (1987); el método es similar al descrito por Higgins & Sharp, CABIOS 5: 151 (1989).

5 Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990) y Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 (1993). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et al., Meth. Enzymol., 266: 460 (1996); blast.wustl.edu/blast/README.html. WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, que preferiblemente se establecen en los valores predeterminados. Los parámetros son valores dinámicos y los establece el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de datos particular frente a la cual se busca la secuencia de interés; sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

10 Un algoritmo útil adicional es BLAST con huecos según lo informado por Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 (1997).

15 Un porcentaje del valor de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina por el número de residuos idénticos coincidentes dividido por el número total de residuos de la secuencia "más larga" en la región alineada. La secuencia "más larga" es la que tiene los residuos más reales en la región alineada (se ignoran los huecos introducidos por WU-Blast-2 para maximizar la puntuación de alineación).

20 De manera similar, el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a la secuencia codificante de los polipéptidos divulgados en la presente memoria se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en la secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en el polinucleótido divulgado específicamente en este documento.

25 El alineamiento puede incluir la introducción de huecos en las secuencias a alinear. Además, para las secuencias que contienen más o menos aminoácidos que los polipéptidos divulgados específicamente en este documento, se entiende que en una realización, el porcentaje de identidad de secuencia se determinará en función del número de aminoácidos idénticos en relación con el número total de aminoácidos. Por lo tanto, por ejemplo, la identidad de secuencia de secuencias más cortas que una secuencia específicamente divulgada en este documento, se determinará usando el número de aminoácidos en la secuencia más corta, en una realización. En los cálculos de porcentaje de identidad, el peso relativo no se asigna a diversas manifestaciones de variación de secuencia, tales como inserciones, eliminaciones, sustituciones, etc.

35 En una realización, solo las identidades se puntúan positivamente (+1) y se les asigna a todas las formas de variación de secuencia, incluyendo huecos, un valor de "0", lo que evita la necesidad de una escala o parámetros ponderados como se describe a continuación para cálculos de similitud de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular, por ejemplo, dividiendo el número de residuos idénticos coincidentes por el número total de residuos de la secuencia "más corta" en la región alineada y multiplicando por 100. La secuencia "más larga" es la que tiene más residuos reales en la región alineada.

40 Como se usa en este documento, un polinucleótido "aislado" (por ejemplo, un "ADN aislado" o un "ARN aislado") significa un polinucleótido separado o sustancialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus natural, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o virales u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados asociados con el polinucleótido.

45 De forma similar, un polipéptido "aislado" significa un polipéptido que está separado o sustancialmente libre de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus natural, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o virales u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados asociado con el polipéptido.

50 Un "polipéptido terapéutico" es un polipéptido que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un "polipéptido terapéutico" es uno que o bien confiere un beneficio a un sujeto, por ejemplo, efectos anticancerígenos o una mejora en la capacidad de supervivencia del trasplante.

55 Como se usa en el presente documento, el término "modificado", tal como se aplica a una secuencia polinucleotídica o polipeptídica, se refiere a una secuencia que difiere de una secuencia natural debido a una o más eliminaciones, adiciones, sustituciones o cualquier combinación de las mismas.

60 Como se usa en este documento, por "aislar" o "purificar" (o equivalentes gramaticales) un vector viral, se entiende que el vector viral está al menos parcialmente separado de al menos algunos de los otros componentes en el material de partida.

65 Por los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento de" (y las variaciones gramaticales de los mismos) se entiende que la gravedad de la afección del sujeto se reduce, al menos parcialmente, se mejora o se estabiliza y/o se alivia algo, se logra mitigación, disminución o estabilización en al menos un síntoma clínico y/o hay un retraso en la progresión de la enfermedad o trastorno.

Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" (y las variaciones gramaticales de los mismos) se refieren a la prevención y/o retraso del inicio de una enfermedad, trastorno y/o síntoma o síntomas clínicos en un sujeto y/o una reducción en la severidad del inicio de la enfermedad, trastorno y/o síntoma o síntomas clínicos con relación a lo que ocurriría en ausencia de los métodos de la invención. La prevención puede ser completa, por ejemplo, la ausencia total de la enfermedad, trastorno y/o síntoma o síntomas clínicos. La prevención también puede ser parcial, de modo que la aparición de la enfermedad, trastorno y/o síntoma o síntomas clínicos en el sujeto y/o la gravedad del inicio es menor de lo que ocurriría en ausencia de la presente invención.

Una cantidad "eficaz para el tratamiento" como se usa en este documento es una cantidad que es suficiente para proporcionar alguna mejora o beneficio al sujeto. De forma alternativa, una cantidad "eficaz para el tratamiento" es una cantidad que proporcionará algún alivio, mitigación, disminución o estabilización en al menos un síntoma clínico en el sujeto. Los expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre que se proporcione algún beneficio al sujeto.

Una cantidad "efectiva para la prevención" como se usa en el presente documento es una cantidad que es suficiente para prevenir y/o retrasar el inicio de una enfermedad, trastorno y/o síntomas clínicos en un sujeto y/o para reducir y/o retrasar la gravedad del inicio de una enfermedad, trastorno y/o síntomas clínicos en un sujeto en relación con lo que ocurriría en ausencia de los métodos de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que el nivel de prevención no necesita ser completo, siempre que se proporcione algún beneficio al sujeto.

Los términos "secuencia de nucleótidos heteróloga" y "ácido nucleico heterólogo" se usan indistintamente en este documento y se refieren a una secuencia que no se produce de forma natural en el virus. Generalmente, el ácido nucleico heterólogo comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido o ARN de interés no traducido (por ejemplo, para la administración a una célula o sujeto).

Como se usa en el presente documento, los términos "vector viral", "vector" o "vector de administración de genes" se refieren a una partícula de virus (por ejemplo, AAV) que funciona como un vehículo para administración de ácido nucleico y que comprende el genoma del vector (por ejemplo, ADN viral [ADNV]) empacado dentro de un virión. Alternativamente, en algunos contextos, el término "vector" puede usarse para referirse al genoma/ADNV del vector solo.

Los vectores virales de la invención también pueden ser además partículas de parvovirus dúplex como se describe en la publicación internacional de patente WO 01/92551 (cuya descripción se incorpora en este documento como referencia en su totalidad). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los genomas de doble cadena (dúplex) se pueden empacar en las cápsidas virales de la invención.

Un "genoma del vector de rAAV" o "genoma de rAAV" es un genoma de AAV (es decir, ADNv) que comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas. Los vectores de rAAV generalmente solo requieren de 145 ITR base en cis para generar el virus. Todas las demás secuencias virales son prescindibles y pueden suministrarse en trans (Muzyczka (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158: 97). Típicamente, el genoma del vector de rAAV solo retendrá una o más secuencias de ITR para maximizar el tamaño del transgén que puede ser eficientemente empacado por el vector. Las secuencias que codifican proteínas estructurales y no estructurales pueden ser proporcionadas en trans (por ejemplo, a partir de un vector, tal como un plásmido, o integrando de manera estable las secuencias en una célula de empaquetamiento). En realizaciones de la invención, el genoma del vector de rAAV comprende al menos una secuencia de ITR (por ejemplo, secuencia de ITR de AAV), opcionalmente dos ITR (por ejemplo, dos ITR de AAV), que típicamente estarán en los extremos 5' y 3' del genoma del vector y flanquean el ácido nucleico heterólogo, pero no necesitan ser contiguos al mismo. Los ITR pueden ser iguales o diferentes entre sí.

El término "repetición terminal" o "TR" incluye cualquier repetición terminal viral o secuencia sintética que forma una estructura en horquilla y funciona como una repetición terminal invertida (es decir, media las funciones deseadas tales como replicación, empaque de virus, integración y/o rescate de provirus, y similares). La ITR puede ser una ITR de AAV o una ITR que no sea de AAV. Por ejemplo, una secuencia de ITR que no es de AAV como las de otros parvovirus (por ejemplo, parvovirus canino, parvovirus bovino, parvovirus de ratón, parvovirus porcino, parvovirus humano B-19) o la horquilla de SV40 que sirve como origen de la replicación de SV40 pueden ser utilizado como una ITR, que puede ser modificada por truncamiento, sustitución, eliminación, inserción y/o adición. Además, la ITR puede ser parcialmente o completamente sintética, tal como la "secuencia doble D" como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.478.745 de Samulski et al. La figura 24 proporciona ejemplos de ITR sintéticas contempladas por la presente invención.

Los genomas de parvovirus tienen secuencias palindrómicas en sus extremos 5' y 3'. La naturaleza palindrómica de las secuencias conduce a la formación de una estructura en horquilla que se estabiliza mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarios. Se cree que esta estructura en horquilla adopta una forma de "Y" o "T". Véase, por ejemplo, FIELDS et al., VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4a ed., Lippincott-Raven Publishers).

Una "repetición terminal invertida de AAV" o "ITR de AAV" puede ser de cualquier AAV, incluyendo, pero sin limitarse a los serotipos 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 13, AAV de serpiente, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino AAV equino AA bovino AAV de cabra, AAV de camarón, o cualquier otro AAV ahora conocido o descubierto posteriormente (por ejemplo, véase, la Tabla 1). Una ITR de AAV no necesita tener la secuencia de repetición terminal nativa (por ejemplo, una secuencia de ITR de AAV nativa puede alterarse por inserción, eliminación, truncamiento y/o mutaciones sin sentido), siempre y cuando la repetición terminal medie las funciones deseadas, por ejemplo, replicación, empaque de virus, integración, y/o rescate de provirus, y similares.

Los vectores virales de la invención pueden ser además vectores virales "dirigidos" (por ejemplo, que tienen un tropismo dirigido) y/o un parvovirus "híbrido" (es decir, en los que las ITR virales y la cápside viral son de diferentes parvovirus) como se describe en la publicación internacional de patente WO 00/28004 y Chao et al., (2000) Mol. Terapia 2: 619.

Además, la cápside viral o los elementos genómicos pueden contener otras modificaciones, que incluyen inserciones, eliminaciones y/o sustituciones.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" abarca cualquier aminoácido de origen natural, formas modificadas del mismo y aminoácidos sintéticos.

Los aminoácidos levorrotatorios (L) que se producen naturalmente se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Residuo de aminoácido	Abreviatura	
	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico (Aspartato)	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutámico (Glutamato)	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Alternativamente, el aminoácido puede ser un residuo de aminoácido modificado (se muestran ejemplos no limitantes en la Tabla 3) o puede ser un aminoácido que se modifica mediante modificación postraduccional (por ejemplo, acetilación, amidación, formilación, hidroxilación, metilación, fosforilación o sulfatación).

Además, el aminoácido no natural puede ser un aminoácido "no natural" como lo describen Wang et al., (2006) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35: 225-49. Estos aminoácidos no naturales se pueden usar ventajosamente para unir químicamente moléculas de interés con la proteína de la cápside de AAV.

El término "plantilla" o "sustrato" se usa en el presente documento para referirse a una secuencia de polinucleótidos que puede replicarse para producir el ADN viral de parvovirus. Para el propósito de la producción de vectores, la plantilla típicamente estará incluida dentro de una secuencia o construcción de nucleótidos más grande, que incluye pero no se limita a un plásmido, vector de ADN desnudo, cromosoma artificial bacteriano (BAC), cromosoma artificial de levadura (YAC) o un vector viral (por ejemplo, adenovirus, virus del herpes, virus de Epstein-Barr, AAV, vectores baculoviral, retroviral, y similares). Alternativamente, la plantilla puede incorporarse de forma estable en el cromosoma de una célula de empaque.

Tabla 3

Residuo de Aminoácido Modificado	Abreviatura
Derivados del Residuo de Aminoácido	
Ácido 2-aminoadípico	Aad
Ácido 3-aminoadípico	bAad
beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico	bAla
Ácido 2-aminobutírico	Abu
Ácido 4-aminobutírico, Ácido piperidínico	4Abu
Ácido 6-Aminocaproico	Acp
Ácido 2-Aminoheptanoico	Ahe
Ácido 2-Aminoisobutírico	Aib
3-Aminoisobutírico	bAib
Ácido 2-Aminopimélico	Apm
t-butilalanina	t-BuA
Citulina	Cit
Ciclohexilalanina	Cha
Ácido 2,4-diaminobutírico	Dbu
Desmosina	Des
Ácido 2,2'-diaminopimélico	Dpm
Ácido 2,3-diaminopropiónico	Dpr
N-Etilglicina	EtGly
N-Etilasparagina	EtAsn
Homoarginina	hArg
Homocisteína	hCys
Homoserina	hSer
Hidroxilisina	Hyl
Allo-Hidroxilisina	aHyl
3-Hidroxiprolina	3Hyp
4-Hidroxiprolina	4Hyp
Isodesmosina	Ide
allo-Isoleucina	alle
sulfóxido de metionina	MSO
N-Metilglicina, sarcosina	MeGly
N-Metilisoleucina	Melle
6-N-Metilisina	MeLys
N-Metilvalina	MeVal
2-Naphtilalanina	2-Nal
Norvalina	Nva
Norleucina	Nle
Ornitina	Orn
4-Chlorofenilalanina	Phe(4-Cl)
2-Fluorofenilalanina	Phe(2-F)
3- Fluorofenilalanina	Phe(3-F)
4- Fluorofenilalanina	Phe(4-F)
Fenilglicina	Phg
Beta-2-tienilalanina	Thi

5 Como se usa en el presente documento, las "secuencias de codificación Rep" de parvovirus o AAV indican las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas no estructurales de parvovirus o AAV que median la replicación viral y la producción de nuevas partículas de virus. Los genes y proteínas de replicación de parvovirus y AAV se han descrito en, por ejemplo, FIELDS et al., VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4a ed., Lippincott-Raven Publishers).

10 Las "secuencias de codificación Rep" no necesitan codificar todas las proteínas Rep parvovirales o de AAV. Por ejemplo, con respecto a AAV, las secuencias de codificación de Rep no necesitan codificar las cuatro proteínas Rep de AAV (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40), de hecho, se cree que AAV5 solo expresa las proteínas Rep68 y Rep40 empalmadas. En realizaciones representativas, las secuencias de codificación de Rep codifican al menos aquellas proteínas de replicación que son necesarias para la replicación del genoma viral y el empaquetamiento en nuevos viriones. Las secuencias de codificación de Rep generalmente codificarán al menos una proteína Rep grande (es decir, Rep78/68) y una proteína Rep pequeña (es decir, Rep52/40). En realizaciones particulares, las secuencias de codificación de Rep codifican la proteína Rep78 de AAV y las proteínas Rep52 y/o Rep40 de AAV. En otras realizaciones, las secuencias de codificación de Rep codifican las proteínas Rep68 y Rep52 y/o Rep40. En una realización adicional, las secuencias de codificación de Rep codifican las proteínas Rep68 y Rep52, las proteínas Rep68 y Rep40, las proteínas Rep78 y Rep52, o las proteínas Rep78 y Rep40.

20

Como se usa en el presente documento, el término "proteína Rep grande" se refiere a Rep68 y/o Rep78. Las proteínas Rep grandes de la invención reivindicada pueden ser naturales o sintéticas. Una proteína Rep grande de tipo silvestre puede ser de cualquier AAV, incluyendo, pero sin limitarse a, los serotipos 1, 2, 3a, 3b, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 13 o cualquier otro AAV ahora conocido o descubierto más tarde (véase, por ejemplo, Tabla 1). Una proteína Rep grande sintética puede alterarse por inserción, eliminación, truncamiento y/o mutaciones sin sentido.

Los expertos en la técnica apreciarán adicionalmente que no es necesario que las proteínas de replicación estén codificadas por el mismo polinucleótido. Por ejemplo, para MVM, las proteínas NS-1 y NS-2 (que son variantes de empalme) se pueden expresar independientemente la una de la otra. Asimismo, para AAV, el promotor p19 puede inactivarse y la proteína o proteínas Rep grandes expresadas a partir de un polinucleótido y la proteína o proteínas Rep pequeñas expresadas a partir de un polinucleótido diferente. Típicamente, sin embargo, será más conveniente expresar las proteínas de replicación a partir de una única construcción. En algunos sistemas, los promotores virales (por ejemplo, el promotor p19 de AAV) pueden no ser reconocidos por la célula, y por lo tanto es necesario expresar las proteínas Rep grandes y pequeñas a partir de casetes de expresión separados. En otros casos, puede ser deseable expresar las proteínas Rep grande y Rep pequeña por separado, es decir, bajo el control de elementos de control transcripcionales y/o traduccional separados. Por ejemplo, puede ser deseable controlar la expresión de las proteínas Rep grandes, para disminuir la relación de proteínas Rep grandes a pequeñas. En el caso de las células de insectos, puede ser ventajoso subregular la expresión de las proteínas Rep grandes (por ejemplo, Rep78/68) para evitar toxicidad para las células (véase, por ejemplo, Urabe et al., (2002) Human Gene Therapy 13: 1935).

Como se usa en el presente documento, el término "proteína Rep grande sintética" se refiere a una proteína Rep grande que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de proteína Rep grande de tipo silvestre. La secuencia de la proteína Rep grande sintética puede diferir de una secuencia de tipo silvestre debido a una o más eliminaciones, adiciones, sustituciones o cualquier combinación de las mismas. La diferencia entre las secuencias sintéticas y de tipo silvestre puede ser tan pequeña tal como un cambio de un solo aminoácido, por ejemplo, un cambio en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 o 600 o más aminoácidos o cualquier intervalo en el mismo. En ciertas realizaciones, la proteína Rep grande sintética es una proteína Rep quimérica que comprende porciones de la secuencia de tipo silvestre de dos o más proteínas Rep grandes diferentes. En otras realizaciones, la proteína Rep grande sintética es una proteína Rep quimérica que comprende porciones de la secuencia de tipo silvestre de dos o más proteínas Rep grandes diferentes, una o más porciones de las cuales se han modificado a partir de la secuencia de tipo silvestre.

Como se usa en el presente documento, las "secuencias codificadoras de la cubierta" de parvovirus o AAV codifican las proteínas estructurales que forman un parvovirus funcional o cápside de AAV (es decir, pueden empaquetar ADN e infectar células objetivo). Típicamente, las secuencias codificadoras de la cubierta codificarán todas las subunidades de la cápside de parvovirus o AAV, pero se pueden codificar menos pero no todas las subunidades de la cápside siempre que se produzca una cápside funcional. Típicamente, pero no necesariamente, las secuencias codificadoras de la cubierta estarán presentes en una única molécula de ácido nucleico.

La estructura de la cápside de los parvovirus autónomos y AAV se describe con más detalle en BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4a ed., Lippincott-Raven Publishers).

Como se usa en el presente documento, el término "elemento estructural" cuando se usa con respecto a una ITR de parvovirus, se refiere a una porción de la ITR que, en función de la secuencia de nucleótidos, la estructura secundaria o ambas, desempeña un papel en la interacción funcional de una proteína Rep grande con la ITR, por ejemplo, una porción que, cuando se elimina de la ITR, impide la interacción funcional con una proteína Rep grande. En algunas realizaciones, el elemento estructural interactúa físicamente con la proteína Rep grande.

Como se usa en el presente documento, el término "interactúa funcionalmente" se refiere a una interacción entre una ITR y una proteína Rep grande (por ejemplo, de unión) que finalmente da como resultado el corte de la ITR y la replicación de un polinucleótido en el que está presente la ITR.

Como se usa en el presente documento, el término "tallo de corte" se refiere a una estructura de bucle en horquilla presente en una ITR de parvovirus que es cortada por una proteína Rep grande durante la replicación de un polinucleótido en el que está presente la ITR.

Como se usa en el presente documento, el término "RBE extendido" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una ITR de parvovirus entre el tallo de corte y el RBE (la secuencia espaciadora como se muestra en la Figura 1A) que, en ciertos parvovirus (por ejemplo, AAV5), funciona como una extensión del RBE (es decir, es reconocido y unido por una proteína Rep grande). El término "RBE extendido" solo se aplica a la secuencia espaciadora cuando la secuencia funciona como una extensión del RBE.

ITR de parvovirus modificado

La presente invención proporciona ITR de parvovirus modificadas y proteínas Rep sintéticas que interactúan funcionalmente con las ITR modificadas. Las ITR modificadas son únicas ya que no interactúan funcionalmente con las proteínas Rep de tipo silvestre y pueden reducir o evitar la movilización del vector.

Un aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido que comprende al menos una ITR de parvovirus, en el que la ITR comprende elementos estructurales de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 21. La ITR interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande de AAV sintética. La forma en que se determinan los elementos estructurales se analiza a continuación. En realizaciones particulares de la presente divulgación, la proteína Rep grande sintética comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 81 y 83 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con una de las SEQ ID NOs: 79, 81 y 83, por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad. En una realización, la ITR comprende además un tercer elemento estructural que interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande de un AAV que es igual o diferente del primer y/o segundo AAV.

En una realización de la presente divulgación, la ITR de parvovirus es de un parvovirus autónomo. En otra realización, la ITR de parvovirus es de un AAV, por ejemplo, un AAV seleccionado del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 y AAV13. En una realización adicional, la ITR de parvovirus es de un AAV no humano tal como AAV de serpiente, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, AAV de cabra o AAV de camarón.

El elemento estructural de la ITR puede ser cualquier elemento estructural que esté implicado en la interacción funcional de la ITR con una proteína Rep grande. En ciertas realizaciones, el elemento estructural proporciona selectividad a la interacción de una ITR con una proteína Rep grande, es decir, determina al menos en parte qué proteína Rep interactúa funcionalmente con la ITR. En otras realizaciones, el elemento estructural interactúa físicamente con una proteína Rep grande cuando la proteína Rep está unida a la ITR. Cada elemento estructural puede ser, por ejemplo, una estructura secundaria de la ITR, una secuencia de nucleótidos de la ITR, un espaciamiento entre dos o más elementos, o una combinación de cualquiera de los anteriores. En una realización, los elementos estructurales se seleccionan del grupo que consiste en un tallo de corte, un espaciador, un RBE, un RBE extendido y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, el primer elemento estructural es un tallo de corte. En otra realización, el segundo elemento estructural es un RBE. En una realización adicional, el segundo elemento estructural es un RBE extendido. En una realización adicional, el segundo elemento estructural es un espaciador.

La capacidad de un elemento estructural para interactuar funcionalmente con una proteína Rep grande particular puede alterarse modificando el elemento estructural. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos del elemento estructural puede modificarse en comparación con la secuencia de tipo silvestre de la ITR. En una realización, el elemento estructural (por ejemplo, el tallo de corte, el espaciador, el RBE y/o el RBE extendido) de una ITR puede eliminarse y reemplazarse con un elemento estructural de tipo silvestre de un parvovirus diferente. Por ejemplo, la estructura de reemplazo puede ser de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, parvovirus de serpiente (por ejemplo, parvovirus de pitón real), parvovirus bovino, parvovirus de cabra, parvovirus aviar, parvovirus canino, parvovirus equino, parvovirus del camarón, parvovirus porcino o AAV de insectos. Por ejemplo, la ITR puede ser una ITR de AAV2 y el tallo de corte o RBE se puede reemplazar con un elemento estructural de AAV5. En otro ejemplo, la ITR puede ser una ITR de AAV5 y el tallo de corte, RBE o RBE extendido se puede reemplazar con un elemento estructural de AAV2. En un ejemplo, la ITR puede ser una ITR de AAV2 con el tallo de corte reemplazado con el tallo de corte de ITR de AAV5, por ejemplo, la ITR de la SEQ ID NO: 22 o una secuencia modificada de la misma. En otro ejemplo, la ITR de AAV puede ser una ITR de AAV5 con el tallo de corte reemplazado por el tallo de corte de ITR de AAV2, por ejemplo, la ITR de la SEQ ID NO: 21 o una secuencia modificada de la misma.

En una realización de la divulgación, la secuencia de nucleótidos del elemento estructural puede ser modificada (por ejemplo, la modificación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o más nucleótidos o cualquier intervalo entre los mismos) para producir un elemento estructural sintético. En ciertas realizaciones, las ITR específicas ejemplificadas en el presente documento (SEQ ID NOs: 17-52) se pueden modificar (por ejemplo, modificando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o más nucleótidos o cualquier intervalo entre los mismos). En otras realizaciones, la ITR puede tener al menos 80% de identidad con una de las ITR de la SEQ ID NOs: 17-52, por ejemplo, con al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad. En una realización, el elemento estructural es un tallo de corte y la secuencia modificada es una secuencia de sitio de resolución terminal (trs) modificada. Por ejemplo, un tallo de corte se puede modificar para que comprenda el trs de ITR2 (GGT/TGG) o los trs de ITR5 (AGTG/TGG). En otra realización, el elemento estructural es un RBE o un RBE extendido y la secuencia está modificada en los nucleótidos responsables de la especificidad de unión. Por ejemplo, la secuencia de un RBE o un RBE extendido se puede modificar para hacer que la secuencia esté más cerca o más lejos de los sitios de unión de consenso GAGY reconocidos por Rep. En un ejemplo, el espaciador o RBE extendido se puede modificar para que comprenda uno o más repeticiones de GAGY exactas (por ejemplo, la ITR de la SEQ ID NO: 39 o una secuencia modificada de la misma), por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 o más repeticiones de GAGY exactas.

En una realización diferente de la descripción, la estructura del elemento estructural puede modificarse. Por ejemplo, el elemento estructural puede ser un tallo de corte y la modificación puede ser un cambio en la altura del tallo y/o el número de nucleótidos en el bucle. Por ejemplo, la altura del tallo puede ser de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 nucleótidos o más o cualquier intervalo entre los mismos. En una realización, la altura del tallo de corte puede ser de aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 9 nucleótidos e interactúa funcionalmente con Rep2. En otra realización, la altura del tallo de corte puede ser de aproximadamente 7 nucleótidos e interactúa funcionalmente con Rep5. En otro ejemplo, el bucle puede tener 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos o más o cualquier intervalo entre los mismos. En otro ejemplo, el elemento estructural puede ser un RBE o un RBE extendido y el número de sitios de unión a GAGY o sitios de unión relacionados con GAGY dentro del RBE o RBE extendido puede aumentarse o reducirse. En un ejemplo, el RBE o RBE extendido puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o más sitios de unión a GAGY o cualquier intervalo entre los mismos. Cada sitio de unión a GAGY puede ser independientemente una secuencia GAGY exacta o una secuencia similar a GAGY siempre que la secuencia sea suficiente para unir una proteína Rep.

En otra realización de la divulgación, el espaciado entre dos elementos (tal como el tallo de corte y el RBE o el RBE y una horquilla) puede alterarse (por ejemplo, aumentarse o disminuirse) para alterar la interacción funcional con una proteína Rep grande. Por ejemplo, el espaciado puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleótidos o más o cualquier entre los mismos. En una realización, el espaciador entre el tallo de corte y el RBE tiene aproximadamente 3 nucleótidos de longitud e interactúa funcionalmente con Rep2. En otra realización, el espaciador entre el tallo de corte y el RBE es de aproximadamente 3 nucleótidos (por ejemplo, la ITR de la SEQ ID NO: 34 o una secuencia modificada de la misma) hasta aproximadamente 21 nucleótidos de longitud (por ejemplo, la ITR de la SEQ ID NO: 37 o una secuencia modificada de la misma) e interactúa funcionalmente con Rep5. En una realización, el espaciador es el espaciador de 15 nucleótidos de la ITR de AAV5 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con la misma, por ejemplo, identidad de al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

En una realización representativa de la divulgación, el polinucleótido comprende al menos un ITR de parvovirus, en el que dicha ITR comprende: (a) un primer elemento estructural que interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande de uno o más de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 y AAV13, pero no interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande de AAV5; y (b) un segundo elemento estructural que interactúa funcionalmente con la proteína Rep grande de AAV5 pero que no interactúa funcionalmente con la proteína Rep grande de uno o más de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 y AAV13; en el que la ITR interactúa funcionalmente con una proteína Rep grande de AAV sintética que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOS: 79, 81 y 83.

En un aspecto de la presente divulgación, el polinucleótido que comprende la ITR modificada de la presente divulgación comprende además una segunda ITR que puede ser la misma o diferente de la primera ITR. En una realización, el polinucleótido comprende además un ácido nucleico heterólogo, por ejemplo, una secuencia que codifica una proteína o un ARN funcional. En algunas realizaciones, la segunda ITR no puede resolverse mediante la proteína Rep, es decir, dando como resultado un ADN viral de cadena doble.

La presente divulgación también proporciona un vector viral que comprende el polinucleótido que comprende la ITR modificada de la presente divulgación. El vector viral puede ser un vector de parvovirus, por ejemplo, un vector de AAV. La presente divulgación proporciona además una partícula de parvovirus recombinante (por ejemplo, una partícula de AAV recombinante) que comprende la ITR modificada de la presente divulgación. Los vectores virales y las partículas virales se discuten adicionalmente más adelante.

Proteínas Rep sintéticas

Un aspecto de la invención se refiere a proteínas Rep grandes sintéticas que interactúan funcionalmente con las ITR modificadas de la invención. Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una proteína Rep grande sintética que comprende elementos estructurales de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79. La forma en que se determinan los elementos estructurales se analiza a continuación. En una realización de la presente divulgación, el primer elemento estructural es un tallo de corte y la primera parte de la proteína Rep grande sintética funcional interactúa con el tallo de corte. En otra realización, el segundo elemento estructural es un espaciador, RBE o RBE extendido y la segunda porción de la proteína Rep grande sintética funcional interactúa con el espaciador, RBE o RBE extendida.

En una realización de la divulgación, una o más porciones de la proteína Rep grande sintética comprenden una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de una proteína Rep de parvovirus. En otra realización, una o más porciones de la proteína Rep grande sintética comprenden una secuencia de aminoácidos que se modifica en comparación con la secuencia de tipo silvestre de una proteína Rep de parvovirus. La modificación puede ser una adición, eliminación, sustitución o cualquier combinación de los mismos. La proteína Rep grande sintética puede comprender uno o más aminoácidos modificados, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 o 600 o más aminoácidos o cualquier intervalo entre los mismos.

En una realización de la presente divulgación, la primera y la segunda porciones (y/o la tercera porción) están directamente unidas entre sí. En otra realización, las porciones están conectadas por un enlazador, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o más aminoácidos. La proteína Rep grande sintética puede comprender porciones adicionales (por ejemplo, de Rep u otra proteína o secuencias sintéticas) que no están implicadas en la interacción funcional con una ITR. Los ejemplos de otras secuencias pueden incluir, sin limitación, señales de localización, etiquetas para aislamiento mejorado, etc.

En una realización de la divulgación, la primera porción de la proteína Rep grande sintética comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el residuo 97 hasta aproximadamente los residuos 146-151 de una secuencia Rep de AAV5 de tipo silvestre, por ejemplo, SEQ ID NO: 118. Por ejemplo, la primera porción puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia de aminoácidos de aproximadamente el residuo 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 hasta aproximadamente el residuo 146, 147, 148, 149, 151 o 151 de una secuencia de Rep de AAV5 de tipo silvestre o cualquier intervalo entre las mismas. En ciertas realizaciones, la primera porción comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia desde aproximadamente el residuo 97 hasta aproximadamente los residuos 146-151 de una secuencia Rep de AAV5 de tipo silvestre, por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad.

En una realización de la divulgación, la segunda porción de la proteína Rep grande sintética comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el residuo 149 hasta aproximadamente el residuo 187 de una secuencia de Rep de AAV2 de tipo silvestre, por ejemplo, la SEQ ID NO: 114. Por ejemplo, la segunda porción puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el residuo 149 hasta aproximadamente el residuo 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610 o 620 de una secuencia de Rep de AAV2 de tipo silvestre o cualquier intervalo entre las mismas. En ciertas realizaciones, la segunda porción comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia desde aproximadamente el residuo 149 hasta aproximadamente el residuo 187 de una secuencia de Rep de AAV5 de tipo silvestre, por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad.

En una realización representativa de la divulgación, de la proteína Rep grande sintética, la primera porción comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el residuo 97 hasta aproximadamente los residuos 146-151 de una secuencia de Rep de AAV5 de tipo silvestre y la segunda porción comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el residuo 149 hasta aproximadamente el residuo 187 de una secuencia de Rep de AAV2 de tipo silvestre. En otra realización representativa, la primera porción comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el residuo 1 hasta aproximadamente los residuos 146-151 de una secuencia de Rep de AAV5 de tipo silvestre y la segunda porción comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente el residuo 149 hasta aproximadamente el residuo 621 de una secuencia de Rep de AAV2 de tipo silvestre. En ciertas realizaciones, la proteína Rep grande sintética comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 81 y 83. En otras realizaciones, la proteína Rep grande sintética comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 79, 81 y 83, por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad.

En ciertas realizaciones de la divulgación, la porción de la proteína Rep grande sintética de una secuencia de Rep de AAV2 de tipo silvestre como se describió anteriormente se puede reemplazar con la porción correspondiente de otra proteína Rep de serotipo AAV humano distinta de AAV5, por ejemplo, AAV1, AAV3, AAV4, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o AAV13. La similitud estructural y funcional entre las proteínas Rep de AAV2 y otros serotipos humanos (con la excepción de AAV5) puede permitir la sustitución de secuencias de Rep entre los serotipos (véanse las Figuras 31 y 32).

En ciertas realizaciones, una o más de las porciones de las proteínas Rep sintéticas se pueden modificar para que difieran de la secuencia de tipo silvestre (por ejemplo, modificando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más aa o cualquier intervalo entre los mismos). En otras realizaciones, las proteínas Rep sintéticas ejemplificadas en este documento pueden ser modificadas (por ejemplo, modificando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más aa o cualquier intervalo entre los mismos). En algunas realizaciones, las proteínas Rep sintéticas modificadas retienen el aminoácido Y156 (numeración según Rep2). En otras realizaciones, las proteínas Rep sintéticas modificadas retienen los aminoácidos C151, N155 y/o T161 (numeración según Rep2). En otras realizaciones, las proteínas Rep sintéticas modificadas retienen los aminoácidos G148, A152 y/o V158 (numeración según Rep5). Estos aminoácidos específicos pueden ser importantes para la actividad y/o especificidad.

La invención también proporciona polinucleótidos (opcionalmente, polinucleótidos aislados) que codifican las proteínas Rep sintéticas de la invención. En algunas realizaciones, los polinucleótidos codifican adicionalmente una o más proteínas Cap de parvovirus. Además se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos y células

(*in vivo* o en cultivo) que comprenden los polinucleótidos y/o vectores de la invención. Los vectores adecuados incluyen, sin limitación, vectores virales (por ejemplo, adenovirus, AAV, virus del herpes, vacuna, virus de la viruela, baculovirus, virus de Epstein-Barr, y similares), plásmidos, fagos, YAC, BAC y similares. En algunas realizaciones, el polinucleótido está integrado de forma estable en el genoma de una célula. Dichos polinucleótidos, vectores y células pueden usarse, por ejemplo, como reactivos (por ejemplo, construcciones de empaquetamiento adyuvante o células de empaquetamiento) para la producción de vectores virales como se describe en este documento.

ITR de AAV de serpiente

- Un aspecto de la presente divulgación se refiere al descubrimiento de que una secuencia de ITR de AAV de serpiente puede funcionar como parte de un vector de parvovirus, aunque no es reconocida por las proteínas Rep de parvovirus de mamífero (por ejemplo, humano o de primates). La movilización del vector puede, por lo tanto, reducirse o evitarse. De este modo, un aspecto de la presente divulgación se refiere a una plantilla de parvovirus que comprende (i) una secuencia de nucleótidos heteróloga, y (ii) al menos una secuencia de ITR de AAV de serpiente. La secuencia de ITR de AAV serpiente puede ser de un AAV de pitón real. En una realización, la secuencia de ITR de AAV de serpiente comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 123. En una realización adicional, la secuencia ITR de AAV de serpiente comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 123 que se ha modificado (por ejemplo, modificando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o más nucleótidos o cualquier intervalo de la misma). En otras realizaciones, la plantilla de parvovirus comprende al menos una porción de una ITR de AAV de serpiente, por ejemplo, al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 o más nucleótidos contiguos de una ITR de AAV de serpiente o cualquier intervalo de la misma. En ciertas realizaciones, la plantilla de parvovirus comprende dos secuencias de ITR de AAV de serpiente.
- La presente divulgación se refiere además a una partícula de parvovirus que comprende la plantilla de parvovirus de serpiente de la presente divulgación. En ciertas realizaciones, la partícula de parvovirus comprende una cápside de mamífero, por ejemplo, una cápside humana o de primate.

- En un aspecto, la presente divulgación se refiere al descubrimiento de métodos para producir partículas de parvovirus que comprenden una ITR de AAV de serpiente, que incluyen el requerimiento de una proteína Rep pequeña de mamífero. Por tanto, un aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para producir una partícula de parvovirus, que comprende proporcionar a una célula (por ejemplo, una célula de mamífero tal como una célula humana o de primate) permisiva para la replicación de parvovirus: (a) una plantilla de parvovirus recombinante que comprende (i) una secuencia de nucleótidos heteróloga, y (ii) al menos una secuencia de ITR de AAV de serpiente; (b) un polinucleótido que codifica una o más proteínas Rep de AAV de serpiente y proteína o proteínas Cap de AAV de mamífero; y (c) un polinucleótido que codifica proteínas Rep52 y/o Rep40 de mamífero; en condiciones suficientes para la replicación y el empaquetamiento de la plantilla de parvovirus recombinante; por lo que se producen en la célula las partículas de parvovirus recombinante que empaquetan la plantilla de parvovirus recombinante. En una realización, la proteína Cap de AAV de mamífero es una proteína Cap de AAV humana o de primate. En otra realización, las proteínas Rep52 y/o Rep40 de AAV de mamífero son proteínas Rep52 y/o Rep40 humanas o de primate (incluyendo formas modificadas de las mismas), por ejemplo, de AAV2. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica la proteína Rep de AAV de serpiente y la proteína Cap de AAV de mamífero también codifica las proteínas Rep52 y/o Rep40 de mamífero. En otras realizaciones, el polinucleótido que codifica la proteína Rep de AAV de serpiente y la proteína Cap de AAV de mamífero está separado del polinucleótido que codifica las proteínas Rep52 y/o Rep40 de mamífero. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica la proteína Rep de AAV de serpiente y la proteína Cap de AAV de mamífero es el plásmido pSnRepCap2 (SEQ ID NO: 125).

- En otras realizaciones, pueden usarse otras secuencias de ITR de AAV no humanas no reconocidas por las proteínas Rep de los parvovirus humanos o de primates. Los ejemplos incluyen, sin limitación, secuencias de AAV de camarón, insecto, cabra, bovino, equino y canino.

Métodos de producción de vectores virales

- La presente divulgación proporciona además métodos para producir vectores virales. En una realización particular, la presente divulgación proporciona un método para producir una partícula de parvovirus recombinante, que comprende proporcionar a una célula permisiva para la replicación de parvovirus: (a) una plantilla de parvovirus recombinante que comprende (i) una secuencia de nucleótidos heteróloga, y (ii) la ITR de parvovirus modificada de la presente divulgación; (b) un polinucleótido que codifica una proteína Rep grande sintética de la presente divulgación; en condiciones suficientes para la replicación y el empaquetamiento de la plantilla de parvovirus recombinante; por lo cual se producen partículas de parvovirus recombinantes en la célula. Las condiciones suficientes para la replicación y el empaquetamiento de la plantilla de parvovirus recombinante pueden ser, por ejemplo, la presencia de secuencias de AAV suficientes para la replicación del molde de parvovirus y la encapsidación en cápsides de parvovirus (por ejemplo, secuencias de *rep* de parvovirus y secuencias de *cap* de parvovirus) y secuencias adyuvantes de adenovirus y/o virus del herpes. En realizaciones particulares, la plantilla de

parvovirus comprende dos secuencias de ITR de parvovirus, que están ubicadas en 5' y 3' con respecto a la secuencia heteróloga de ácido nucleico, aunque no necesitan estar directamente contiguas a la misma.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, la plantilla de parvovirus recombinante comprende una ITR que no se resuelve mediante Rep para elaborar vectores de AAV dúplex como se describe en la publicación internacional de patente WO 01/92551.

10 La plantilla de parvovirus y las secuencias de *rep* y *cap* de parvovirus se proporcionan en condiciones tales que el vector viral que comprende la plantilla de parvovirus empaquetada dentro de la cápside de parvovirus se produce en la célula. El método puede comprender además la etapa de recoger el vector viral de la célula. El vector viral se puede recoger del medio y/o mediante lisis de las células.

15 La célula puede ser una célula que es permisiva para la replicación viral de parvovirus. Se puede emplear cualquier célula adecuada conocida en la técnica. En realizaciones particulares, la célula es una célula de mamífero (por ejemplo, una célula de primate o humana). Como otra opción, la célula puede ser una línea celular de empaquetamiento complementario trans que proporciona funciones eliminadas de un virus adyuvante de replicación defectuosa, por ejemplo, células 293 u otras células E1a de complementación trans.

20 Las secuencias de replicación y de la cápside de parvovirus se pueden proporcionar mediante cualquier método conocido en la técnica. Los protocolos actuales típicamente expresan los genes *rep/cap* de parvovirus en un único plásmido. Las secuencias de replicación y empaquetamiento de parvovirus no necesitan proporcionarse juntas, aunque puede ser conveniente hacerlo. Las secuencias de *rep/cap* de parvovirus pueden ser proporcionadas por cualquier vector viral o no viral. Por ejemplo, se pueden proporcionar secuencias de *rep/cap* por un vector híbrido de adenovirus o virus del herpes (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un vector de adenovirus eliminado). Los vectores del EBV también se pueden emplear para expresar los genes *rep* y *cap* de parvovirus. Una ventaja de este método es que los vectores del EBV son episomales, pero mantendrán un alto número de copias a lo largo de sucesivas divisiones celulares (es decir, se integran de manera estable en la célula como elementos extracromosómicos, designados como un "episoma nuclear basado en EBV"; véase Margolski, (1992) Curr. Top. Microbiol. Immun. 158: 67).

30 Como una alternativa adicional, se pueden incorporar en forma estable en una célula secuencias de *rep/cap*.

Típicamente las secuencias de *rep/cap* de parvovirus no estarán flanqueadas por las TR, para evitar el rescate y/o el empaquetamiento de estas secuencias.

35 La plantilla de parvovirus se puede proporcionar a la célula usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la plantilla puede ser suministrada por un vector no viral (por ejemplo, plásmido) o viral. En realizaciones particulares, la plantilla de parvovirus es suministrada por un vector viral del herpes o adenovirus (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un adenovirus eliminado). Como otra ilustración, Palombo et al., (1998) J. Virology 72: 5025, describe un vector de baculovirus que porta un gen informador flanqueado por las TR de AAV. Los vectores del EBV también se pueden emplear para suministrar la plantilla, como se describió anteriormente con respecto a los genes *rep/cap*.

40 En otra realización representativa, la plantilla de parvovirus es proporcionada por un virus rAAV replicante. En aún otras realizaciones, un provirus AAV que comprende la plantilla de parvovirus está integrado de forma estable en el cromosoma de la célula.

45 Para mejorar los títulos de virus, pueden proporcionarse a la célula las funciones del virus adyuvante (por ejemplo, adenovirus o virus del herpes) que promueven una infección por parvovirus productiva.

50 Se conocen en la técnica secuencias de virus adyuvantes necesarias para la replicación de parvovirus. Típicamente, estas secuencias serán proporcionadas por un adenovirus adyuvante o un vector del virus del herpes. Alternativamente, las secuencias de adenovirus o virus del herpes pueden proporcionarse por otro vector viral o no viral, por ejemplo, como miniplásmido de adenovirus no infeccioso que porta todos los genes adyuvantes que promueven la producción eficiente de parvovirus como describen Ferrari et al., (1997) Nature Med. 3: 1295, y las patentes de Estados Unidos Nos. 6.040.183 y 6.093.570.

55 Además, las funciones del virus adyuvante pueden ser proporcionadas por una célula de empaquetamiento con las secuencias adyuvantes integradas en el cromosoma o mantenidas como un elemento extracromosómico estable. Generalmente, las secuencias de virus adyuvantes no se pueden empaquetar en viriones de parvovirus, por ejemplo, no están flanqueados por TR.

60 Los expertos en la materia apreciarán que puede ser ventajoso proporcionar la replicación de parvovirus y las secuencias de la cápside y las secuencias del virus adyuvante (por ejemplo, secuencias de adenovirus) en una única construcción adyuvante. Esta construcción adyuvante puede ser una construcción no viral o viral. Como una

65

ilustración no limitante, la construcción adyuvante puede ser un adenovirus híbrido o virus del herpes híbrido que comprende los genes *rep/cap* de parvovirus.

5 En una realización particular, las secuencias de *rep/cap* de parvovirus y las secuencias adyuvantes de adenovirus son suministradas por un único vector adyuvante de adenovirus. Este vector puede comprender adicionalmente la plantilla de parvovirus. Las secuencias de *rep/cap* de parvovirus y/o la plantilla de parvovirus se pueden insertar en una región eliminada (por ejemplo, las regiones E1a o E3) del adenovirus.

10 En una realización adicional, las secuencias de *rep/cap* de parvovirus y las secuencias adyuvantes de adenovirus se suministran por un solo vector adyuvante de adenovirus. De acuerdo con esta realización, la plantilla de parvovirus se puede proporcionar como una plantilla de plásmido.

15 En otra realización ilustrativa, las secuencias de *rep/cap* de parvovirus y las secuencias adyuvantes de adenovirus se proporcionan mediante un solo vector adyuvante de adenovirus, y la plantilla de parvovirus se integra en la célula como un provirus. Alternativamente, la plantilla de parvovirus es proporcionada por un vector del EBV que se mantiene dentro de la célula como un elemento extracromosómico (por ejemplo, como un episoma nuclear basado en EBV).

20 En una realización a modo de ejemplo adicional, las secuencias de *rep/cap* de parvovirus y las secuencias adyuvantes de adenovirus son proporcionadas por un único adyuvante de adenovirus. La plantilla de parvovirus se puede proporcionar como un vector viral de replicación separado. Por ejemplo, la plantilla de parvovirus puede proporcionarse mediante una partícula de parvovirus o una segunda partícula de adenovirus recombinante.

25 De acuerdo con los métodos anteriores, el vector de adenovirus híbrido comprende típicamente las secuencias cis de adenovirus 5' y 3' suficientes para la replicación y el empaquetamiento de adenovirus (es decir, las repeticiones terminales de adenovirus y la secuencia de PAC). Las secuencias de *rep/cap* de parvovirus y, si están presentes, la plantilla de parvovirus está incorporada en la cadena principal del adenovirus y está flanqueada por las secuencias cis 5' y 3', de modo que estas secuencias pueden empacarse en cápsides de adenovirus. Como se describió anteriormente, las secuencias adyuvantes de adenovirus y las secuencias de *rep/cap* de parvovirus generalmente no están flanqueadas por TR, de modo que estas secuencias no se empaquetan en los viriones de parvovirus.

30 Zhang et al., ((2001) Gene Ther. 18: 704-12) describen un adyuvante quimérico que comprende adenovirus y los genes *rep* y *cap* de AAV.

35 El virus del herpes también se puede usar como un virus adyuvante en los métodos de empaquetamiento de parvovirus. Los virus híbridos del herpes que codifican la proteína o proteínas Rep de parvovirus pueden facilitar ventajosamente esquemas de producción de vectores de parvovirus escalables. Se ha descrito un vector híbrido del virus del herpes simple tipo I (HSV-1) que expresa los genes *rep* y *cap* de AAV-2 (Conway et al., (1999) Gene Ther. 6: 986 y el documento WO 00/17377).

40 Como una alternativa adicional, los vectores virales de la presente divulgación se pueden producir en células de insecto usando vectores de baculovirus para administrar los genes *rep/cap* y la plantilla de parvovirus como lo describen, por ejemplo, Urabe et al., (2002) Human Gene Ther. 13: 1935-43.

45 Las reservas de vector de parvovirus libres de virus adyuvante contaminante se pueden obtener mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el virus de parvovirus y adyuvante se puede diferenciar fácilmente en función del tamaño. El parvovirus también puede separarse del virus adyuvante basándose en la afinidad por un sustrato de heparina (Zolotukhin et al. (1999) Gene Therapy 6: 973). Los virus adyuvantes de replicación defectuosa eliminados se pueden usar para que cualquier virus adyuvante contaminante no sea competente en la replicación.

50 Como una alternativa adicional, puede emplearse un adyuvante de adenovirus que carece de expresión génica tardía, ya que solo se requiere la expresión del gen temprano de adenovirus para mediar el empaquetamiento del parvovirus. Los mutantes de adenovirus defectuosos para la expresión génica tardía son conocidos en la técnica (por ejemplo, mutantes de adenovirus ts100K y ts149).

55 Vectores de virus recombinantes

Los vectores virales de la presente divulgación son útiles para la administración de ácidos nucleicos a células *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En particular, los vectores virales se pueden emplear ventajosamente para administrar o transferir ácidos nucleicos a animales, incluidos mamíferos, células.

60 Cualquier secuencia heteróloga de ácido nucleico de interés se puede administrar en los vectores virales de la presente divulgación. Los ácidos nucleicos de interés incluyen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos, incluyendo polipéptidos terapéuticos (por ejemplo, para usos médicos o veterinarios), inmunogénicos (por ejemplo, para vacunas) o de diagnóstico.

65

Los polipéptidos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), distrofina (que incluye mini y microdistrofinas (véase, por ejemplo, Vincent et al., (1993) Nature Genetics 5: 130; publicación de patente de Estados Unidos No. 2003/017131; publicación internacional WO/2008/088895, Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 13714-13719 (2000); y Gregorevic et al., Mol. Ther. 16: 657-64 (2008)), propéptido de miostatina, folistatina, receptor soluble de activina tipo II, IGF-1, polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante I κ B, sarcospan, utrofina (Tinsley et al., (1996) Nature 384: 349), mini-utrofina, factores de coagulación (por ejemplo, Factor VIII, Factor IX, Factor X, etc.), eritropoyetina, angioestatina, endostatina, catalasa, tirosina hidroxilasa, superóxido dismutasa, leptina, receptor de LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α_1 -antitripsina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosomal A, deshidrogenasa cetoácida de cadena ramificada, proteína RP65, citoquinas (por ejemplo, interferón α , interferón β , interferón γ , interleuquina 2, interleuquina 4, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, linfotóxina y similares), factores de crecimiento peptídicos, factores neurotróficos y hormonas (por ejemplo, somatropina, insulina, factores de crecimiento tipo insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico 3 y 4, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas morfogénicas óseas [que incluyen RANKL y VEGF], factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento transformante α y β , y similares), α -glucosidasa del ácido lisosómico, α -galactosidasa A, receptores (por ejemplo, el receptor soluble del factor α de crecimiento de la necrosis tumoral), S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que afecta al receptor quinasa tipo 2 desactivado acoplado a proteína G, tal como un bARKct constitutivamente activo truncado, factores antiinflamatorios tales como IRAP, proteínas antimioestatina, aspartoacilasa y anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de cadena sencilla; un ejemplo de Mab es el Mab Herceptin®). Otras secuencias ilustrativas de ácidos nucleicos heterólogos codifican productos genéticos suicidas (por ejemplo, timidina quinasa, citosina desaminasa, toxina diftérica y factor de necrosis tumoral), proteínas que confieren resistencia a un fármaco utilizado en la terapia del cáncer, productos génicos supresores de tumores (por ejemplo, P53, Rb, Wt-1), TRAIL, ligando de FAS y cualquier otro polipéptido que tenga un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesite. Los vectores de parvovirus también pueden usarse para administrar anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra miostatina (véase, por ejemplo, Fang et al., Nature Biotechnol., 23: 584-590 (2005)).

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

Alternativamente, en realizaciones particulares de la presente divulgación, el ácido nucleico heterólogo puede codificar un ácido nucleico antisentido, una ribozima (por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.877.022), ARN que efectúan un empalme de trans mediado por espliceosoma (véase, Puttaraju et al., (1999) Nature Biotech., 17: 246; patente de Estados Unidos No. 6.013.487; patente de Estados Unidos No. 6.083.702), ARN de interferencia (ARNi) que incluyen ARNpi, ARNph o miARN que median el silenciamiento génico (véase, Sharp et al., (2000) Science 287: 2431), y otros ARN no traducidos, tales como ARN "guía" (Gorman et al., (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 4929; patente de Estados Unidos No. 5.869.248 de Yuan et al.), y similares. Ejemplos de ARN no traducidos incluyen ARNi contra un producto génico de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (por ejemplo, para tratar y/o prevenir tumores y/o para administración al corazón para evitar daños por quimioterapia), ARNi contra miostatina (por ejemplo, para distrofia muscular de Duchenne), ARNi contra VEGF (por ejemplo, para tratar y/o prevenir tumores), ARNi contra fosfolamban (por ejemplo, para tratar enfermedades cardiovasculares, véase, por ejemplo, Andino et al., J. Gene Med. 10: 132-142 (2008) y Li et al., Acta Pharmacol Sin. 26: 51-55 (2005)); moléculas inhibitoras de fosfolamban o de dominancia negativa tales como fosfolamban S16E (por ejemplo, para tratar enfermedades cardiovasculares, véase, por ejemplo, Hoshijima et al., Nat. Med. 8: 864-871 (2002)), ARNi para adenosina quinasa (por ejemplo, para epilepsia), ARNi para un sarcoglicano [por ejemplo, α , β , γ], ARNi contra miostatina, propéptido de miostatina, folistatina o receptor soluble de activina tipo II, ARNi contra polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante I κ B y ARNi dirigido contra organismos y virus patógenos (por ejemplo, virus de la hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana, CMV, virus del herpes simple, virus del papiloma humano, etc.).

Alternativamente, en realizaciones particulares de la presente divulgación, el ácido nucleico heterólogo puede codificar el inhibidor de proteína fosfatasa I (I-1), serca2a, proteínas de dedo de zinc que regulan el gen de fosfolamban, Barkct, receptor β 2-adrenérgico, receptor quinasa β 2-adrenérgico (BARK), fosfoinositida-3 quinasa (PI3 quinasa), una molécula que afecta al receptor quinasa tipo 2 a acoplado a proteína G, tal como un bARKct constitutivamente activo truncado; calsarcina, ARNi contra fosfolamban; moléculas inhibitoras de fosfolamban o de dominancia negativa tales como fosfolamban S16E, enos, inos o proteínas morfogénicas óseas (que incluyen BNP2, 7, etc., RANKL y/o VEGF).

El vector viral también puede comprender un ácido nucleico heterólogo que comparte homología y se recombina con un locus en un cromosoma huésped. Este enfoque puede utilizarse, por ejemplo, para corregir un defecto genético en la célula huésped.

La presente divulgación también proporciona vectores virales que expresan un polipéptido inmunogénico, por ejemplo, para la vacunación. El ácido nucleico puede codificar cualquier inmunógeno de interés conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, inmunógenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia simia (SIV), virus de la influenza, VIH o proteínas gag del SIV, antígenos tumorales, antígenos del cáncer, antígenos bacterianos, antígenos virales y similares.

El uso de parvovirus como vectores de vacuna es conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, Miyamura et al., (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91: 8507; la patente de Estados Unidos No. 5.916.563 de Young et al., la Patente de Estados Unidos No. 5.905.040 de Mazzara et al., la patente de Estados Unidos No. 5.882.652, la patente de Estados Unidos No. 5.863.541 de Samulski et al.). El antígeno puede presentarse en la cápside de parvovirus. Alternativamente, el antígeno se puede expresar a partir de un ácido nucleico heterólogo introducido en un genoma de vector recombinante. Cualquier inmunógeno de interés como se describe en la presente memoria y/o como se conoce en la técnica puede proporcionarse mediante el vector viral de la presente divulgación.

Un polipéptido inmunogénico puede ser cualquier polipéptido adecuado para provocar una respuesta inmune y/o proteger al sujeto contra una infección y/o enfermedad, que incluye, pero no se limita a, infecciones y enfermedades por microbios, bacterias, protozoos, parásitos, hongos y/o virus. Por ejemplo, el polipéptido inmunogénico puede ser un inmunógeno de ortomixovirus (por ejemplo, un inmunógeno de virus de influenza, tal como la proteína de superficie de hemaglutinina (HA) del virus de la influenza o la nucleoproteína del virus de la influenza, o un inmunógeno del virus de influenza equina) o un inmunógeno de lentivirus (por ejemplo un inmunógeno del virus de la anemia infecciosa equina, un inmunógeno del virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) o un inmunógeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como la proteína GP160 de la envoltura del VIH o SIV, las proteínas de la matriz/cápside del VIH/SIV y los productos génicos *gag*, *pol* y *env* del VIH o SIV). El polipéptido inmunogénico también puede ser un inmunógeno de arenavirus (por ejemplo, inmunógeno del virus de la fiebre de Lassa, tal como la proteína de la nucleocápside del virus de la fiebre de Lassa y la glicoproteína de la envoltura de la fiebre de Lassa), un inmunógeno del virus de la viruela (por ejemplo, un inmunógeno del virus vacuna, tal como los productos del gen L1 o L8 del virus vacuna), un inmunógeno de flavivirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus de la fiebre amarilla o un inmunógeno de encefalitis japonesa), un inmunógeno de filovirus (por ejemplo, un inmunógeno de virus del Ebola o un inmunógeno de virus de Marburg, tal como productos génicos NP y GP), un inmunógeno de bunyavirus (por ejemplo, inmunógenos del virus RVFV, CCHF y/o SFS) o un inmunógeno de coronavirus (por ejemplo, un inmunógeno de coronavirus humano infeccioso, tal como la glucoproteína de envoltura de coronavirus humano, o un inmunógeno de virus de gastroenteritis transmisible porcina, o un inmunógeno del virus de la bronquitis infecciosa aviar). El polipéptido inmunogénico puede ser además un inmunógeno de polio, un inmunógeno de herpes (por ejemplo, inmunógenos de CMV, EBV, HSV) un inmunógeno de paperas, un inmunógeno de sarampión, un inmunógeno de rubéola, una toxina de difteria u otro inmunógeno de difteria, un antígeno de tos ferina, un inmunógeno de hepatitis (por ejemplo, de hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, etc.), y/o cualquier otro inmunógeno de vacuna ahora conocido en la técnica o identificado posteriormente como un inmunógeno.

Alternativamente, el polipéptido inmunogénico puede ser cualquier tumor o antígeno de célula cancerosa. Opcionalmente, el antígeno tumoral o cancerígeno se expresa en la superficie de la célula cancerosa. Los ejemplos de antígenos cancerosos y de células tumorales se describen en S. A. Rosenberg (Immunity 10: 281 (1991)). Otros antígenos cancerígenos y tumorales ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: producto del gen BRCA1, producto del gen BRCA2, gp100, tirosinasa, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, LAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β -catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE, SART-1, PRAME, p15, antígenos tumorales de melanoma (Kawakami et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3515; Kawakami et al., (1994) J. Exp. Med., 180: 347; Kawakami et al., (1994) Cancer Res. 54: 3124), MART-1, gp100 MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, CEA, TRP-1, TRP-2, P-15, tirosinasa (Brichard et al., (1993) J. Exp. Med. 178: 489); producto del gen HER-2/neu (patente de los Estados Unidos No. 4.968.603), CA 125, LK26, FB5 (endosialina), TAG 72, AFP, CA19-9, NSE, DU-PAN-2, CA50, SPan-1, CA72- 4, HCG, STN (antígeno sialil Tn), proteínas c-erbB-2, PSA, L-CanAg, receptor de estrógeno, globulina de grasa de leche, proteína supresora de tumor p53 (Levine, (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 623); antígenos de mucina (publicación internacional de patente No. WO 90/05142); telomerasas; proteínas nucleares de matriz; fosfatasa ácida prostática; antígenos del virus del papiloma; y/o antígenos ahora conocidos o posteriormente descubiertos como asociados con los siguientes cánceres: melanoma, adenocarcinoma, timoma, linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin), sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, leucemia, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro y cualquier otro cáncer o condición maligna ahora conocida o identificada posteriormente (véase, por ejemplo, Rosenberg, (1996) Ann. Rev. Med. 47: 481-91).

Como una alternativa adicional, el ácido nucleico heterólogo puede codificar cualquier polipéptido que se produzca deseablemente en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, los vectores virales pueden introducirse en células cultivadas y el producto del gen expresado aislado a partir de ellas.

Los expertos en la técnica entenderán que el ácido o los ácidos nucleicos heterólogos de interés pueden asociarse operativamente con secuencias de control apropiadas. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo puede asociarse operativamente con elementos de control de la expresión, tales como señales de control de transcripción/traducción,

orígenes de replicación, señales de poliadenilación, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), promotores y/o potenciadores, y similares.

5 Los expertos en la técnica apreciarán que puede usarse una variedad de elementos promotores/potenciadores dependiendo del nivel y la expresión deseada específica del tejido. El promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible, dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor/potenciador puede ser nativo o foráneo y puede ser una secuencia natural o sintética. Por foráneo, se pretende que la región de inicio de la transcripción no se encuentre en el huésped de tipo silvestre en el que se introduce la región de inicio de la transcripción.

10 En realizaciones particulares, los elementos promotores/potenciadores pueden ser nativos de la célula objetivo o sujetos a ser tratados. En realizaciones representativas, el elemento promotor/potenciador puede ser nativo de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. El elemento promotor/potenciador generalmente se elige para que funcione en la célula o células objetivo de interés. Además, en realizaciones particulares, el elemento promotor/potenciador es un elemento promotor/potenciador de mamífero. El elemento promotor/potenciador puede ser constitutivo o
15 inducible.

Los elementos inducibles de control de la expresión son típicamente ventajosos en aquellas aplicaciones en las que es deseable proporcionar regulación sobre la expresión de la secuencia o secuencias heterólogas de ácido nucleico. Los elementos promotores/potenciadores inducibles para la administración de genes pueden ser elementos
20 promotores/potenciadores preferidos o específicos del tejido e incluyen específicos o preferidos del músculo (incluidos los preferidos o específicos del músculo cardíaco, esquelético o liso), específicos o preferidos del tejido neural (incluido específicos o preferidos del cerebro), específicos o preferidos del ojo (incluidos específicos de la retina y específicos de la córnea), específicos o preferidos del hígado, específicos o preferidos de la médula ósea, específicos o preferidos del páncreas, específicos o preferidos del bazo, y elementos promotores/potenciadores
25 específicos o preferidos del pulmón. Otros elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen elementos inducibles por hormonas e inducibles por metales. Ejemplos de elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen, pero no se limitan a, un elemento de activación/desactivación de Tet, un promotor inducible por RU486, un promotor inducible por ecdisona, un promotor inducible por rapamicina y un promotor de metalotioneína.

30 En realizaciones en las que la secuencia o secuencias de ácido nucleico heterólogo se transcriben y luego se traducen en las células objetivo, generalmente se incluyen señales de iniciación específicas para la traducción eficiente de las secuencias insertadas de codificación de proteína. Estas secuencias exógenas de control de la traducción, que pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes, pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.
35

Los vectores virales de acuerdo con la presente divulgación proporcionan un medio para suministrar ácidos nucleicos heterólogos en una amplia gama de células, que incluyen células que se dividen y que no se dividen. Los vectores virales se pueden emplear para liberar un ácido nucleico de interés a una célula *in vitro*, por ejemplo, para producir un polipéptido *in vitro* o para terapia génica *ex vivo*. Los vectores virales son adicionalmente útiles en un
40 método para administrar un ácido nucleico a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, para expresar un polipéptido inmunogénico o terapéutico o un ARN funcional. De esta manera, el polipéptido o ARN funcional puede producirse *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede necesitar el polipéptido porque el sujeto tiene una deficiencia del polipéptido. Además, el método puede ponerse en práctica porque la producción del polipéptido o ARN funcional en el sujeto puede impartir algún efecto beneficioso.
45

Los vectores virales también se pueden usar para producir un polipéptido de interés o ARN funcional en células cultivadas o en un sujeto (por ejemplo, usando el sujeto como un biorreactor para producir el polipéptido o para observar los efectos del ARN funcional en el sujeto, por ejemplo, en relación con los métodos de selección).

50 En general, los vectores virales de la presente divulgación se pueden emplear para administrar un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido o ARN funcional para tratar y/o prevenir cualquier estado de enfermedad para el que es beneficioso administrar un polipéptido terapéutico o ARN funcional. Los estados patológicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: fibrosis quística (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística) y otras enfermedades del pulmón, hemofilia A (factor VIII), hemofilia B (factor IX), talasemia (β -globina), anemia (eritropoyetina) y otros trastornos sanguíneos, enfermedad de Alzheimer (GDF; neprililina), esclerosis múltiple (interferón β), enfermedad de Parkinson (factor neurotrófico derivado de la línea celular glial [GDNF]), enfermedad de Huntington (ARNi para eliminar las repeticiones), esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia (galanina, factores neurotróficos) y otros trastornos neurológicos, cáncer (endostatina, angiostatina, TRAIL, ligando FAS, citoquinas incluyendo interferones, ARNi incluyendo ARNi contra VEGF o el producto génico de resistencia a múltiples
60 medicamentos), diabetes mellitus (insulina), distrofias musculares que incluyen Duchenne (distrofina, mini-distrofina, factor de crecimiento I similar a la insulina, un sarcoglicano [por ejemplo, α , β , γ], ARNi contra miostatina, propéptido de miostatina, folistatina, receptor soluble de activina de tipo II, polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante de Ikappa B, sarcospan, utrofina, mini-utrofina, ARNi contra uniones de empalme en el gen de la distrofina para inducir omisión de exón [véase, por ejemplo, el documento WO/2003/095647], antisentido contra
65 ARNnp U7 para inducir omisión de exón [véase, por ejemplo, el documento WO/2006/021724], y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra miostatina o propéptido de miostatina) y enfermedad de Becker, enfermedad de

5 Gaucher (glucocerebrosidasa), enfermedad de Hurler (α -L-iduronidasa), deficiencia de adenosina desaminasa (adenosina desaminasa), enfermedades de almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, enfermedad de Fabry [α -galactosidasa] y enfermedad de Pompe [α -glucosidasa del ácido lisosómico]) y otros defectos metabólicos, enfisema congénito (α 1-antitripsina), síndrome de Lesch-Nyhan (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa), enfermedad de Niemann-Pick (esfingomielinasa), enfermedad de Tays Sachs (hexosaminidasa lisosómica A), enfermedad urinaria de jarabe de arce (deshidrogenasa cetoácida de cadena ramificada), enfermedades degenerativas de la retina (y otras enfermedades del ojo y retina, por ejemplo, PDGF para la degeneración macular), enfermedades de órganos sólidos tales como cerebro (incluida la enfermedad de Parkinson [GDNF], astrocitomas [endostatina, angiostatina y/o ARNi contra VEGF], glioblastomas [endostatina, angiostatina y/o ARNi contra VEGF]), hígado, riñón, corazón

10 incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad arterial periférica (PAD) (por ejemplo, administrando el inhibidor de la proteína fosfatasa I (I-1), serca2a, proteínas de dedos de zinc que regulan el gen fosfolamban, Barkct, receptor β 2-adrenérgico, receptor quinasa β 2-adrenérgico (BARK), fosfoinosítido-3 quinasa (PI3 quinasa), S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que afecta al receptor tipo quinasa tipo 2 desactivado acoplado a proteína G tal como un bARKct constitutivamente activo truncado; cal sarcina, ARNi contra fosfolamban; moléculas

15 inhibidoras de fosfolamban o de dominancia negativa tales como fosfolamban S16E, etc.), artritis (factores de crecimiento similares a la insulina), trastornos de las articulaciones (factor 1 y/o 2 de crecimiento similar a la insulina), hiperplasia de la íntima (por ejemplo, al administrar enos, inos), mejoramiento de la supervivencia de los trasplantes de corazón (superóxido dismutasa), SIDA (CD4 soluble), pérdida de masa muscular (factor de crecimiento I similar a la insulina), deficiencia renal (eritropoyetina), anemia (eritropoyetina), artritis (factores antiinflamatorios tales como IRAP y el receptor soluble del TNF α), hepatitis (interferón α), deficiencia del receptor de LDL (receptor de LDL), hiperamonemia (ornitina transcarbamilasa), enfermedad de Krabbe (galactocerebrosidasa), enfermedad de Batten, ataxias cerebro espinales incluyendo SCA1, SCA2 y SCA3, fenilcetonuria (fenilalanina hidroxilasa), enfermedades autoinmunes y similares. La presente divulgación puede utilizarse adicionalmente

20 después de un trasplante de órgano para aumentar el éxito del trasplante y/o reducir los efectos secundarios negativos del trasplante de órganos o terapias complementarias (por ejemplo, administrando agentes inmunosupresores o ácidos nucleicos inhibidores para bloquear la producción de citoquinas). Como otro ejemplo, las proteínas morfogénicas óseas (que incluyen BNP2, 7, etc., RANKL y/o VEGF) se pueden administrar con un aloinjerto óseo, por ejemplo, después de un corte o extracción quirúrgica en un paciente con cáncer.

30 La transferencia de genes tiene un uso potencial sustancial para comprender y proporcionar terapia para estados de enfermedad. Hay una serie de enfermedades hereditarias en las que se conocen genes defectuosos y se han clonado. En general, los estados de enfermedad anteriores se dividen en dos clases: estados de deficiencia, generalmente de enzimas, que generalmente se heredan de manera recesiva y estados desequilibrados, que pueden implicar proteínas reguladoras o estructurales, y que típicamente se heredan de manera dominante. Para las

35 enfermedades del estado de deficiencia, la transferencia génica se puede utilizar para llevar un gen normal a los tejidos afectados para la terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando mutaciones antisentido. Para estados de enfermedad desequilibrados, la transferencia de genes se puede utilizar para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que luego se puede utilizar en esfuerzos para contrarrestar el estado de la enfermedad. Por lo tanto, los vectores virales de acuerdo con la presente divulgación permiten el tratamiento y/o la prevención de enfermedades genéticas.

Los vectores virales de acuerdo con la presente divulgación también se pueden emplear para proporcionar un ARN funcional a una célula *in vitro* o *in vivo*. La expresión del ARN funcional en la célula, por ejemplo, puede disminuir la expresión de una proteína objetivo particular por la célula. En consecuencia, se puede administrar el ARN funcional

45 para disminuir la expresión de una proteína particular en un sujeto que lo necesita. El ARN funcional también puede administrarse a células *in vitro* para regular la expresión génica y/o la fisiología celular, por ejemplo, para optimizar sistemas de cultivo celulares o de tejidos o en métodos de selección.

Los vectores virales de acuerdo con la presente divulgación encuentran uso en métodos de diagnóstico y selección, por lo que un ácido nucleico de interés se expresa transitoria o establemente en un sistema de cultivo celular, o

50 alternativamente, un modelo animal transgénico.

Los vectores virales de la presente divulgación también se pueden usar para diversos fines no terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, uso en protocolos para evaluar el direccionamiento, eliminación, transcripción, traducción génica, etc., como sería evidente para un experto en la técnica. Los vectores virales también se pueden

55 usar para evaluar la seguridad (propagación, toxicidad, inmunogenicidad, etc.). Tales datos, por ejemplo, son considerados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos como parte del proceso regulatorio de aprobación antes de la evaluación de la eficacia clínica.

60 Como un aspecto adicional, los vectores virales de la presente divulgación se pueden usar para producir una respuesta inmune en un sujeto. De acuerdo con esta realización, se puede administrar a un sujeto un vector viral que comprende una secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico, y el sujeto monta una respuesta inmune activa contra el polipéptido inmunogénico. Los polipéptidos inmunogénicos son como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, se provoca una respuesta inmune protectora.

65

Alternativamente, el vector viral se puede administrar a una célula *ex vivo* y la célula alterada se administra al sujeto. El vector viral que comprende el ácido nucleico heterólogo se introduce en la célula, y la célula se administra al sujeto, donde el ácido nucleico heterólogo que codifica el inmunógeno puede expresarse e inducir una respuesta inmune en el sujeto frente al inmunógeno. En realizaciones particulares, la célula es una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una célula dendrítica).

Una "respuesta inmune activa" o "inmunidad activa" se caracteriza por la "participación de tejidos y células del huésped después de un encuentro con el inmunógeno. Implica diferenciación y proliferación de células inmunocompetentes en tejidos linforreticulares, que conducen a la síntesis de anticuerpos o el desarrollo de la reactividad mediada por células, o ambas cosas". Herbert B. Herscovitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, en IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). Alternativamente, el huésped monta una respuesta inmune activa después de la exposición a un inmunógeno por infección o por vacunación. La inmunidad activa se puede contrastar con la inmunidad pasiva, que se adquiere a través de la "transferencia de sustancias preformadas (anticuerpo, factor de transferencia, injerto tímico, interleuquina 2) de un huésped inmunizado activamente a un huésped no inmune". *Id.*

Una respuesta inmune "protectora" o inmunidad "protectora" como se usa en la presente memoria indica que la respuesta inmune confiere algún beneficio al sujeto en cuanto a que previene o reduce la incidencia de la enfermedad. Alternativamente, una respuesta inmune protectora o inmunidad protectora puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de enfermedades, en particular cáncer o tumores (por ejemplo, previniendo el cáncer o la formación de tumores, causando la regresión de un cáncer o tumor y/o previniendo metástasis y/o prevención del crecimiento de nódulos metastásicos). Los efectos protectores pueden ser completos o parciales, siempre que los beneficios del tratamiento superen cualquier desventaja de los mismos.

En realizaciones particulares, el vector viral o célula que comprende el ácido nucleico heterólogo se puede administrar en una cantidad inmunogénicamente eficaz, como se describe a continuación.

Los vectores virales de la presente divulgación también se pueden administrar para inmunoterapia del cáncer mediante la administración de un vector viral que expresa uno o más antígenos de células cancerosas (o una molécula inmunológicamente similar) o cualquier otro inmunógeno que produce una respuesta inmune contra una célula cancerosa. Para ilustrar, se puede producir una respuesta inmune contra un antígeno de célula cancerosa en un sujeto administrando un vector viral que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica el antígeno de célula cancerosa, por ejemplo para tratar a un paciente con cáncer y/o prevenir el desarrollo de cáncer en el sujeto. El vector viral se puede administrar a un sujeto *in vivo* o usando métodos *ex vivo*, como se describe en este documento. Alternativamente, el antígeno del cáncer puede expresarse como parte de la cápside del virus o bien estar asociado con la cápside del virus como se describió anteriormente.

Como otra alternativa, puede administrarse cualquier otro ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, ARNi) o polipéptido (por ejemplo, citoquina) conocido en la técnica para tratar y/o prevenir el cáncer.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "cáncer" abarca cánceres formadores de tumores. Del mismo modo, el término "tejido canceroso" abarca tumores. Un "antígeno de célula cancerosa" abarca antígenos tumorales.

El término "cáncer" tiene su significado entendido en la técnica, por ejemplo, un crecimiento incontrolado de tejido que tiene el potencial de extenderse a sitios distantes del cuerpo (es decir, metástasis). Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a melanoma, adenocarcinoma, timoma, linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin), sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, leucemia, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro y cualquier otro cáncer o condición maligna ahora conocida o identificada posteriormente. En realizaciones representativas, la presente divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir cánceres formadores de tumores.

El término "tumor" también se entiende en la técnica, por ejemplo, como una masa anormal de células indiferenciadas dentro de un organismo multicelular. Los tumores pueden ser malignos o benignos. En realizaciones representativas, los métodos descritos en este documento se usan para prevenir y tratar tumores malignos.

Por los términos "tratar el cáncer", "tratamiento del cáncer" y términos equivalentes se pretende que la gravedad del cáncer se reduzca o al menos se elimine parcialmente y/o que la progresión de la enfermedad se desacelere y/o controle y/o la enfermedad se estabilice. En realizaciones particulares, estos términos indican que la metástasis del cáncer se previene o se reduce o al menos se elimina parcialmente y/o que el crecimiento de nódulos metastásicos se previene o se reduce o al menos se elimina parcialmente.

Mediante los términos "prevención del cáncer" o "prevenir el cáncer" y términos equivalentes, se pretende que los métodos eliminen o reduzcan y/o retrasen, al menos parcialmente, la incidencia y/o gravedad del inicio del cáncer. De forma alternativa, el inicio del cáncer en el sujeto puede reducirse en probabilidad o potencia y/o retrasarse.

En realizaciones particulares, las células se pueden eliminar de un sujeto con cáncer y ponerse en contacto con un vector viral de acuerdo con la presente divulgación. La célula modificada se administra luego al sujeto, por lo que se provoca una respuesta inmune contra el antígeno de la célula cancerosa. Este método se puede emplear ventajosamente con sujetos inmunocomprometidos que no pueden montar una respuesta inmune suficiente *in vivo* (es decir, no pueden producir anticuerpos potenciadores en cantidades suficientes).

Se sabe en la técnica que las respuestas inmunitarias se pueden potenciar mediante citoquinas inmunomoduladoras (por ejemplo, interferón α , interferón β , interferón γ , interferón ω , interferón τ , interleuquina 1 α , interleuquina 1 β , interleuquina 2, interleuquina 3, interleuquina 4, interleuquina 5, interleuquina 6, interleuquina 7, interleuquina 8, interleuquina 9, interleuquina 10, interleuquina 11, interleuquina 12, interleuquina 13, interleuquina 14, interleuquina 18, factor de crecimiento de células B, ligando de CD40, factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , proteína 1 quimioatrayente de monocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos y linfoxina). En consecuencia, se pueden administrar las citoquinas inmunomoduladoras (preferiblemente, las citoquinas inductoras de CTL) a un sujeto junto con el vector viral.

Las citoquinas se pueden administrar mediante cualquier método conocido en la técnica. Pueden administrarse citoquinas exógenas al sujeto, o alternativamente, puede administrarse al sujeto un ácido nucleico que codifica una citoquina usando un vector adecuado, y la citoquina producida *in vivo*.

Sujetos, formulaciones farmacéuticas y modos de administración

Los vectores virales y cápsides de acuerdo con la presente divulgación encuentran uso tanto en aplicaciones veterinarias como médicas. Los sujetos adecuados incluyen tanto aves como mamíferos. El término "aviar" tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos, faisanes, loros, periquitos y similares. El término "mamífero" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, humanos, primates no humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos incluyen neonatos, lactantes, jóvenes y adultos.

En realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector y/o la cápside viral de la presente divulgación en un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, agentes estabilizantes, reguladores, vehículos, adyuvantes, diluyentes, etc. Para inyección, el portador típicamente será un líquido. Para otros métodos de administración, el vehículo puede ser sólido o líquido. Para la administración por inhalación, el vehículo será respirable y, opcionalmente, puede estar en forma de partículas sólidas o líquidas.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es tóxico o indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto sin causar ningún efecto biológico indeseable.

Un aspecto de la presente divulgación es un método para transferir un ácido nucleico a una célula *in vitro*. El vector viral se puede introducir en las células a la multiplicidad de infección adecuada de acuerdo con métodos de transducción convencionales adecuados para las células objetivo particulares. Los títulos de vector viral a administrar pueden variar, dependiendo del tipo y número de células objetivo, y del vector viral particular, y pueden ser determinados por los expertos en la materia sin una experimentación excesiva. En realizaciones representativas, al menos aproximadamente 10^3 unidades infecciosas, más preferiblemente al menos aproximadamente 10^5 unidades infecciosas se introducen en la célula.

La célula o células en la que se introduce el vector viral puede ser de cualquier tipo, incluidas, entre otras, las células neuronales (incluidas las células de los sistemas nervioso periférico y central, en particular, las células cerebrales, como las neuronas y los oligodendrocitos), células pulmonares, células del ojo (incluidas células de la retina, epitelio pigmentario de la retina y células de la córnea), células de los vasos sanguíneos (por ejemplo, células endoteliales, células intimales), células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales respiratorias y de intestino), células musculares (por ejemplo, células de músculo esquelético, células de músculo cardíaco, células de músculo liso y/o células de músculo de diafragma), células dendríticas, células pancreáticas (incluyendo células islotes), células hepáticas, células de riñón, células de miocardio, células óseas (por ejemplo, células madre de médula ósea), células madre hematopoyéticas, células del bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de próstata, células germinales y similares. En realizaciones representativas, la célula puede ser cualquier célula progenitora. Como una posibilidad adicional, la célula puede ser una célula madre (por ejemplo, célula madre neural, célula madre hepática). Como una alternativa más, la célula puede ser una célula cancerosa o una célula tumoral. Además, la célula puede ser de cualquier especie de origen, como se indicó anteriormente.

El vector viral se puede introducir en células *in vitro* con el fin de administrar la célula modificada a un sujeto. En realizaciones particulares, las células se han retirado de un sujeto, el vector viral se introduce en ellas, y las células se administran de nuevo al sujeto. En la técnica se conocen métodos para remover células del sujeto para la manipulación *ex vivo*, seguido por la introducción de nuevo en el sujeto (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.399.346). Alternativamente, el vector viral recombinante puede introducirse en células de un sujeto

donador, en células cultivadas, o en células de cualquier otra fuente adecuada, y las células se administran a un sujeto que lo necesita (es decir, un sujeto "receptor").

5 Las células adecuadas para la administración del gen *in vivo* son como se describió anteriormente. Las dosis de las células para administrar a un sujeto variarán según la edad, condición y especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico que expresa la célula, el modo de administración y similares. Típicamente, se administrarán al menos aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^8 células o al menos aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 células por dosis en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En realizaciones particulares, las células transducidas con el vector viral se administran al sujeto en una cantidad eficaz en una cantidad de tratamiento efectivo o prevención efectiva en combinación con un vehículo farmacéutico.

15 En algunas realizaciones, el vector viral se introduce en una célula y la célula se puede administrar a un sujeto para provocar una respuesta inmunogénica contra el polipéptido suministrado (por ejemplo, expresado como un transgén o en la cápside). Típicamente, se administra una cantidad de células que expresan una cantidad inmunogénicamente eficaz del polipéptido en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénicamente efectiva" es una cantidad del polipéptido expresado que es suficiente para provocar una respuesta inmune activa contra el polipéptido en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. En realizaciones particulares, la dosificación es suficiente para producir una respuesta inmune protectora (como se definió anteriormente). El grado de protección conferido no necesita ser completo o permanente, siempre que los beneficios de administrar el polipéptido inmunogénico superen cualquier desventaja de los mismos.

20 Un aspecto adicional de la presente divulgación es un método de administración del vector viral a sujetos. La administración de los vectores y/o cápsides de virus de acuerdo con la presente divulgación a un sujeto humano o a un animal que lo necesite puede ser por cualquier medio conocido en la técnica. Opcionalmente, el vector y/o la cápside viral se administran en una dosis eficaz de prevención o eficaz en el tratamiento en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Los vectores virales y/o cápsides de la presente divulgación pueden administrarse adicionalmente para provocar una respuesta inmunogénica (por ejemplo, como una vacuna). Típicamente, las composiciones inmunogénicas de la presente divulgación comprenden una cantidad inmunogénicamente eficaz de vector y/o la cápside viral en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la dosificación es suficiente para producir una respuesta inmune protectora (como se definió anteriormente). El grado de protección conferido no necesita ser completo o permanente, siempre que los beneficios de administrar el polipéptido inmunogénico superen cualquier desventaja de los mismos. Los sujetos e inmunógenos son como se describió anteriormente.

30 Las dosificaciones del vector y/o la cápside viral a administrar a un sujeto dependen del modo de administración, la enfermedad o afección a tratar y/o prevenir, la afección del sujeto individual, el vector viral o cápside particular, y el ácido nucleico a administrar, y similares, y se puede determinar de manera rutinaria. Los ejemplos de dosis para lograr efectos terapéuticos son títulos de al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} unidades transductoras, opcionalmente aproximadamente 10^8 - 10^{13} unidades de transducción.

35 En realizaciones particulares, se puede emplear más de una administración (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más administraciones) para alcanzar el nivel deseado de expresión génica durante un período de varios intervalos, por ejemplo, diario, semanal, mensual, anual, etc.

40 Los ejemplos de modos de administración incluyen oral, rectal, transmucosa, intranasal, inhalación (por ejemplo, a través de un aerosol), bucal (por ejemplo, sublingual), vaginal, intratecal, intraocular, transdérmica, intraendotelial, *in utero* (o *in ovo*), parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intracraneal, intramuscular [incluida la administración al esqueleto, diafragma y/o músculo cardíaco], intrapleural, intracerebral e intraarticular), tópica (por ejemplo, tanto a superficies de la piel y de la mucosa, incluidas las superficies de las vías respiratorias y administración transdérmica), intralinfática y similares, así como inyección directa al tejido u órgano (por ejemplo, al hígado, ojo, músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo del diafragma o cerebro).

45 La administración puede ser en cualquier sitio en un sujeto, incluyendo, sin limitación, un sitio seleccionado del grupo que consiste en el cerebro, un músculo esquelético, un músculo liso, el corazón, el diafragma, el epitelio de las vías respiratorias, el hígado, el riñón, el bazo, el páncreas, la piel y el ojo.

50 La administración también puede ser a un tumor (por ejemplo, en o cerca de un tumor o un nódulo linfático). La ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y la gravedad de la afección que se trata y/o previene y de la naturaleza del vector particular que se está utilizando.

55 La administración al músculo esquelético de acuerdo con la presente divulgación incluye, pero no se limita a, la administración al músculo esquelético en las extremidades (por ejemplo, parte superior del brazo, parte inferior del brazo, parte superior de la pierna y/o parte inferior de la pierna), espalda, cuello, cabeza (por ejemplo, lengua), tórax, abdomen, pelvis/perineo y/o dígitos. Los músculos esqueléticos adecuados incluyen, pero no se limitan a abductor digiti minimi (en la mano), abductor digiti minimi (en el pie), abductor hallucis, abductor ossis metatarsi quinti,

5 abductor pollicis brevis, abductor pollicis longus, adductor brevis, adductor hallucis, adductor longus, adductor magnus, adductor pollicis, anconeus, anterior scalene, articularis genus, biceps brachii, biceps femoris, brachialis, brachioradialis, buccinator, coracobrachialis, corrugator supercillii, deltoid, depressor anguli oris, depressor labii inferioris, digastric, dorsal interossei (en la mano), dorsal interossei (en el pie), extensor carpi radialis brevis, extensor carpi radialis longus, extensor carpi ulnaris, extensor digiti minimi, extensor digitorum, extensor digitorum brevis, extensor digitorum longus, extensor hallucis brevis, extensor hallucis longus, extensor indicis, extensor pollicis brevis, extensor pollicis longus, flexor carpi radialis, flexor carpi ulnaris, flexor digiti minimi brevis (en la mano), flexor digiti minimi brevis (en el pie), flexor digitorum brevis, flexor digitorum longus, flexor digitorum profundus, flexor digitorum superficialis, flexor hallucis brevis, flexor hallucis longus, flexor pollicis brevis, flexor pollicis longus, frontalis, 10 gastrocnemius, geniohyoid, gluteus maximus, gluteus medius, gluteus minimus, gracilis, iliocostalis cervicis, iliocostalis lumborum, iliocostalis thoracis, iliacus, inferior gemellus, inferior oblique, inferior rectus, infraspinatus, interspinalis, intertransversi, lateral pterygoid, lateral rectus, latissimus dorsi, levator anguli oris, levator labii superioris, levator labii superioris alaeque nasi, levator palpebrae superioris, levator scapulae, long rotators, longissimus capitis, longissimus cervicis, longissimus thoracis, longus capitis, longus colli, lumbricals (en la mano), lumbricals (en el pie), masseter, medial pterygoid, medial rectus, middle scalene, multifidus, mylohyoid, obliquus capitis inferior, obliquus capitis superior, obturator externus, obturator internus, occipitalis, omohyoid, opponens digiti minimi, opponens pollicis, orbicularis oculi, orbicularis oris, palmar interossei, palmaris brevis, palmaris longus, pectineus, pectoralis major, pectoralis minor, peroneus brevis, peroneus longus, peroneus tertius, piriformis, plantar interossei, plantaris, platysma, popliteus, posterior scalene, pronator quadratus, pronator teres, psoas major, 20 quadratus femoris, quadratus plantae, rectus capitis anterior, rectus capitis lateralis, rectus capitis posterior major, rectus capitis posterior minor, rectus femoris, rhomboid major, rhomboid minor, risorius, sartorius, scalenus minimus, semimembranosus, semispinalis capitis, semispinalis cervicis, semispinalis thoracis, semitendinosus, serratus anterior, short rotators, soleus, spinalis capitis, spinalis cervicis, spinalis thoracis, splenius capitis, splenius cervicis, sternocleidomastoid, sternohyoid, sternothyroid, stylohyoid, subclavius, subscapularis, superior gemellus, superior oblique, superior rectus, supinator, supraspinatus, temporalis, tensor fascia lata, teres major, teres minor, thoracis, thyrohyoid, tibialis anterior, tibialis posterior, trapezius, triceps brachii, vastus intermedius, vastus lateralis, vastus medialis, zygomaticus major, y zygomaticus minor, y cualquier otro músculo esquelético adecuado como se conoce en la técnica.

30 El vector viral puede administrarse al músculo esquelético mediante administración intravenosa, administración intraarterial, administración intraperitoneal, perfusión en una extremidad (opcionalmente, perfusión aislada en una pierna y/o brazo, véase, por ejemplo, Aruda et al., (2005) Blood 105: 3458-3464) y/o inyección intramuscular directa. En realizaciones particulares, el vector y/o la cápside viral se administra a una extremidad (brazo y/o pierna) de un sujeto (por ejemplo, un sujeto con distrofia muscular tal como DMD) mediante perfusión en una extremidad, 35 opcionalmente perfusión aislada en una extremidad (por ejemplo, mediante administración intravenosa o intraarterial). En formas de realización de la presente divulgación, los vectores y/o cápsides virales de la presente divulgación pueden administrarse ventajosamente sin emplear técnicas "hidrodinámicas". La administración tisular (por ejemplo, al músculo) de vectores de la técnica anterior es a menudo potenciado por técnicas hidrodinámicas (por ejemplo, administración intravenosa/intraarterial en un gran volumen), que aumentan la presión en la 40 vasculatura y facilitan la capacidad del vector para cruzar la barrera de células endoteliales. En realizaciones particulares, los vectores y/o cápsides virales de la presente divulgación se puede administrar en ausencia de técnicas hidrodinámicas tales como infusiones de alto volumen y/o presión intravascular elevada (por ejemplo, presión sistólica mayor a la normal, por ejemplo, menor o igual a un aumento del 5%, 10%, 15%, 20%, 25% de la presión intravascular sobre la presión sistólica normal). Dichos métodos pueden reducir o evitar los efectos 45 secundarios asociados con técnicas hidrodinámicas tales como edema, daño a los nervios y/o síndrome compartimental.

La administración al músculo cardíaco incluye administración a la aurícula izquierda, aurícula derecha, ventrículo izquierdo, ventrículo derecho y/o el tabique. El vector y/o la cápside viral pueden administrarse al músculo cardíaco mediante administración intravenosa, administración intraarterial tal como administración intraaórtica, inyección cardíaca directa (por ejemplo, en la aurícula izquierda, aurícula derecha, ventrículo izquierdo, ventrículo derecho), y/o perfusión de la arteria coronaria.

La administración al músculo del diafragma puede realizarse por cualquier método adecuado que incluya administración intravenosa, administración intraarterial y/o administración intraperitoneal.

La administración al músculo liso puede realizarse mediante cualquier método adecuado que incluya administración intravenosa, administración intraarterial y/o administración intraperitoneal. En una realización, la administración puede ser a células endoteliales presentes en, cerca y/o sobre el músculo liso.

La administración a un tejido objetivo también se puede lograr administrando un depósito que comprende el vector y/o la cápside viral. En realizaciones representativas, un depósito que comprende el vector y/o la cápside viral se implanta en tejido de músculo esquelético, liso, cardíaco y/o de diafragma o el tejido puede ponerse en contacto con una película u otra matriz que comprende el vector y/o la cápside viral. Tales matrices o sustratos implantables se describen en la patente de los Estados Unidos No. 7.201.898.

En realizaciones particulares, un vector viral de acuerdo con la presente divulgación se administra a músculo esquelético, músculo de diafragma y/o músculo cardíaco (por ejemplo, para tratar y/o prevenir distrofia muscular o enfermedad cardíaca [por ejemplo, PAD o insuficiencia cardíaca congestiva]).

- 5 En realizaciones representativas, la presente divulgación se usa para tratar y/o prevenir trastornos del músculo esquelético, cardíaco y/o del diafragma.

10 En una realización representativa, la presente divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir la distrofia muscular en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: administrar una cantidad efectiva de tratamiento o prevención de un vector viral de la presente divulgación a un sujeto mamífero, en el que el vector viral comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica distrofina, una minidistrofina, una microdistrofina, un propéptido de miostatina, folistatina, un receptor soluble de activina tipo II, IGF-1, polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante Ikappa B, sarcospan, utrofina, una microdistrofina, laminina- α 2, α -sarcoglicano, β -sarcoglicano, γ -sarcoglicano, δ -sarcoglicano, IGF-1, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra la miostatina o propéptido de miostatina, y/o ARNi contra la miostatina. En realizaciones particulares, el vector viral se puede administrar a músculo esquelético, de diafragma y/o cardíaco como se describe en otra parte de este documento.

15 Alternativamente, la presente divulgación puede ponerse en práctica para suministrar un ácido nucleico al músculo esquelético, cardíaco o diafragma, que se usa como una plataforma para la producción de un polipéptido (por ejemplo, una enzima) o ARN funcional (por ejemplo, ARNi, microARN), ARN antisentido) que normalmente circula en la sangre o para administración sistémica a otros tejidos para tratar y/o prevenir un trastorno (por ejemplo, un trastorno metabólico, como diabetes (por ejemplo, insulina), hemofilia (por ejemplo, Factor IX o Factor VIII), un trastorno mucopolisacárido (por ejemplo, síndrome de Sly, síndrome de Hurler, síndrome de Scheie, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Hunter, síndrome A, B, C, D, de Sanfilippo, síndrome de Morquio, síndrome de Maroteaux-Lamy, etc.) o un trastorno por almacenamiento lisosómico (tal como enfermedad de Gaucher [glucocerebrosidasa], enfermedad de Pompe [α -glucosidasa del ácido lisosómico] o enfermedad de Fabry [α -galactosidasa A]) o un trastorno del almacenamiento de glucógeno (tal como la enfermedad de Pompe [α -glucosidasa del ácido lisosómico]). Otras proteínas adecuadas para el tratamiento y/o prevención de trastornos metabólicos se describieron anteriormente. El uso de músculo como plataforma para expresar un ácido nucleico de interés se describe en la publicación de la patente de Estados Unidos No. 2002/0192189.

20 Por lo tanto, como un aspecto, la presente divulgación abarca además un método para tratar y/o prevenir un trastorno metabólico en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método: administrar una cantidad efectiva para tratamiento o prevención de un vector viral de la presente divulgación a un sujeto (por ejemplo, al músculo esquelético de un sujeto), en donde el vector viral comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido, en donde el trastorno metabólico es el resultado de una deficiencia y/o defecto en el polipéptido. En la presente memoria se describen trastornos metabólicos ilustrativos y ácidos nucleicos heterólogos que codifican polipéptidos. Opcionalmente, el polipéptido se secreta (por ejemplo, un polipéptido que es un polipéptido secretado en su estado nativo o que se ha diseñado para ser secretado, por ejemplo, mediante asociación operativa con una secuencia de señal secretora como se conoce en la técnica). Sin estar limitado por ninguna teoría particular de la presente divulgación, de acuerdo con esta realización, la administración al músculo esquelético puede dar como resultado la secreción del polipéptido en la circulación sistémica y la administración al tejido o tejidos objetivo. Los métodos para administrar vectores virales al músculo esquelético se describen con más detalle en el presente documento.

25 La presente divulgación también puede ponerse en práctica para producir ARN antisentido, ARNi u otro ARN funcional (por ejemplo, una ribozima) para la administración sistémica.

30 La presente divulgación también proporciona un método para tratar y/o prevenir la insuficiencia cardíaca congénita o PAD en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad efectiva para tratamiento o prevención de un vector viral de la presente divulgación a un sujeto mamífero, en donde el vector viral comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica, por ejemplo, una Ca^{2+} -ATPasa en el endoretículo sarcoplasmático (SERCA2a), un factor angiogénico, inhibidor I de fosfatasa (I-1), ARNi contra fosfolamban; una molécula inhibidora de fosfolamban o de dominancia negativa tal como fosfolamban S16E, una proteína de dedo de zinc que regula el gen de fosfolamban, receptor β 2-adrenérgico, receptor quinasa β 2-adrenérgico (BARK), PI3 quinasa, calsarcáno, un inhibidor del receptor quinasa β -adrenérgico (β BARKct), inhibidor 1 de proteína fosfatasa 1, S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que afecta al receptor quinasa tipo 2 acoplado a proteína G desactivado, tal como un bARKct constitutivamente activo truncado, Pim-1, PGC-1 α , SOD-1, SOD-2, EC-SOD, caliceína, HIF, timosina- β 4, mir-1, mir-133, mir-206 y/o mir-208.

35 Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Alternativamente, se puede administrar el vector viral y/o las cápsides virales de la presente divulgación de una forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación sostenida. Además, el vector viral y/o la cápside viral se pueden administrar adheridos a una matriz implantable quirúrgicamente (por ejemplo, tal como se describe en la publicación de la patente de Estados Unidos No. 2004-0013645).

Los vectores virales descritos en este documento pueden administrarse a los pulmones de un sujeto por cualquier medio adecuado, opcionalmente administrando una suspensión en aerosol de partículas respirables compuestas de los vectores virales y/o cápsides virales, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores virales y/o las cápsides virales se pueden producir por cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador de aerosol accionado a presión o un nebulizador ultrasónico, como es conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.501.729. Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden los vectores y/o cápsides virales se pueden producir igualmente con cualquier generador de aerosol del medicamento en partículas sólidas, mediante técnicas conocidas en la técnica farmacéutica.

Los vectores virales se pueden administrar a tejidos del SNC (por ejemplo, cerebro, ojo) y pueden dar lugar ventajosamente a una distribución más amplia del vector o la cápside viral que la que se observaría en ausencia de la presente divulgación.

En realizaciones particulares, los vectores de administración de la presente divulgación se pueden administrar para tratar enfermedades del SNC, que incluyen trastornos genéticos, trastornos neurodegenerativos, trastornos psiquiátricos y tumores. Las enfermedades ilustrativas del SNC incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Canavan, enfermedad de Leigh, enfermedad de Refsum, síndrome de Tourette, esclerosis lateral primaria, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Pick, distrofia muscular, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Binswanger, traumatismo debido a lesión de la médula espinal o la cabeza, enfermedad de Tay Sachs, enfermedad de Lesch-Nyan, epilepsia, infartos cerebrales, trastornos psiquiátricos incluyendo trastornos del estado de ánimo (por ejemplo, depresión, trastorno afectivo bipolar, trastorno afectivo persistente, trastorno secundario del estado de ánimo), esquizofrenia, farmacodependencia (por ejemplo, alcoholismo y otras dependencias de sustancias), neurosis (por ejemplo, ansiedad, trastorno obsesivo, trastorno somatoforme, trastorno disociativo, aflicción, depresión posparto), psicosis (por ejemplo, alucinaciones y delirios), demencia, paranoia, trastorno por déficit de atención, trastornos psicosexuales, trastornos del sueño, trastornos del dolor, trastornos alimentarios o de peso (por ejemplo, obesidad, caquexia, anorexia nerviosa y bulimia) y cánceres y tumores (por ejemplo, tumores pituitarios) del SNC.

Los trastornos del SNC incluyen trastornos oftálmicos que implican la retina, el tracto posterior y el nervio óptico (por ejemplo, retinitis pigmentosa, retinopatía diabética y otras enfermedades degenerativas retinianas, uveítis, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma).

La mayoría, si no todas, las enfermedades y trastornos oftálmicos están asociados con uno o más de tres tipos de indicaciones: (1) angiogénesis, (2) inflamación y (3) degeneración. Los vectores de administración de la presente divulgación se pueden emplear para administrar factores antiangiogénicos; factores antiinflamatorios; factores que retardan la degeneración celular, promueven la preservación celular o promueven el crecimiento celular y combinaciones de los anteriores.

La retinopatía diabética, por ejemplo, se caracteriza por angiogénesis. La retinopatía diabética se puede tratar administrando uno o más factores anti-angiogénicos ya sea en forma intraocular (por ejemplo, en el humor vítreo) o en forma periocular (por ejemplo, en la región sub-Tenon). Uno o más factores neurotróficos también pueden administrarse conjuntamente, en forma intraocular (por ejemplo, en forma intravítrea) o en forma periocular.

La uveítis implica inflamación. Se pueden administrar uno o más factores antiinflamatorios mediante administración intraocular (por ejemplo, cámara vítrea o anterior) de un vector de administración de la presente divulgación.

La retinitis pigmentosa, en comparación, se caracteriza por la degeneración retiniana. En realizaciones representativas, la retinitis pigmentosa se puede tratar mediante administración intraocular (por ejemplo, administración vítrea) de un vector de administración que codifica uno o más factores neurotróficos.

La degeneración macular relacionada con la edad implica tanto la angiogénesis como la degeneración retiniana. Este trastorno se puede tratar administrando los vectores de suministro de la invención que codifican uno o más factores neurotróficos en forma intraocular (por ejemplo, vítrea) y/o uno o más factores antiangiogénicos en forma intraocular o periocular (por ejemplo, en la región sub-Tenon).

El glaucoma se caracteriza por una mayor presión ocular y pérdida de células ganglionares de la retina. Los tratamientos para el glaucoma incluyen la administración de uno o más agentes neuroprotectores que protegen las células del daño excitotóxico usando los vectores de administración de la invención. Dichos agentes incluyen antagonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA), citoquinas y factores neurotróficos, administrados en forma intraocular, opcionalmente por vía intravítrea.

En otras realizaciones, la presente divulgación se puede usar para tratar convulsiones, por ejemplo, para reducir el inicio, la incidencia o la gravedad de las convulsiones. La eficacia de un tratamiento terapéutico para las convulsiones se puede evaluar mediante medios conductuales (por ejemplo, temblores, tics del ojo o la boca) y/o

electrográficos (la mayoría de las convulsiones tienen anomalías electrográficas características). Por lo tanto, la presente divulgación también puede usarse para tratar la epilepsia, que está marcada por múltiples ataques a lo largo del tiempo.

5 En una realización representativa, se administra somatostatina (o un fragmento activo de la misma) al cerebro usando un vector de administración de la presente divulgación para tratar un tumor pituitario. De acuerdo con esta realización, el vector de administración que codifica la somatostatina (o un fragmento activo de la misma) se administra mediante microinfusión en la pituitaria. Asimismo, dicho tratamiento se puede usar para tratar la acromegalia (secreción anormal de la hormona del crecimiento de la pituitaria). Las secuencias de ácido nucleico
10 (por ejemplo, número de acceso del GenBank J00306) y aminoácidos (por ejemplo, número de acceso del GenBank P01166; contiene los péptidos activos procesados somatostatina-28 y somatostatina-14) de somatostatinas como se conocen en la técnica.

15 En realizaciones particulares, el vector puede comprender una señal secretora como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 7.071.172.

En realizaciones representativas de la presente divulgación, el vector viral y/o la cápside viral se administran al SNC (por ejemplo, al cerebro o al ojo). El vector y/o la cápside viral se pueden introducir en la médula espinal, tronco encefálico (médula oblonga, puente de Varolio), cerebro medio (hipotálamo, tálamo, epitálamo, glándula pituitaria, sustancia negra, glándula pineal), cerebelo, telencéfalo (cuerpo estriado, cerebro incluidos los lóbulos occipital, temporal, parietal y frontal, corteza, ganglios basales, hipocampo y portaamígdala), sistema límbico, neocorteza, cuerpo estriado, cerebro y foliculo inferior. El vector y/o la cápside viral también pueden administrarse a diferentes regiones del ojo, como la retina, la córnea y/o el nervio óptico.

25 El vector y/o la cápside viral pueden administrarse en el fluido cerebroespinal (por ejemplo, mediante punción lumbar) para una administración más dispersa del vector de suministro. El vector y/o la cápside viral se pueden administrar además en forma intravascular al SNC en situaciones en las que la barrera hematoencefálica se ha alterado (por ejemplo, tumor cerebral o infarto cerebral).

30 El vector y/o la cápside viral se puede administrar a la región o regiones deseadas del SNC por cualquier ruta conocida en la técnica, que incluye, pero no se limita a, intratecal, intraocular, intracerebral, intraventricular, intravenosa (por ejemplo, en presencia de un azúcar tal como el manitol), intranasal, intraaural, intraocular (por ejemplo, intravítrea, subretiniana, cámara anterior) y periocular (por ejemplo, región de sub-Tenon) también como administración intramuscular con administración retrógrada a las neuronas motoras.

35 En realizaciones particulares, el vector y/o la cápside viral se administran en una formulación líquida por inyección directa (por ejemplo, inyección estereotáctica) a la región o compartimento deseado en el SNC. En otras realizaciones, el vector y/o la cápside viral pueden proporcionarse por aplicación tópica a la región deseada o por administración intranasal de una formulación de aerosol. La administración al ojo puede ser por aplicación tópica de gotitas de líquido. Como alternativa adicional, el vector y/o la cápside viral se pueden administrar como una formulación sólida de liberación lenta (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 7.201.898).

40 En otras realizaciones adicionales, el vector viral puede usarse para transporte retrógrado para tratar y/o prevenir enfermedades y trastornos que implican neuronas motoras (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular espinal (SMA), etc.). Por ejemplo, el vector viral puede ser entregado al tejido muscular desde el cual puede migrar hacia las neuronas.

45 Habiendo descrito la presente divulgación, la misma se explicará con mayor detalle en los siguientes ejemplos, que se incluyen en este documento solo a título ilustrativo, y que no pretenden ser limitativos de la presente divulgación.

50 Ejemplo 1

Materiales y métodos

55 Clonación de Rep: plásmidos adyuvantes de AAV pXR2 (Rep2Cap2) y pRep5Cap2 sirvieron como plantillas para la clonación de Rep. Las secuencias cebadoras usadas se indican en la Tabla 4. Se usaron dos estrategias de clonación. Los sitios de restricción existentes se incorporaron en cebadores para PCR (PCR-RD en la Tabla 4) utilizando cebadores pXR directos de salida o pXR inversos de salida. Se utilizó ADN polimerasa PfuTurbo (Stratagene, La Jolla, CA) según las recomendaciones del fabricante para todas las reacciones de PCR. Los productos de PCR-RD se digirieron con las enzimas indicadas en la Tabla 4 (NEB, Ipswich, MA) antes de la ligación con ADN ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Alternativamente, se usó un enfoque de PCR mediado por superposición-extensión (OE-PCR) para producir quimeras de Rep (Higuchi et al., (1988) Nucleic Acids Res. 16: 7351). La unión de Rep2 y Rep5 se incorporó en cebadores directos e inversos que se usaron en reacciones de PCR separadas con los cebadores pXR directo e inverso de salida (Tabla 4, solo se indicaron los oligos directos, oligos inversos complementarios a los directos). Estos productos de PCR superpuestos se combinaron en una sola reacción de PCR y se ciclaron de la siguiente manera: 1 ciclo a 94°C durante 30

segundos, 18 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 4 minutos a 72°C, 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Se usó 1 µL de esta reacción como plantilla para una PCR anidada con el pXR en los cebadores directo e inverso de entrada. Las quimeras con el N-terminal de Rep2 y el C-terminal de Rep5 se clonaron en la construcción de Rep25aa166 entre los sitios de *PpuMI* y *MfeI*. Las quimeras con el N-terminal de Rep5 y C-terminal de Rep2 se clonaron en la construcción 52aa160 entre los sitios *PpuMI* y *BstBI*. Todos los constructos se verificaron mediante secuenciación de ADN en las Instalaciones de Análisis Genómico de UNC-CH.

5

Tabla 4

Clon / cebador	Método de clonación	Orientación	Secuencia	SEQ ID NO
pXR directo de salida		Directa	5' CGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACC	126
pXR directo de entrada		Directa	5' TCGAATTCGACGGCCAGTGAATGTAAATACGACTC	127
pXR inverso de salida		Inversa	5' CCATGATTACGCCAAGCTCGGAATTAACCGCATGCGA	128
pXR inverso de entrada		Inversa	5' CCATGGCCGGCCCGGATTACCC	129
Rep52aa84	PCR-RD <i>AleI</i>	Inversa	5' TTCACCCGGTGGTTCCACGAGCAGCGTGCATGTGGAAAGTAGCTCTCTCCCTTTTCAAACTGCACAAAAG	130
Rep52aa110	PCR-RD <i>EagI</i>	Directa	5' CCTCGCCCGTACGTGAGTACAGATTCGGGAAAAC TGATTCAGAG	131
Rep52aa126	OE PCR	Directa	5' GTGGCTTCCAGGAAATGAACCCACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGGTC	132
Rep52aa138	OE PCR	Directa	5' CTGGGTCGCCATCACAAAGGTAAAGGAAAGGGGGAACAAAGGTGGTGGATGAG	133
Rep52aa146	OE PCR	Directa	5' GCGGAGCCAAATAGGTGTGGATGAGTGCTACATCCCAATTACTTGCCTC	134
Rep52aa160	PCR-RD <i>Bpu10I</i>	Inversa	5' ACTGGAGCTCAGGTGGACCTTCGGCAGCAGGTAG	135
Rep52aa175	OE PCR	Directa	5' CGTGGACAAAACCTGGACGAGTATAAATGGCCGTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAAC	136
Rep52aa187	OE PCR	Directa	5' CTGAATCTGGAGAGCGCAACGCGTGGTGGCCGACGATCTGACGGCAC	137
Rep52aa207	PCR-RD <i>SgrAI</i>	Inversa	5' GATCACCGGGCATCCGAGAACTCACGCTCGGAAGC	138
Rep25aa77	OE PCR	Directa	5' TAAGGCCCGGAGGCCCTTTCTTTGTGCAGTTTGAAAAGGGATCTG	139
Rep25aa97	OE PCR	Directa	5' CCACATGCACGTGCTCGTGGAAAACCTCCGGCACTCTCCATGGTCCCTCG	140
Rep25aa116	PCR-RD <i>NruI</i>	Directa	5' TCAGATTCGCGAAAACCTGGTGAAGTGGTCTCCAGG	141
Rep25aa125	OE PCR	Directa	5' GAATTTACCCGCGGATCGAGCCG CAGATCAACGACTGGGTGCGCCATC	142
Rep25aa141	OE PCR	Directa	5' GGTCACAAAGACCAGAAATGGCCCGGGAGCCAAATAGGTGGTGGATCTGG	143
Rep25aa149	OE PCR	Directa	5' GAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATTTCTGGTATATTCGCCGCTACCTGC	144
Rep25aa166	PCR-RD <i>Bpu10I</i>	Directa	5' CCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACAAACCTG	145
Rep25aa187	OE PCR	Directa	5' GTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGCTGTCGGCGAGTTTCTGGCAG	146
Rep25aa216	PCR-RD <i>SgrAI</i>	Directa	5' ATGCGCCGGTATCAAAAAGCAAGACTTCCAGAAAATACATGG	147
ITR2 Half1 Kpn		Directa	5' ATTAGGTACCAGGAACCCCTAGTGATG	148
ITR2 Half1 Sfi		Inversa	5' TAATAGGGCCCAAGGCCCGGG	149
ITR2 Half2 Sfi		Directa	5' TTAATAGGCCCTTTGGCCCGGG	150
ITR2 Half2 Hind		Inversa	5' TATAATAAGCTTAGGAACCCCTAGTGATGGAG	151
ITR5 Half1 Kpn		Directa	5' ATTATAGGTACCTACAAAACCTCCTTGCCTTGGAG	152
ITR5 Half1 Sfi		Inversa	5' TTAATAGGCCCTTTGGCCCGTCCG	153
ITR5 Half2 Sfi		Directa	5' TTAATAGGCCCAAGGGCCCGTCCGT	154
ITR5 Half2 Hind		Inversa	5' TATAATAAGCTTTACAAAACCTCCTTGCCTTGGAGAG	155

Clonación de ITR: las ITR se clonaron en un plásmido pUC-18 con un casete de GFP (promotor de CMV, poliA SV40) clonado entre los sitios de restricción *KpnI* y *EcoRI*. Las ITR se sintetizaron en dos mitades como oligos de ADN Ultramer de 4 nmol (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Se incorporaron sitios de restricción *SfiI* en un brazo de horquilla de la ITR para clonación (Figura 1A). Debido a las inconsistencias de la secuencia reportada en la punta de las horquillas ITR5 entre Chiorini et al., (1999), la secuencia publicada del GenBank (número de acceso NC_006152) y el mapeo de restricción, se utilizó una horquilla de ITR2 para la construcción de ITR5 (Figura 1A). Se amplificaron 200pg de cada oligo en una reacción de PCR usando los cebadores ITR enumerados en la Tabla 4. Se usaron 2,5 U de ADN Polimerasa PfuTurbo (Stratagene, La Jolla, CA) para amplificar cada mitad de la ITR de la siguiente manera: 1 ciclo a 94°C durante 4 minutos, 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C, 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Las reacciones de PCR se purificaron y se sometieron a digestión mediante *KpnI* y *SfiI* *HindIII* y *SfiI* (NEB, Ipswich, MA). Se realizó una triple ligación con el plásmido GFP pUC-18 y cada mitad de la ITR con ADN Ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Todos los constructos se verificaron mediante secuenciación de ADN en las Instalaciones de Análisis Genómico de UNC-CH después de la linealización del plásmido y la ablación de la estructura secundaria de ITR mediante digestión con *SfiI*.

Análisis de transferencia Western: las muestras para el análisis de transferencia Western se recogieron 48-72 horas después de la transfección del plásmido adyuvante de Ad y la construcción adyuvante AAV apropiada. Las células se lavaron y se resuspendieron en 100 µL de PBS antes de la adición de 100 µL de regulador de muestra Laemmli 2x (Tris 100 mM pH 6,8; SDS al 4%, DTT 200 mM, glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0,1%). Las muestras fueron sonicadas brevemente y hervidas durante 10 minutos. Las muestras se corrieron en geles de Bis-Tris al 4-12% NUPAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 160 voltios durante 90 minutos. La proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, Carlsbad, CA) a través de una transferencia húmeda durante 60 minutos a 30 voltios. Los geles se bloquearon durante la noche leche desnatada en polvo al 10% en 1x PBS/Tween (0,05%). La detección de ambas proteínas Rep2 y Rep5 (los cuatro tamaños) se logró con un anticuerpo monoclonal antiproteína Rep del virus adenoasociado (clon 259.5, American Research Products, Belmont, MA) a una dilución 1:20 en PBS/Tween durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió un anticuerpo anti-ratón HRP secundario a una dilución 1:5.000 en PBS/Tween durante una hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió el sustrato de máxima sensibilidad a nivel femto SuperSignal West (Pierce, Rockford, IL) y las transferencias se expusieron a una película de rayos X.

Cultivo celular y producción de rAAV: Se obtuvieron células HEK 293 de ATCC y se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma, St. Louis, MO) y 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y se cultivaron a 37°C con saturación de CO₂ del 5%. Las transfecciones se realizaron en placas de cultivo celular de seis pozos. Se transfectaron por triplicado 0,75 µg de cada uno de plásmido adyuvante de Ad, plásmido adyuvante de AAV (Rep2Cap2, Rep5Cap2 o el mutante de Rep descrito), y el plásmido de GFP que contiene la ITR (mutante o de tipo silvestre ITR como se especifica en el texto) con polietilimina (PEI) (peso molecular lineal 25.000) como se describió (Xiao et al., (1998) J. Virol. 72: 2224). Las células se cosecharon 48-72 horas después de la transfección.

Purificación de ADN de Hirt y análisis de transferencia Southern: La purificación de ADN de Hirt se realizó como se describe (Hirt (1967) J. Mol. Biol. 26: 365). Las células se recogieron 48-72 horas después de la transfección, se lavaron en PBS y se resuspendieron en 370 µL de solución de Hirt (Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 y EDTA 0,1 M) antes de la adición de 25 µL de SDS al 10% y 165 µL de NaCl 5M. Las muestras se incubaron a 4°C durante la noche antes de la centrifugación. El ADN se purificó mediante extracción con fenol cloroformo y se precipitó en un volumen igual de isopropanol antes de la resuspensión en 50 µL de ddH₂O estéril. Se digirieron 5 µL de cada muestra con 4U de *DpnI* (NEB, Ipswich, MA) 2-4 horas a 37°C antes de la electroforesis en gel y análisis de transferencia Southern para eliminar el plásmido transfectado no replicado (Chomczynski (1992) Anal. Biochem. 201: 134) La membrana de nailon (Hybond-XL, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) se hibridó con una sonda correspondiente al marco de lectura abierto de GFP marcado con el kit de marcación de ADN cebado en forma aleatoria (Roche, Inobjetivo, IN) y d-CTP P³². Las transferencias se visualizaron después de la exposición a una pantalla de imágenes de fósforo (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

Densitometría: Se realizó la densitometría usando el programa de imágenes del NIH de dominio público (desarrollado en los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos disponible en Internet en el sitio web del NIH). El análisis de densitometría de una banda resistente a *DpnI* en el gel de agarosa antes de la transferencia se usó como un control de carga para normalizar los valores obtenidos a partir de la transferencia Southern. El valor más bajo (ausencia de replicación vectorial) se restó de todos los valores para tener en cuenta el fondo. Para medir la eficacia relativa de replicación, se dividieron los valores para los vectores de ITR2 por el valor obtenido del control de Rep2-ITR2. Los vectores de ITR5 se compararon con el control de Rep5-ITR5. Todos los valores se obtuvieron por triplicado (n=3). Las barras de error representan el error estándar (desviación estándar dividida por la raíz de 3). Todas las muestras se compararon con controles en la misma transferencia.

Modelamiento Molecular: Los modelos moleculares se generaron usando el modelo suizo (disponible en el sitio web expasy.org). La estructura cristalina publicada del N-terminal de Rep5 complejada con el RBE (PDB acceso # 1rz9) se utilizó como plantilla para todos los modelos. La visualización de la representación de la estructura de proteínas

de las imágenes se realizó con PyMOL (disponible en pymol.org). El plegamiento de ADN se realizó utilizando el servidor mfold de ADN (disponible en mfold.bioinfo.rpi.edu).

Ejemplo 2

Construcción y caracterización de ITR quiméricas

Anteriormente, se postuló que la especificidad de replicación de AAV estaba dirigida por la secuencia de trs (Chiorini et al., (1999) J. Virol. 73: 4293; Chiorini et al., (1999) J. Virol., 73: 1309). Rep2 puede cortar trs de ITR2 (AGT/TGG) y los trs de AAVS1 del cromosoma 19 humano (GGT/TGG) (Wu et al., (2001) Arch. Biochem. Biophys. 389: 271). Rep5 corta únicamente los trs de ITR5 (AGT/TGG). Sin embargo, la alineación de las secuencias de ITR2 e ITR5 revelaron varias diferencias estructurales y de secuencia significativas fuera de la secuencia de trs (Figura 1A). El espacio entre el RBE putativo y el tallo de corte fue significativamente diferente; tres nucleótidos (nt) para ITR2 y 15 nt para ITR5. Además, aunque la secuencia de trs no está estrechamente conservada entre ITR2 e ITR5, tampoco lo es la altura o la longitud total del tallo de corte putativo.

Se usó un nuevo método para generar ITR mutantes con el fin de determinar qué partes de la ITR eran responsables de la especificidad replicativa. Estudios previos han investigado las interacciones Rep-ITR *in vitro* en gran medida debido a la dificultad para sintetizar ITR de longitud completa para ensayos *in vivo*. La PCR a través de la estructura secundaria de la ITR es ineficiente y la secuenciación a través de estos elementos requiere típicamente la secuenciación de la cadena terminal radiomarcada (Young et al., (2000) J. Virol. 74: 3953). Las ITR de AAV son altamente recombinogénicas y frecuentemente están mutadas incluso en un contexto de plásmido (Samulski et al., (1983) Cell 33: 135).

Para abordar estas preocupaciones, las ITR se sintetizaron y se amplificaron en mitades (Figura 36). Para ensamblar las mitades, se incluyó un sitio *SfiI* en uno de los brazos de la horquilla de la ITR. *SfiI* permitió la conservación de la secuencia de RBE' (Brister y Muzyczka (2000) J. Virol. 74: 7762). La clonación de ITR en un formato de elemento D doble (DD) requirió solo una ITR por plásmido para la replicación (Xiao et al., (1997) J. Virol. 71: 941). Las tres funciones principales de Rep necesarias para la replicación de AAV (unión de Rep, helicasa y corte) se analizaron mediante la presencia o ausencia de replicación intracelular del plásmido. Este ensayo proporcionó la capacidad de cuantificar la función Rep-ITR en un entorno fisiológico, eliminando la preocupación de que la proteína Rep altamente purificada pudiera tener una función aberrante *in vitro*. Este sistema también evitó las preocupaciones de que los ensayos previos *in vitro* utilizaron solo un fragmento de la ITR o que los oligos utilizados para recapitular, la ITR podría no plegarse correctamente.

Un alineamiento de ITR2 (SEQ ID NO: 17) e ITR5 (SEQ ID NO: 18) (Figura 1A) reveló varios elementos divergentes que podrían conferir especificidad a Rep. El espaciador y los elementos del tallo de corte parecían ser los candidatos más probables para interacciones únicas con su proteína Rep asociada. Esta hipótesis fue respaldada por la baja homología de estos elementos entre AAV2 y AAV5.

Las ITR de tipo silvestre que contienen el sitio *SfiI* funcionaron como se esperaba con Rep2 específica para ITR2 y Rep5 específica para ITR5 (Figura 1B). Rep2-ITR2 se replicó aproximadamente 2 veces mejor que Rep5-ITR5, potencialmente debido a la menor energía de plegamiento de ITR5 que resulta en la estabilidad reducida del plásmido antes de la replicación. Debido a esta pequeña diferencia en la fidelidad replicativa, todas las ITR replicadas con Rep2 se normalizaron a Rep2-ITR2, mientras que las ITR replicadas con Rep5 se normalizaron a Rep5-ITR5 (Figura 1B).

Con el fin de confirmar que el RBE y los brazos de horquilla no desempeñaron ningún papel en la especificidad de Rep, se generó una ITR quimérica con elementos de unión de ITR5 y un espaciador de ITR2 y un tallo de corte (ITR5 + 2SNS, SEQ ID NO: 19). Solo Rep2 replicó este ITR, confirmando que los determinantes de la especificidad replicativa se encuentran en los elementos del espaciador/tallo de corte (Figura 1B). Mientras que la replicación ITR5 + 2SNS no era tan eficiente como ITR2-Rep2, se replicó a niveles de ITR5-Rep5. Por el contrario, Rep5 replica específicamente una ITR compuesta de horquillas ITR2 y espaciador de horquilla y el espaciador ITR5 y el tallo de corte (ITR2 + 5SNS, SEQ ID NO: 20, Figura 1B). Rep5 replica esta ITR a niveles de tipo silvestre. Estos datos demostraron que la especificidad de Rep-ITR se encuentra fuera de las regiones de unión de ITR.

A continuación, se crearon ITR quiméricas para explorar si el tallo de corte o el espaciador entre el RBE y el tallo de corte albergaba interacciones únicas con la proteína Rep. Una ITR con los elementos de unión de ITR5 y el espaciador y el tallo de corte ITR2 no pudieron ser replicados por Rep2 o Rep5 (ITR5 + 2NS, SEQ ID NO: 21, Figura 1B). La ITR quimérica correspondiente (elementos de unión de ITR2 y espaciador con un tallo de corte de ITR5) se replicó tanto para Rep2 como para Rep5 (ITR2 + 5NS, SEQ ID NO: 22, Figura 1B). Esta disparidad sugirió que el espaciador y el tallo de corte juegan papeles diferentes en la especificidad de Rep-ITR entre AAV2 y AAV5.

Ejemplo 3

El tallo de corte es importante para la especificidad de ITR5

5 ITR2 + 5NS (SEQ ID NO: 22) estableció que Rep2 es capaz de cortar una ITR con un tallo de corte de ITR5 y que la especificidad de Rep-ITR no está dirigida exclusivamente por la secuencia de trs (Figura 1B). Con el fin de determinar la flexibilidad de Rep2 hacia los tallos de corte mutantes, se generaron ITR2 que contienen formas alteradas de la horquilla (Figura 2A). Rep2 es capaz de replicar una ITR con un tallo de corte ITR5 incluso aunque el tallo de corte ITR5 contenga una secuencia diferente de trs, tenga menos pares de bases y tenga dos nucleótidos desapareados menos en su punta (Figura 2A). La sustitución del tallo de corte de ITR5 en ITR2 también permitió la replicación por Rep5.

15 Para determinar qué elemento del tallo de corte de ITR2 impedía la actividad de Rep5, se modificaron partes específicas del tallo de ITR2. En primer lugar, se eliminó un par de bases en la parte superior del tallo de corte de ITR2 putativo para bajar la altura a aquella de ITR5 (ITR2-TA, SEQ ID NO: 23). La eliminación del par de bases T-A también resultó en un trs que se asemeja a ITR5, cortando entre G/T opuesto a T/T. Rep2 continuó funcionando en esta ITR al igual que Rep5, lo que demuestra que Rep5 puede tolerar cinco nucleótidos desapareados en la punta del tallo, siempre que la altura del tallo y la secuencia de nucleótidos sea correcta. Una eliminación similar de la base del tallo de corte de ITR2 redujo la altura a la de ITR5 mientras se conservaba el sitio de corte de ITR2 (ITR2-GC, SEQ ID NO: 25). Rep2 continuó funcionando eficientemente en esta ITR mientras que la actividad de Rep5 se eliminó. Estos datos sugieren que la incapacidad de Rep5 para funcionar en ITR2 es principalmente la secuencia de los trs, específicamente el requisito de que se genere un corte entre G/T.

25 Para determinar el grado de flexibilidad de Rep2 para diferentes tallos de corte, se crearon tres mutantes de ITR2 adicionales. La extensión del tallo de corte en un par de bases no tuvo ningún efecto sobre la replicación por Rep2 (ITR2 9 nt, SEQ ID NO: 30). Sin embargo, una extensión de tres pares de bases fue suficiente para eliminar la función de Rep2 en la ITR (ITR2 11nt, SEQ ID NO: 32). Sorprendentemente, Rep2 fue capaz de tolerar una eliminación de tres pares de bases desde la base del tallo, lo que subraya la flexibilidad de Rep2 con respecto a los sustratos del tallo de corte (ITR2 5nt, SEQ ID NO: 28).

30 Con el fin de explorar el nivel de flexibilidad que Rep5 poseía hacia los tallos de corte no de tipo silvestre, se creó un panel de ITR5 mutantes que albergaba tallos de corte alterados (Figura 2C). Curiosamente, Rep2 no ha replicado ninguno de estas ITR, lo que sugiere que un elemento externo al tallo de corte de ITR5 es responsable de evitar la función de Rep2. Como en la Figura 1B, el reemplazo del tallo de corte de ITR5 con el de ITR2 dio como resultado la ablación de la replicación por Rep5, atribuible a la secuencia de trs incompatible. La adición de un par de bases en la parte superior del tallo de corte de ITR5 disminuyó severamente la capacidad de Rep5 para replicar la ITR (ITR5 + TA, SEQ ID NO: 24, Figura 2D). Esta inserción interrumpió la secuencia de trs de ITR5 y aumentó el tamaño del tallo un par de bases. Sin embargo, el bajo nivel de replicación de Rep5 en ITR5 + TA sugiere que todo el sitio de trs de ITR2 es necesario para conferir especificidad a Rep2, no solo la presencia de un sitio de corte de T/T.

40 La adición de un par de bases a la base del tallo de corte de ITR5, que preserva el trs de ITR5 en la punta, casi eliminó la replicación por Rep5 (ITR5 + GC, SEC ID NO: 26). Del mismo modo, la eliminación de un par de bases de la base del tallo de corte de ITR5 redujo fuertemente la replicación por Rep5 (ITR5 6nt, SEQ ID NO: 35, Figura 2D). Estos datos sugieren que Rep5 es sensible tanto a la altura del tallo de corte como a la secuencia de los trs. Por lo tanto, Rep5 no puede replicar ITR2 porque el tallo de corte de ITR2 tiene un punto de control demasiado alto y tiene una secuencia de trs incompatible.

Ejemplo 4

50 La longitud del espaciador es importante para ITR2, no para ITR5

Mientras que Rep2 puede replicar un vector con un tallo de corte de ITR5, no puede replicar ITR5 de tipo silvestre (Figura 1B). La única diferencia entre ITR5 + 2SNS (que Rep2 puede replicar) e ITR5 + 2NS (que Rep2 no puede replicar) es el espaciador de ITR5 (Figura 1B). El espaciador de Rep2 de tipo silvestre es de tres nt de longitud, mientras que el espaciador Rep5 de tipo silvestre es de 15 nt de longitud. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que Rep2 puede ser sensible a la longitud del espaciador.

60 Para explorar el efecto de la longitud del espaciador en ITR2 e ITR5, se generaron una serie de ITR2 e ITR5 mutantes con diferentes longitudes de espaciador (Figuras 3A y 3C). Una inserción que extiende el espaciador de ITR2 a 10 nt eliminó la replicación por Rep2 (ITR2 10nt, SEQ ID NO: 31, Figura 3B). De forma similar, la sustitución del espaciador de ITR2 con el espaciador de 15 nt de ITR5 también eliminó la replicación por Rep2 (ITR2 15nt, SEQ ID NO: 33, Figura 3B). Rep5 no pudo replicar ninguno de estos vectores debido a la presencia del bucle del tallo de ITR2.

65

Rep5 muestra una mayor flexibilidad hacia los elementos del espaciador de diferentes longitudes. Reemplazar el espaciador de ITR5 de 15 nt con el de ITR2 dio como resultado una ITR en la que Rep5 retuvo la capacidad de replicarse en un nivel reducido (ITR5 3nt, SEQ ID NO: 34, Figura 3D). Además, la presencia del espaciador de tres nt permitió que el Rep2 funcione en esta ITR. La adición de seis nt al espaciador de ITR5 (para una longitud de espaciador total de 21nt) dio como resultado una ITR capaz de ser replicada por Rep5 a un nivel eficiente (ITR5 21nt, SEQ ID NO: 37, Figura 3D). La replicación por Rep5 fue eliminada efectivamente solo después de la inserción de 15 nt en el espaciador (ITR5 30nt, SEQ ID NO: 38, Figura 3D). Este panel de ITR5 mutantes demuestra la importancia de un elemento espaciador de tres nt para la función de Rep2.

Estos datos confirmaron que la longitud del espaciador de ITR5 era importante para bloquear la función de Rep2. Incluso pequeñas inserciones en el espaciador de ITR2 no fueron toleradas por Rep2. Mientras tanto, Rep5 es flexible en cuanto a la longitud del espaciador, lo que demuestra la capacidad de funcionar en las ITR con espaciadores de 3-21 nt.

Ejemplo 5

El espaciador de ITR5 actúa como RBE para Rep5

La incapacidad de Rep2 para funcionar en ITR con espaciadores de más de tres nt llevó a la pregunta de por qué Rep5 era tan flexible en este sentido. Se formuló la hipótesis de que Rep5 podría unir específicamente el espaciador de ITR5 tal como se une al RBE. La incapacidad de Rep2 para enlazar esta secuencia imposibilitaría su función en ITR5. El apoyo de esta hipótesis fue un motivo de unión de Rep GAGY moderadamente conservada que se extiende a través del espaciador de ITR5 (Figura 4A). Además, como los monómeros de Rep se unen cada cuatro nt, la unión de tres monómeros de Rep5 al elemento espaciador de 15 nt daría como resultado un espaciador de tres nt, similar al de ITR2 (Hickman et al., (2004) Mol. Cell 13: 403).

Si Rep5 se une al motivo GAGY vagamente conservado, la eliminación de ese motivo del espaciador debería abolir la función de Rep5. De hecho, el mutante ITR5 No GAGY (SEQ ID NO: 40) no pudo ser replicado por Rep2 o Rep5 (Figura 4B). Esto sugirió que la secuencia específica del espaciador de ITR5 desempeña un papel activo en la interacción Rep5-ITR5. Por el contrario, un espaciador con una repetición GAGY pura no debe interrumpir la capacidad de Rep5 para funcionar en la ITR. De hecho, Rep5 fue capaz de replicar esta ITR a niveles de tipo silvestre (GAGY de ITR5, SEQ ID NO: 39, Figura 4B). Rep2 también fue capaz de replicar este ITR de manera eficiente, lo que sugiere que la naturaleza poco conservada de la repetición GAGY dentro del espaciador de ITR5 impide una importante interacción ADN-proteína con Rep2 necesaria para la replicación.

Para explorar cómo el espaciador de ITR5 funcionaba como RBE, se eliminaron tres repeticiones GAGY del lado de la horquilla del RBE (RBE del espaciador de ITR5, SEQ ID NO: 42, Figura 4A). Esto esencialmente cambió el RBE de 16 nt a 12 nt más cerca del tallo de corte. Rep5 replicó este ITR de manera eficiente, confirmando que el espaciador de ITR5 actúa como un RBE (Figura 4B). La ligera reducción en la fidelidad de replicación de este ITR, en comparación con la de ITR5 de tipo silvestre, puede indicar la incapacidad de Rep para interactuar apropiadamente con el RBE' (Brister y Muzyczka (2000) J. Virol. 74: 7762). Rep2 nuevamente no pudo replicar el RBE de espaciador de ITR5 debido a su incapacidad para interactuar con el espaciador de ITR5.

A continuación, se intentó extender el elemento espaciador de ITR2 para que funcione como un RBE extendido (Figura 4C). La inserción de siete nt intentada en la Figura 3A no poseía esencialmente ninguna homología con GAGY (ITR2 +7, SEQ ID NO: 29, Figura 4C). Como resultado, Rep2 no pudo replicar esta ITR (Figura 4D). Ocho nt (dos repeticiones GAGY de cuatro nt) insertadas en el espaciador de ITR2 entre el RBE y el espaciador existente (GAGY de ITR2 + 8, SEQ ID NO: 41) impidieron la replicación por Rep2, lo que demuestra que el RBE de ITR2 no se puede extender. Esto sugiere que Rep2 puede depender de la unión de RBE' o de una longitud de espaciador específica para que la oligomerización adecuada funcione en su ITR afín. Curiosamente, este requisito no se aplica a la función de Rep2 en GAGY de ITR5 (Figura 4A).

Similar a RBE de espaciador de ITR5, se conservó la inserción de GAGY de ocho nt en ITR2 mientras se eliminaban ocho nt de GAGY del lado de la horquilla del RBE (RBE del espaciador de ITR2 + 8-8, SEQ ID NO: 43, Figura 4C). Esto cambió el RBE ocho nt más cerca del tallo de corte. Rep2 replica este ITR muy ineficientemente en un nivel por debajo del umbral de detección del análisis densitométrico (Figura 4D, Southern).

Ejemplo 6

Identificación de regiones en Rep responsables por la especificidad de ITR

La identificación de los dos elementos de la ITR responsables de la especificidad de Rep permitió mapear las regiones de Rep2 y Rep5 involucradas en la especificidad de ITR. Se enfocó exclusivamente en los 208aa del N-terminal de las proteínas Rep grandes ya que esta región abarca la unión al ADN y la actividad endonucleolítica de la proteína (Yoon et al., (2001) J. Virol. 75: 3230). Esta región muestra aproximadamente un 60% de conservación de la secuencia distribuida uniformemente a través de la secuencia de la proteína (Figura 5A). Los residuos

implicados en el sitio activo de la proteína se conservan al 100% entre Rep2 y Rep5 (Hickman et al., (2002) Mol. Cell 10: 327). Los residuos implicados en la unión del RBE' están altamente conservados (Hickman et al., (2004) Mol. Cell 13: 403). Los residuos que se unen al RBE muestran una conservación casi perfecta excepto por dos sustituciones conservadoras cerca del aa 140.

Para mapear las regiones de Rep implicadas en la especificidad de ITR, se generó un panel de Rep quiméricas derivadas de Rep2 y Rep5 (Figura 5B). La capacidad de cada Rep quimérica para replicar un vector flanqueado por ITR2 o ITR5 en células HEK 293 se determinó por transferencia Southern (Figuras 5B y 5D). Cada Rep en el panel se verificó mediante secuenciación de ADN y análisis de transferencia Western (Figura 5C). Cada Rep quimérica mostró perfiles de expresión de proteínas similares en comparación con el tipo silvestre. El análisis densitométrico proporcionó una comparación de la eficacia de replicación de cada Rep quimérica con aquella de Rep2 o Rep5 de tipo silvestre (Figura 5E). Las Rep quiméricas se nombraron de acuerdo con la ubicación de los aa del intercambio entre serotipos; por ejemplo, Rep25aa77 (SEQ ID NO: 63) posee 76 aa en el N-terminal de Rep2 y el C-terminal de Rep5.

En el caso de Rep5, la sustitución de los 77 o 97 aa del N-terminal por Rep2 no tuvo ningún efecto sobre la especificidad de ITR ni un impacto significativo sobre la fidelidad replicativa (Figuras 5D y 5E). Piezas más grandes de Rep2 sustituido en el N-terminal de Rep5 fueron suficientes para evitar la replicación eficiente de ITR5 (Rep25aa116, SEQ ID NO: 65; Rep25aa125, SEQ ID NO: 66; Rep25aa141, SEQ ID NO: 67). Esto sugirió que estas quimeras poseían interrupciones de una región crítica de Rep5 para la especificidad de ITR5.

Las quimeras basadas en Rep2 no pudieron replicar ITR5 sin la inclusión de los 146aa del N-terminal de Rep5 (Rep52aa146, SEQ ID NO: 79, Figura 5D). Rep52aa146 replicó ITR5 en niveles de tipo silvestre, al igual que las tres quimeras con porciones más grandes de Rep5 en el N-terminal (Rep52aa160, SEQ ID NO: 58; Rep52aa175, SEQ ID NO: 59; Rep52aa207, SEQ ID NO: 61). Este mapeo revela que la región crítica para la especificidad de ITR en Rep5 se encuentra entre los aa 97-146. Sorprendentemente, el clon Rep52aa146 también funcionaba eficientemente en ITR2, constituyendo un Rep capaz de replicar ITR2 e ITR5. Esto sugirió que la especificidad ITR existía en dos regiones diferentes de Rep.

Para Rep2, los 83 o 109 aa del N-terminal de Rep5 podría sustituirse sin efecto sobre la especificidad de ITR o influencia principal sobre la fidelidad replicativa (Rep52aa84, SEQ ID NO: 54; Rep52aa110, SEQ ID NO: 55; Figuras 5D y 5E). Las quimeras que incluyen porciones ligeramente mayores de Rep5 no pudieron replicar ninguna ITR, sugiriendo de nuevo la interrupción de un dominio crítico para la especificidad de ITR (Rep52aa126, SEQ ID NO: 56; Rep52aa138, SEQ ID NO: 57).

Las quimeras basadas en Rep5 no pudieron replicar ITR2 sin la inclusión de los 149aa del N-terminal de Rep2. Sin embargo, la replicación de ITR2 fue ineficaz (Rep25aa149, SEQ ID NO: 68, Figuras 5D y 5E). La inclusión de porciones más grandes de Rep2 permitió que la replicación de ITR2 aumentara a niveles de tipo silvestre (Rep25aa166, SEQ ID NO: 69; Rep25aa216, SEQ ID NO: 71). Estos datos mapean la región de Rep2 involucrada en la especificidad de ITR aa 110-149. Sin embargo, a diferencia de Rep5, esta no era la única región que desempeñaba un papel en la especificidad de ITR. La capacidad de la quimera Rep52aa146 para replicar vectores ITR2 e ITR5 demostró una segunda región de Rep2 entre aa 138-160 suficiente para permitir la replicación de ITR2 incluso cuando la otra región crítica (aa 110-149) era Rep5. El aislamiento de dos regiones de Rep diferentes implicadas en la especificidad de ITR fue consistente con el descubrimiento de dos elementos independientes que rigen la especificidad dentro de la ITR.

Ejemplo 7

Caracterización de las regiones Rep involucradas en la especificidad de ITR

Para caracterizar los dominios de Rep identificados en la Figura 5, se crearon proteínas Rep quiméricas que intercambiaban específicamente las regiones implicadas en la especificidad de ITR (Figura 6A). La región 1 existía en Rep2 desde aa 110-149 y en Rep5 desde aa 97-146. La Región 2 estaba dentro de Rep2 desde aa 149-187 y Rep5 desde aa 146-187. Como en la Figura 5, todas las quimeras se verificaron mediante secuenciación de ADN y análisis de transferencia Western (Figura 6B). Las quimeras se analizaron luego para determinar la capacidad de replicar vectores flanqueados por ITR2 o ITR5 (Figura 6C).

Reemplazando la región 1 de Rep5 con Rep2 produjo un clon incapaz de replicar cualquier vector, sugiriendo que la quimera carecía de la capacidad de unir el espaciador de ITR5 o cortar el tallo de corte de ITR2 (Rep525aa110-148, SEQ ID NO: 72, Figura 6C). El reemplazo de la región 2 de Rep5 con la de Rep2 permitió que esta quimera replicara un vector de ITR2, sugiriendo que la región 2 de Rep2 era crítica para cortar el tallo de corte de ITR2 (Rep525aa146-187, SEQ ID NO: 73). La incapacidad de esta quimera para reconocer ITR5 es más difícil de explicar ya que Rep52aa146 podría replicar ITR2 e ITR5 de manera eficiente (Figura 5B). Este resultado sugiere que región 2 de Rep2 hace contactos específicos dentro de Rep2 aa 188-208 que son necesarios para funcionar en el tallo de corte de ITR5. El reemplazo de las regiones 1 y 2 de Rep5 con Rep2 dio como resultado una quimera de Rep que solo duplicó ITR2 (Rep525aa110-187, SEQ ID NO: 74).

La sustitución de la región 1 de Rep2 con Rep5 dio como resultado la replicación de solo ITR2, demostrando de nuevo una conexión entre la región 2 de Rep2 y el tallo de corte de ITR2 (Rep252aa97-146, SEQ ID NO: 75). La falta de replicación de ITR5 por Rep252aa97-146 es difícil de explicar con base en la quimera de Rep52aa146 que replica ITR2 e ITR5 de manera eficiente (Figura 5B). Este resultado sugiere que la región 1 de Rep5 establece contactos específicos dentro de los 96 aa precedentes de Rep5 para replicar ITR5. El reemplazo de la región 2 de Rep2 con Rep5 dio como resultado que una quimera no pudo replicar ITR (Rep252aa149-187, SEQ ID NO: 76). Esta Rep quimérica no posee la región 2 de Rep2 (requerido para cortar el tallo de corte de ITR2) ni la región 1 de Rep5 que parece interactuar con el espaciador de ITR5. Finalmente, el reemplazo de las regiones 1 y 2 de Rep2 con Rep5 dio como resultado una quimera capaz de replicar solo vectores de ITR5 (Rep252aa97-187, SEQ ID NO: 77).

La estructura cristalina de los 193 aa del N-terminal de Rep5 complejada con el RBE permitió modelar la ubicación de estas dos regiones críticas (Hickman et al., (2004) Mol. Cell 13: 403). La estructura del N-terminal de Rep2 se modeló con el software Swiss-Model utilizando Rep5 como plantilla. La ubicación de la región 1 apoya su participación con el espaciador/RBE (Figura 6D). Esta región interactúa con el surco principal de la ITR donde se predice una de las diferencias estructurales más evidentes entre Rep2 y Rep5 (Figura 6D, círculo sombreado). Rep2 contiene una inserción de dos aa en este bucle con respecto a Rep5. Esta inserción y otras sustituciones no conservativas son probablemente responsables de la incapacidad de Rep2 para interactuar con el espaciador de ITR5.

La observación de Rep a lo largo de la longitud de la ITR ilustra que la región 1 constituye gran parte de la base de la proteína (Figura 6E). Se predice que ambos Rep participan en un motivo de lámina β en el centro de esta región, mientras que existen áreas de homología reducida hacia ambos lados (el bucle interactúa con el surco principal de la ITR en un lado, las interacciones de RBE' en el otro). Una mirada más detallada a la región 1 revela que la mayor disparidad entre Rep2 y Rep5 se produce en la interfaz de unión de RBE en el surco principal de la ITR (Figura 6F).

Hay muy poca diferencia estructural predicha entre la región 2 de Rep2 y Rep5 (Figura 6D y 6E). En un esfuerzo por diseccionar esta región, se crearon dos clones adicionales: Rep52aa147 (SEQ ID NO: 81) y Rep52aa151 (SEQ ID NO: 83) (Figura 6A). Al igual que Rep52aa146, ambas Rep pudieron replicar vectores de ITR2 e ITR5 (Figura 6C). Rep52aa146 y Rep52aa147 replicaron los vectores de ITR2 e ITR5 con eficacia equivalente, lo que sugiere que E147 de Rep2 no está implicado en la especificidad de ITR. Rep52aa151 mostró una reducción modesta en la replicación de ITR2 en comparación con Rep52aa146, lo que sugiere que C151 de Rep2 juega un papel en la especificidad de ITR2. Como Rep52aa160 no puede replicar ITR2, esto deja solo otros dos residuos no conservados entre Rep2 y Rep5 en esta región (N155 y T161). Ambos residuos se encuentran cerca del sitio activo y es probable que interactúen con el tallo de corte o el sitio activo. N155 se encuentra directamente adyacente a Y156, la tirosina nucleofílica, y puede jugar un papel importante en la especificidad de ITR2 (Figura 6G).

Ejemplo 8

Modelo de estructura-función de la especificidad de Rep-ITR

Con el fin de unificar los elementos de ITR y Rep implicados en la especificidad en un único modelo, se utilizaron la región 1 y la región 2 que separan las Rep quiméricas junto con las ITR quiméricas que separan el tallo de corte y el espaciador. Rep2, Rep5, Rep52aa146 (que divide la región 1 y 2 de Rep y puede replicar ITR2 e ITR5), y Rep25aa149 (esencialmente sin replicación de ITR2 o ITR5) fueron seleccionados. Estas Rep fueron probados por su capacidad de replicar ITR2, ITR5, ITR2 + 5NS (que es replicado por Rep2 y Rep5), e ITR5 + 2NS (que no es replicado ni por Rep2 ni Rep5).

Solo Rep2 y Rep52aa146 replicaron eficientemente ITR2 (Figuras 7A y 7B). Solo Rep5 y Rep52aa146 replicaron ITR5. Como en la Figura 1, Rep2 y Rep5 replicaron ITR2 + 5NS. Además, Rep25aa149 (SEQ ID NO: 68) y Rep52aa146 (SEQ ID NO: 79) replicaron ITR2 + 5NS. Este ITR parece ser universalmente replicado por cada Rep en este ensayo debido a la exclusión de los elementos de ADN implicados en la especificidad de la proteína. El espaciador de tres nt de ITR2 es sensible a la región 1 de unión a ADN de Rep2 y Rep5. El tallo de corte de ITR5 de siete pares de bases actúa con la región 2 de Rep2 y Rep5. Por lo tanto, cualquier combinación de estas regiones constituye una proteína Rep capaz de replicar ITR2 + 5NS.

Finalmente, ni Rep2 ni Rep5 replicaron ITR5 + 2NS. Rep2 no puede interactuar correctamente con el espaciador de ITR5 de 15 nt. Rep5 no puede funcionar en el tallo de corte de ITR2. Por estas razones, Rep25aa149 tampoco pudo catalizar la replicación. Sin embargo, Rep52aa146 fue capaz de replicar esta ITR debido a la combinación adecuada de regiones Rep (Figura 7C). Rep52aa146 posee la región 1 de Rep5 que interactúa con el espaciador de ITR5 de 15 nt. Esta quimera también posee la región 2 de Rep2, que funciona en el tallo de corte de ITR2. Esta interacción recombinante ADN-proteína es única de AAV2 o AAV5 y constituye un nuevo origen de replicación de Parvovirus.

Tomado en conjunto, este trabajo ilustra dos mecanismos específicos de especificidad de ADN-proteína en el origen de replicación del parvovirus. Las ITR quiméricas redujeron los elementos de ADN implicados en la especificidad del espaciador y las secuencias del tallo de corte (Figura 1B). Estos resultados contradicen las afirmaciones previas de que la especificidad de Rep-ITR se basaba únicamente en la secuencia de corte como Rep2 que cortaba

eficientemente una ITR que albergaba el tallo de corte de ITR5 (Chiorini et al., (1999) J. Virol. 73: 4293). Rep2 es muy flexible en la secuencia y altura de su tallo de corte, mientras que Rep5 es muy específico para su tallo análogo (Figura 2).

5 Tres residuos de Rep2 son importantes para escindir el tallo de corte de ITR2 (Figuras 5 y 6). Los residuos C151, N155 y T161 se encuentran en el sitio activo de la proteína en una hélice alfa predicha junto con la tirosina nucleofílica Y156. No está claro cómo estos residuos (denominados región 2 de Rep) otorgan flexibilidad a Rep2 hacia los tallos de corte mutantes. Los residuos de Rep5 correspondientes (G148, A152 y V158) pueden participar en interacciones altamente específicas que requieren consideraciones de altura y secuencia específicas para el tallo de corte de ITR5.

15 La especificidad de Rep-ITR de AAV5 está mediada por el espaciador de ITR5. El reemplazo del espaciador de ITR2 de tres nt con espaciador ITR5 de 15 nt eliminó la replicación por Rep2 (Figura 2B). Un elemento de unión de Rep pobremente conservado permite que Rep5 interactúe con el espaciador de ITR5 alargado (Figura 4B). La mutación del espaciador para incluir un elemento de enlace de Rep fuerte permitió a Rep2 y Rep5 replicar la ITR. Sin embargo, la inserción de un elemento de unión de Rep en el espaciador de ITR2 todavía disminuyó aún más la función de Rep2. Si bien estos datos podrían sugerir que moléculas adicionales de Rep5 se unen a ITR5, los experimentos previos *in vitro* no han llegado a esta conclusión, aunque esos estudios se realizaron en ausencia de horquillas en las ITR (Chiorini et al., (1999) J. Virol. 73: 4293).

20 Una región de 49 aa de Rep5 interactúa con el espaciador de ITR5 (aa 97-146, Figuras 5 y 6). La estructura cristalina del N-terminal de Rep5 revela que esta región (región 1) posee residuos que se unen específicamente a RBE y RBE' de la ITR. Las principales diferencias estructurales en el bucle de Rep5 que se une a la ranura principal de la RBE probablemente representan la mayoría de la especificidad del espaciador de ITR5. Mientras que la Figura 1B predice que la unión de RBE' no debería desempeñar un papel en la especificidad de Rep-ITR, es posible que los contactos de RBE' alteren la estructura secundaria de la región 1 cuando interactúa con el RBE.

30 Debido a que las regiones de Rep que confieren especificidad de ITR estaban separadas (región 1 de Rep5 de aa97-146 y región 2 de Rep2 de aa 151-161), una Rep quimérica que posee ambas regiones fue capaz de replicar eficientemente ITR2 e ITR5. Una ITR que podría ser replicada por cualquier Rep quimérica o de tipo silvestre se construyó excluyendo los elementos de ADN requeridos para la especificidad; el espaciador de ITR5 y el tallo de corte de ITR2. Más significativamente, se generó un nuevo origen de replicación. Esta ITR contenía los dos elementos para la especificidad de Rep; el espaciador de ITR5 y el tallo de corte de ITR2. Como resultado, solo una proteína Rep quimérica compuesta por la región 1 de Rep5 y la región 2 de Rep2 pudo replicar la ITR. La creación de un único origen de replicación resalta el poder de estudiar las interacciones ADN-proteína de un origen de replicación viral.

40 La creación de una interacción única ADN-proteína fue posible debido a la separación de las interacciones específicas de Rep-ITR en AAV2 y AAV5. No está claro cómo y por qué evolucionaron estas dos interacciones ADN-proteína diferentes. Es probable debido a la divergencia evolutiva en la secuencia de ITR que puede haber ocurrido en diferentes huéspedes (AAV2 está relacionado con otros AAV de primates, AAV5 está relacionado con AAV no de primates tales como cabra y bovino). Este modelo de especificidad replicativa puede extenderse probablemente a otros parvovirus tales como el AAV de serpiente que tiene una estructura de ITR en forma de T altamente conservada pero diferentes longitudes de los espaciadores y del tallo de corte (Farkas et al., (2004) J. Gen. Virol. 85: 555)

50 Estos resultados también pueden mejorar la seguridad de futuros vectores terapéuticos de AAV. El peligro de la movilización de vectores de AAV por el AAV de tipo silvestre podría evitarse si los vectores terapéuticos albergaran ITR que ninguna Rep de tipo silvestre podría replicar (Hewitt et al., (2009) J. Virol. 83: 3919).

Ejemplo 9

Producción del vector de ITR de serpiente

55 Se cultivaron células HEK 293 en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma, St. Louis, MO) y 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y se cultivaron a 37°C con saturación de CO₂ al 5%. Para producir vectores de ITR de serpiente (pitón real), se transfectaron 10 µg de cada uno de los siguientes plásmidos mediante PEI en células HEK 293 en una placa de cultivo de 15 cm: pXX680 (plásmido adyuvante Ad), pSnTR-eGFP (el plásmido que contiene ITR, SEQ ID NO: 124), pSnRepCap2 (plásmido adyuvante de AAV que contiene los genes Rep de serpiente y genes Cap de AAV2, SEQ ID NO: 125), y pXR2 (plásmido adyuvante de AAV que contiene los genes Rep y Cap de AAV2). Véanse las Figuras 33-35. Alternativamente, podría usarse un plásmido que exprese solo las proteínas Rep pequeñas de AAV2 (Rep52 y Rep40) en lugar de pXR2. 48 horas después de la transfección, las células se recogieron y el vector se purificó por centrifugación en gradiente de CsCl como se describió previamente para otros vectores de AAV.

65

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende al menos una repetición terminal invertida (ITR) del virus adenoasociado (AAV), en el que dicha ITR comprende la secuencia de nucleótidos:

5 aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctccccct gtcgcttcg ctcgctcgt ggctcgttg ggggggagac ggcccaaagg
 gccgctcgtt ggcagctctt tgagctgcca ccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa cgcgacaggg gggagggagt ggccaactcc
 atcactaggg gttcct

2. El polinucleótido de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un ácido nucleico heterólogo.

10 3. Un vector viral, tal como un vector de parvovirus o AAV, que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

4. Una partícula de parvovirus recombinante, tal como una partícula de AAV, que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

15 5. Una proteína Rep grande sintética que comprende la secuencia de aminoácidos:

MATFYEIVIR VPFVVEEHL P GISDSFVDWV TGQIWELPPE SDLNLTIVEQ
 PQLTVADRIR RVFLYEWNKF SKQESKFFVQ FEKGSEYFHL HTLVETSGIS
 SMVLGRYVSQ IRAQLVKVVF QGIEPQINDW VAITKVKKGG ANKVVDECYI
 PNYLLPKTQP ELQWAWTME QYLSACLNLT ERKRLVAQHL THVSQTQEQN
 KENQNPNSDA PVIRSKTSAR YMELVGWLVD KGITSEKQWI QEDQASYISF
 NAASNSRSQI KAALDNAGKI MSLTKTAPDY LVGQQPVEDI SSNRIYKILE
 LNGYDPQYAA SVFLGWATKK FGKRNTIWL F GPATTGKTNI AEAIHTVVPF
 YGCVNWTNEN FPFNDCVDKM VIWEEGKMT AKVVESAKAI LGGSKVRVDQ
 KCKSSAQIDP TPVIVTSNTN MCAVIDGNST TFEHQQLQD RMFKFELTRR
 LDHDFGKGTK QEVKDFFRWA KDHVVEVEHE FYVKKGGAKK RPAPSDADIS
 EPKRVRESVA QPSTSDAEAS INYADRYQNK CSRHVGMNLM LFPCRQCERM
 NQNSNICFTH GQKDCLECFP VSESQPVS VV KKAYQKLCYI HHIMGKVPDA
 20 CTACDLVNVD LDDCIFEQ.

6. Un polinucleótido que codifica la proteína de la reivindicación 5.

25 7. Un vector, tal como un vector plasmídico o vector viral, que comprende el polinucleótido de la reivindicación 6.

8. Una célula que comprende el polinucleótido de la reivindicación 6 o el vector de la reivindicación 7.

30 9. Un método para producir una partícula de parvovirus recombinante, que comprende proporcionar a una célula permisiva para la replicación de parvovirus:

- (a) una plantilla de parvovirus recombinante que comprende (i) un ácido nucleico heterólogo, y (ii) la secuencia de repetición terminal de AAV de la reivindicación 1;
- (b) el polinucleótido de la reivindicación 6;

35 en condiciones suficientes para la replicación y el empaquetamiento de la plantilla de parvovirus recombinante; mediante el cual se producen partículas de parvovirus recombinantes en la célula.

40 10. Un método *in vitro* para suministrar un ácido nucleico a una célula, que comprende introducir en una célula la partícula de parvovirus recombinante de la reivindicación 4.

11. Una partícula de parvovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 4 para usar en un método de tratamiento de un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método administrar al sujeto mamífero una célula que ha sido contactada con la partícula de parvovirus recombinante en condiciones suficientes para que el genoma del

vector de la partícula de parvovirus entre en la célula o administrar al sujeto mamífero la partícula de parvovirus recombinante.

- 5 12. Una composición farmacéutica que comprende el vector viral de la reivindicación 3, la partícula de parvovirus recombinante de la reivindicación 4, el vector de la reivindicación 7 o la célula de la reivindicación 8.

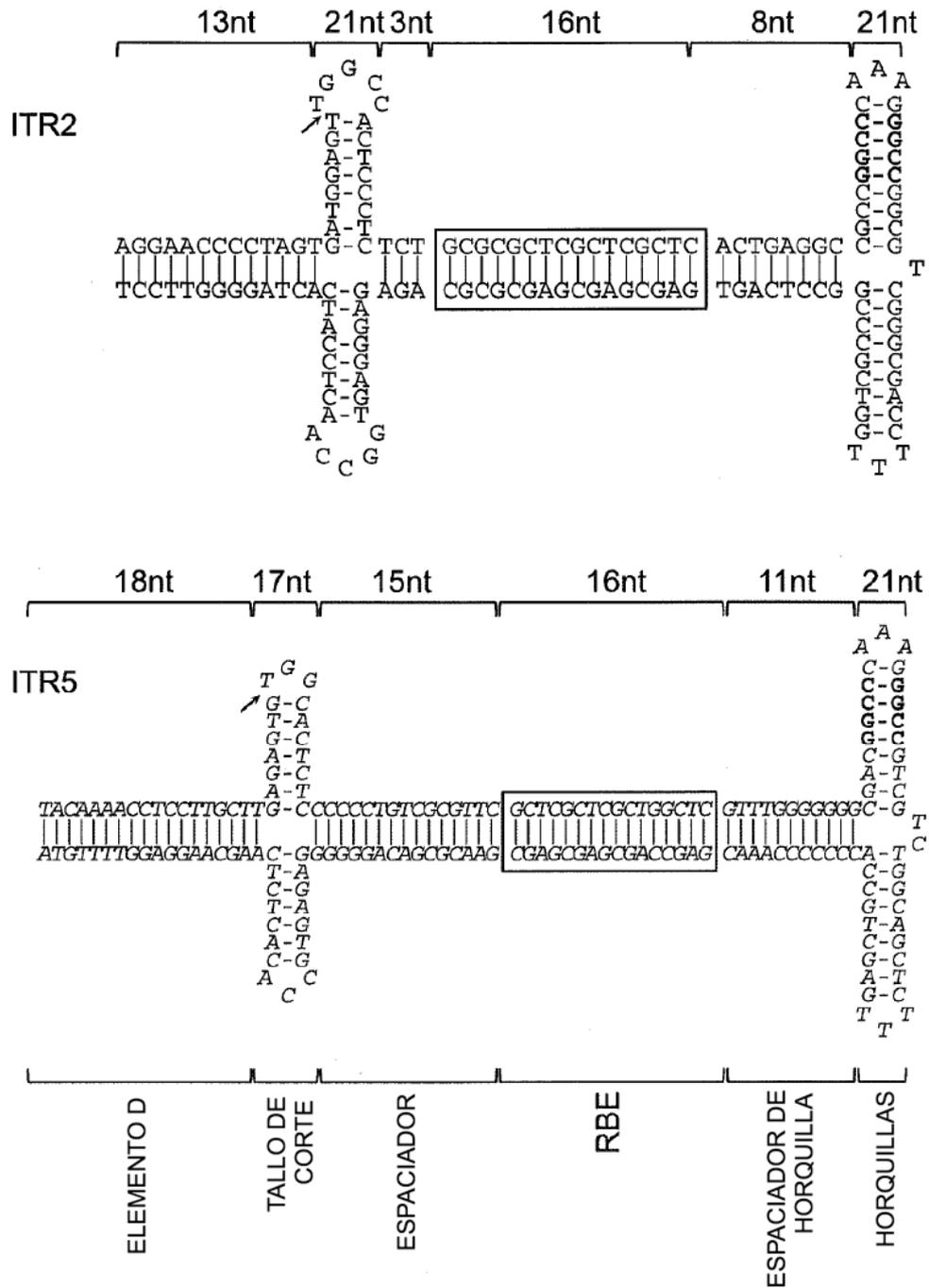


FIG. 1A

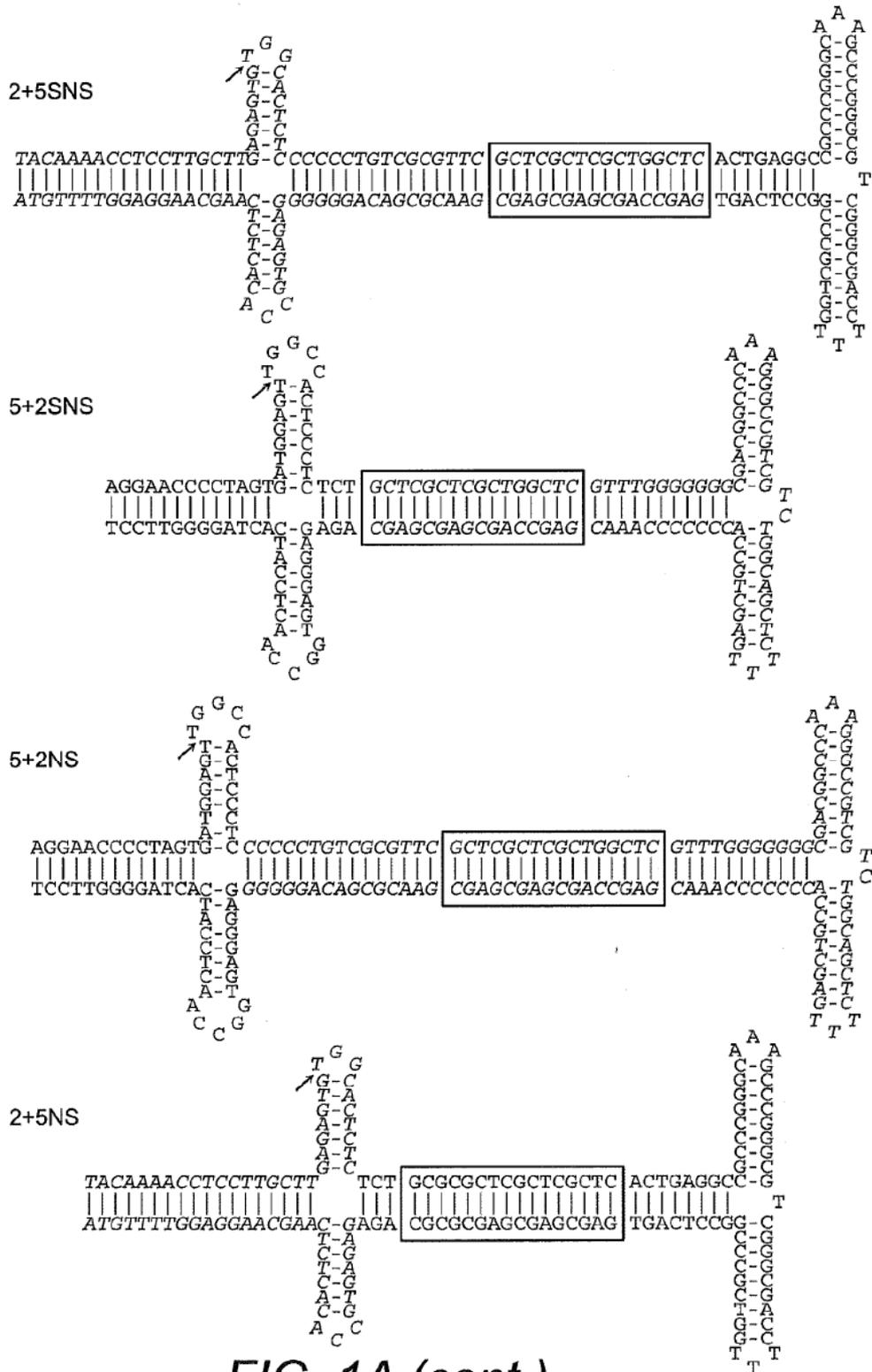


FIG. 1A (cont.)

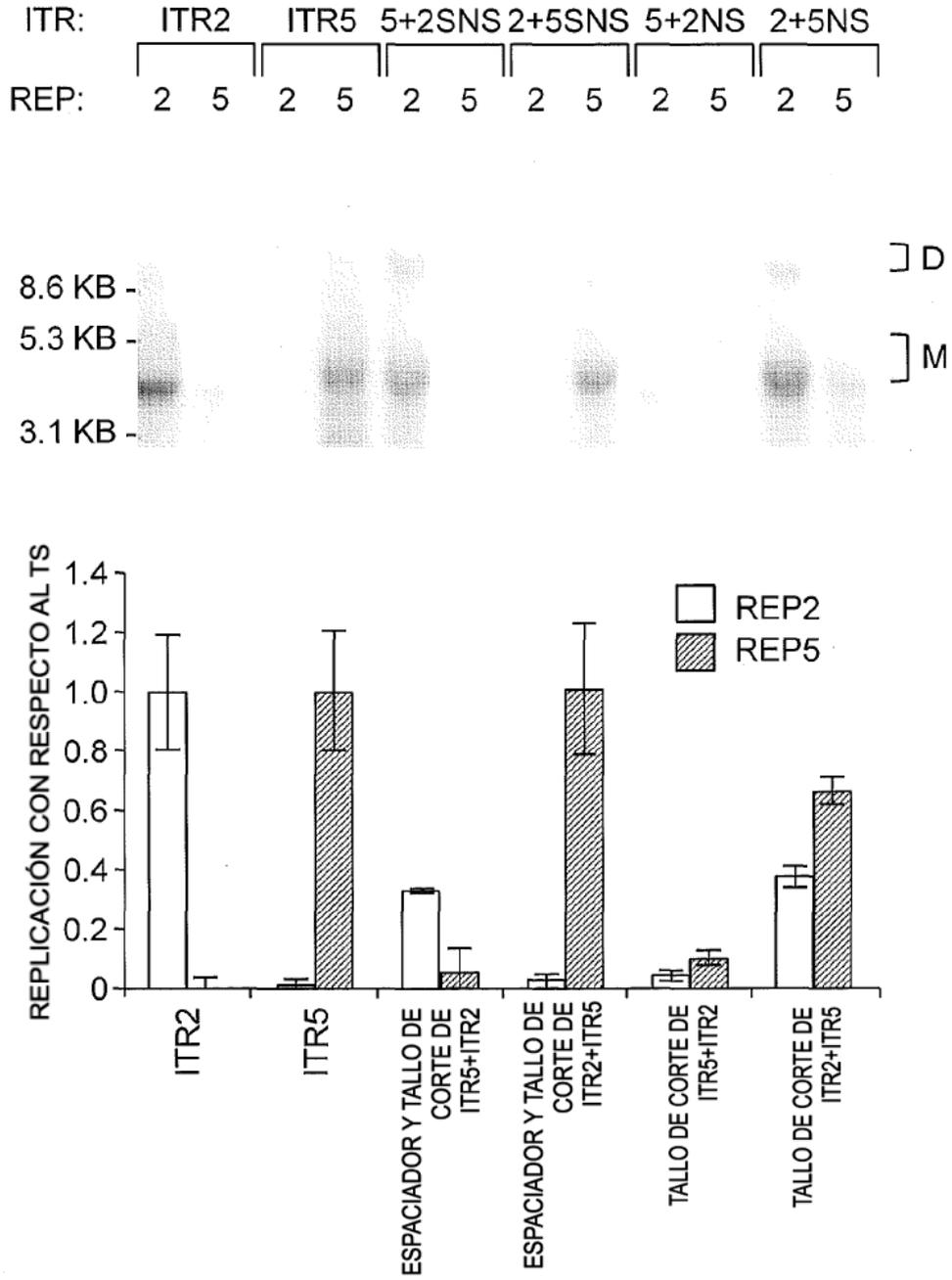


FIG. 1B

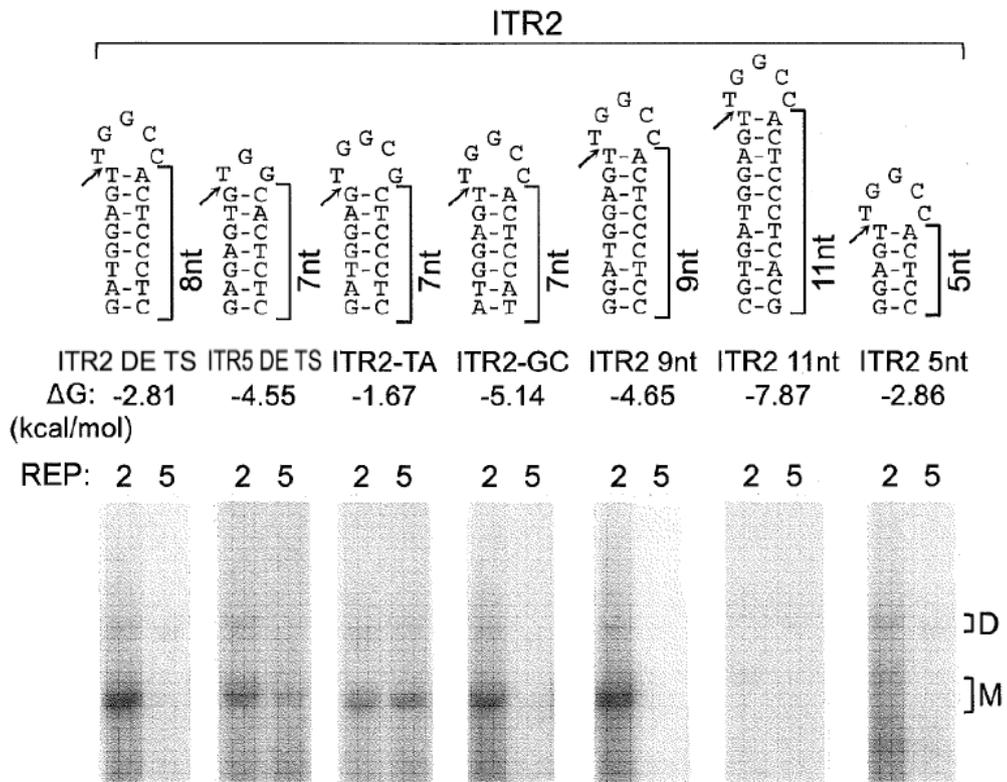


FIG. 2A

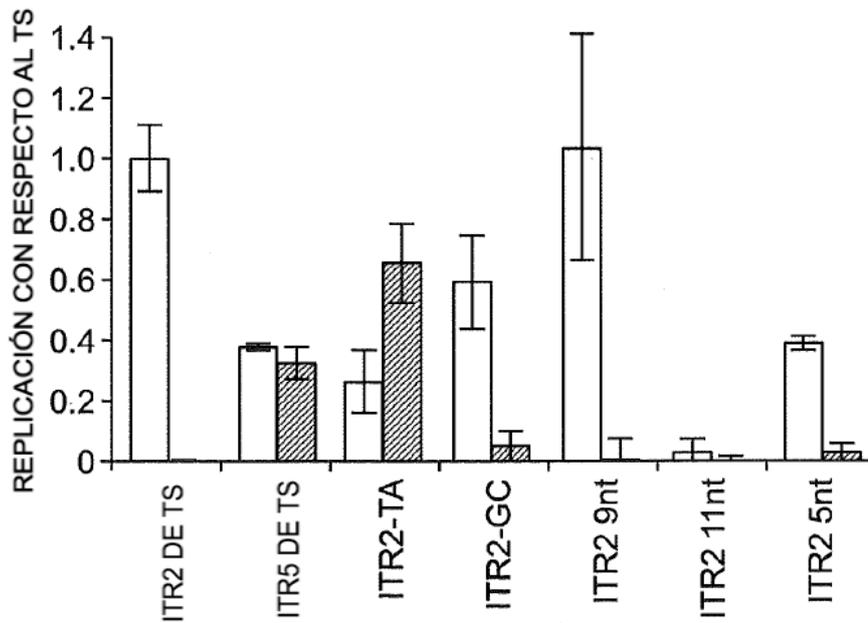


FIG. 2B

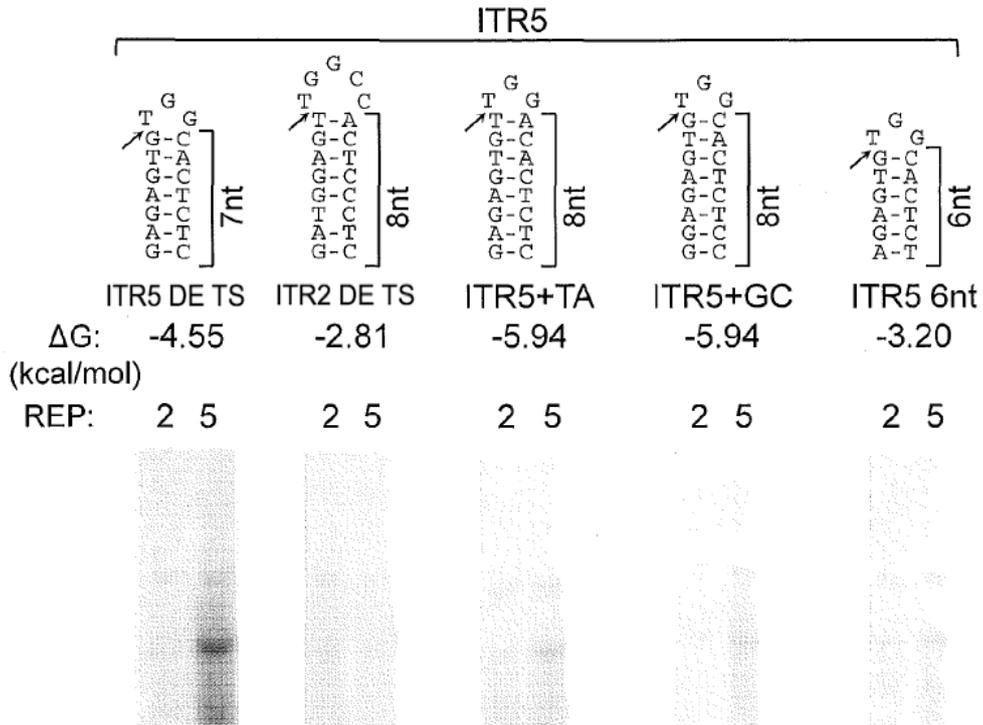


FIG. 2C

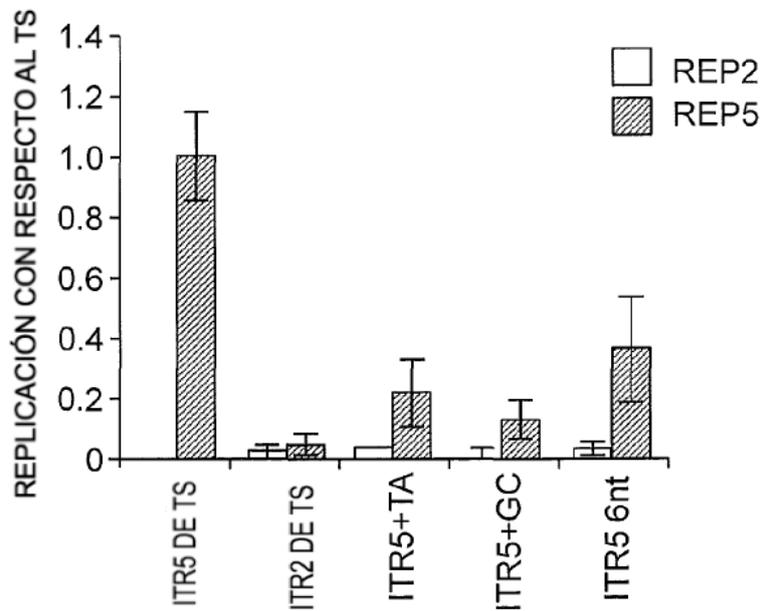


FIG. 2D

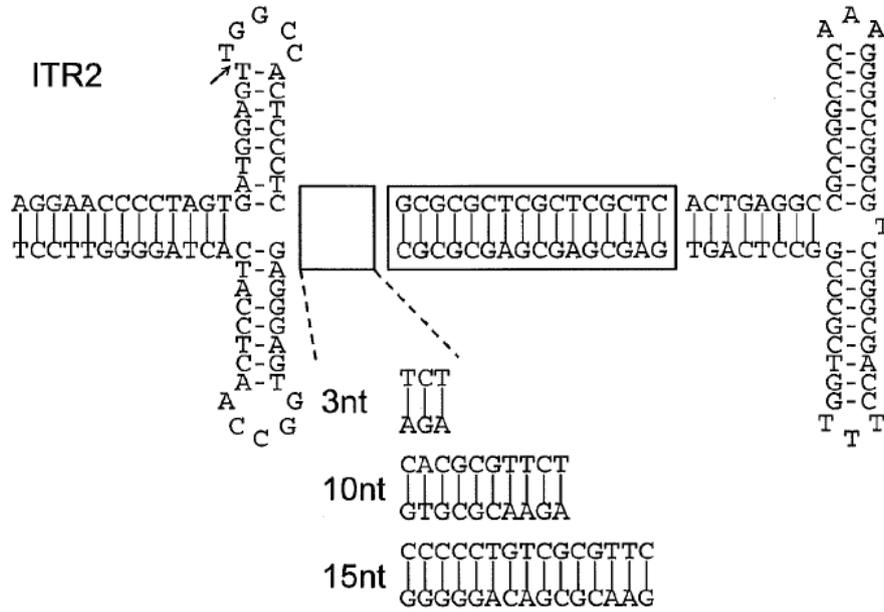


FIG. 3A

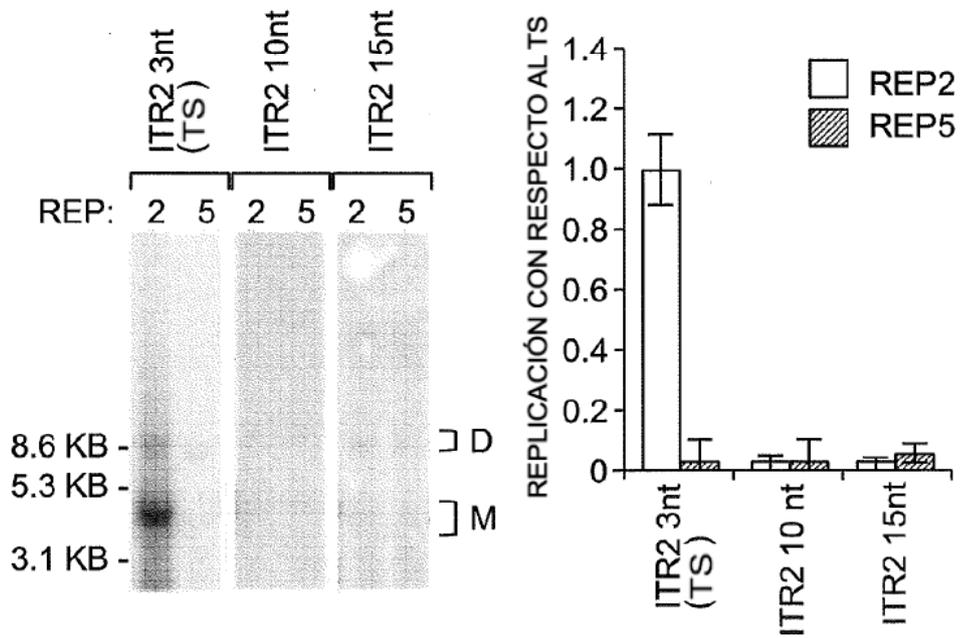


FIG. 3B

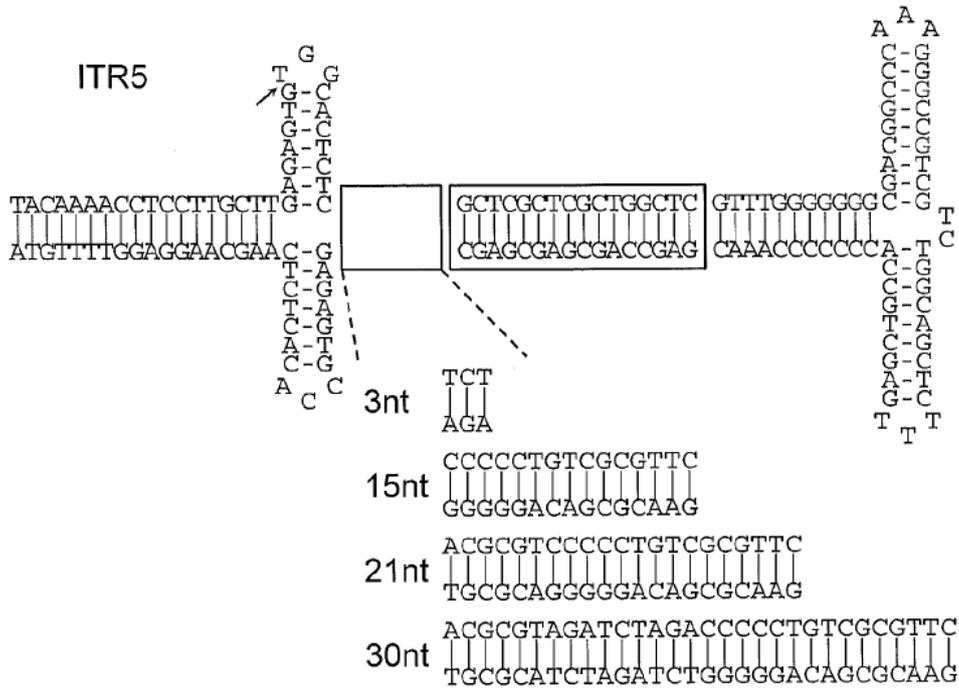


FIG. 3C

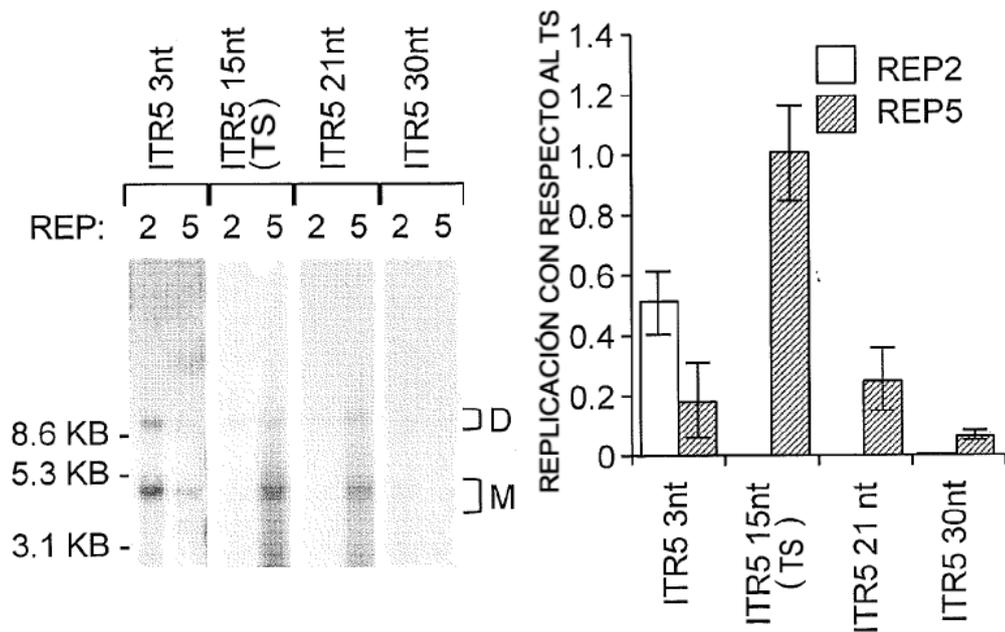


FIG. 3D

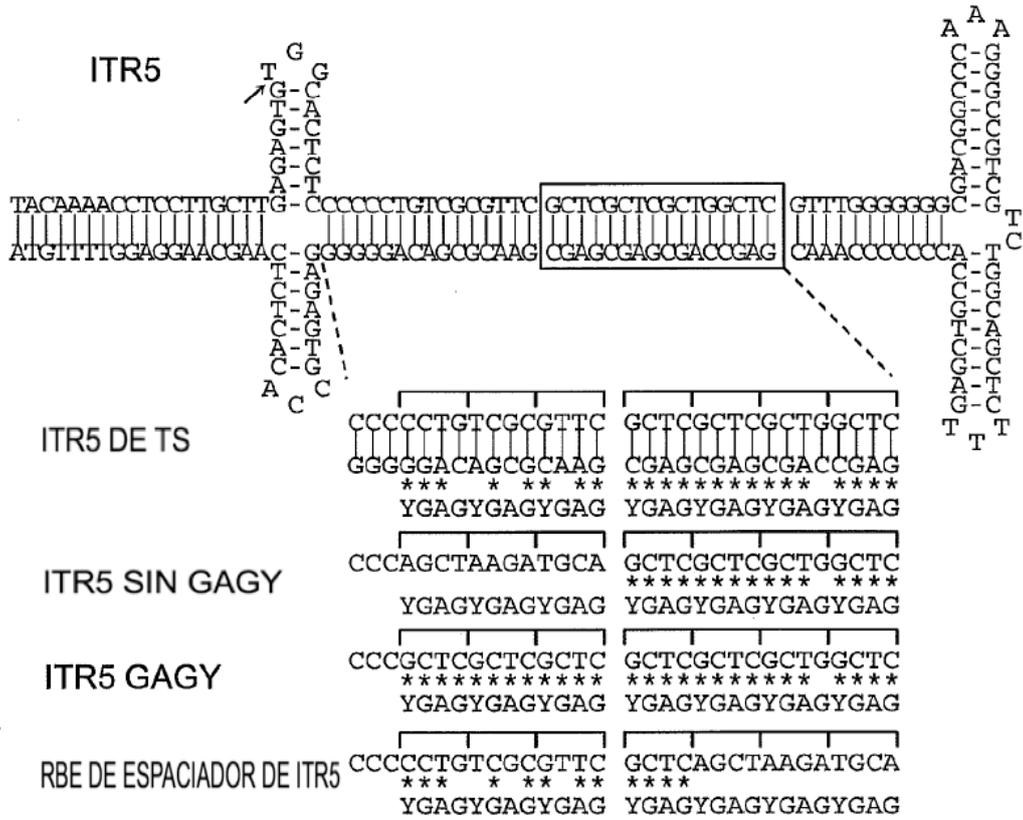


FIG. 4A

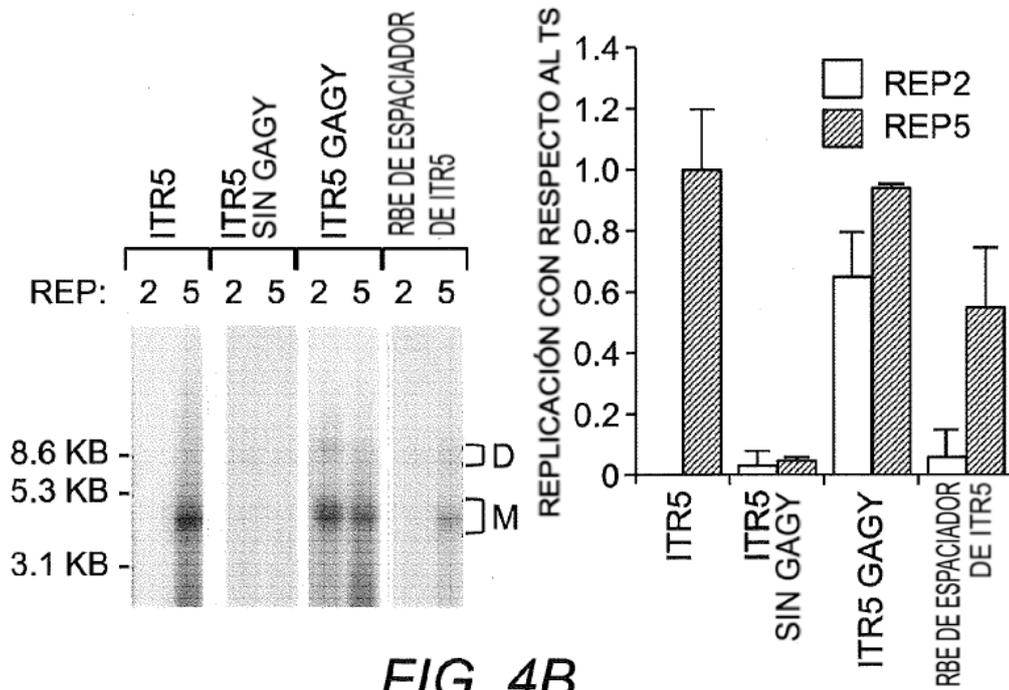


FIG. 4B


```

      |           |           |
REP5 MATFYEVIVRVFPDVEEHLPGISDSFVDWVTGQIWELPPESDLNLTVEQ 50
REP2 MPGFYEIVIKVPSDLIDGHLPGISDSFVNWVAEKEWELPPDSMDLNLIEQ 50
      * . ***:>::* *:: *****:**: : *****:**:*.**:*

      + + ++           | |
REP5 PQLTVADRIRRVFLYEWNKFSKQ-ESKFFVQFEKGSEYFHLHTLVETSGI 99
REP2 APLTVAEKLQRDFLIEWRRVSKAPEALFFVQFEKGESYFHMHVLETTGV 100
      , *****:>::* ** **.:** *: *****..**:*.***:*;

      ^^ ^^ ^^ . + +           ^ ^^ ^ ^
REP5 SSMVLGRYVSQIRAQLVKVVFQGIIEPQINDWVAITKVKK--GGANKVVD 147
REP2 KSMVLGRFLSQIREKLIQRIRYRGIEPTLPNWFVAITKTRNGAGGKNKVDE 159
      .*****:>::* ** *:: :>::***** : :*.**.*.:: **.***.*.

      |           |
REP5 GYIPAYLLPKVQPELOWAWINLDEYKLAALNLEERKRLVAQFLAESSORS 197
REP2 CYIPNYLLPKTQPELOWAWINMEQYLSACLNLTERKRLVAQHLTHVSQTQ 200
      *** *****.*****:>::* *.**.* *****.*.:. ** .

REP5 -QEASQREFSADPVIKSKTSQKYM 222
REP2 EQNKENQNPNSDAPVIRSKTSARYM 225
      *; .*. * ***:***** ;**
    
```

FIG. 5A

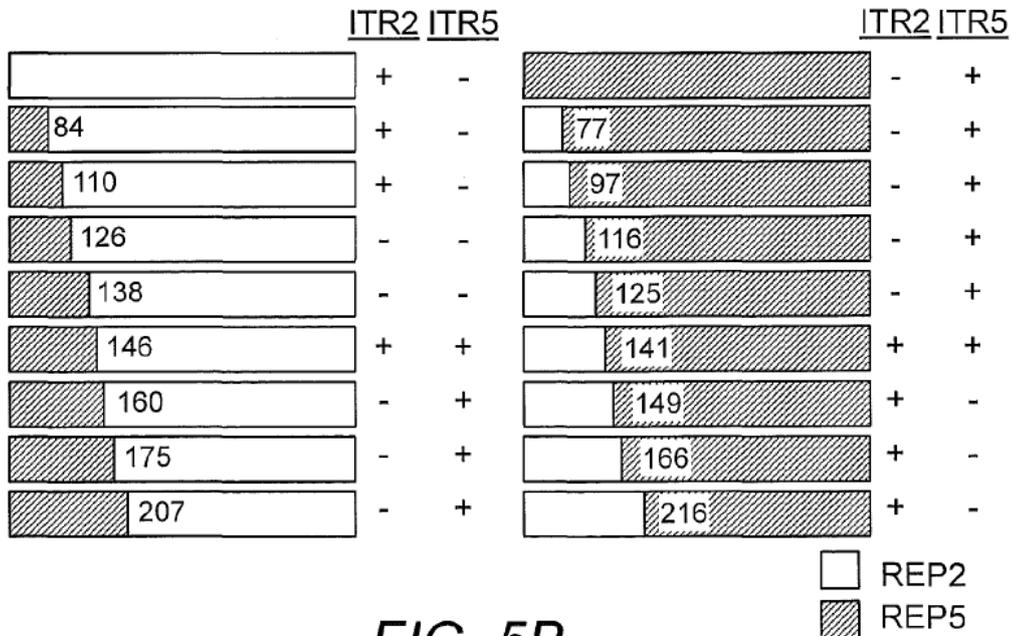


FIG. 5B

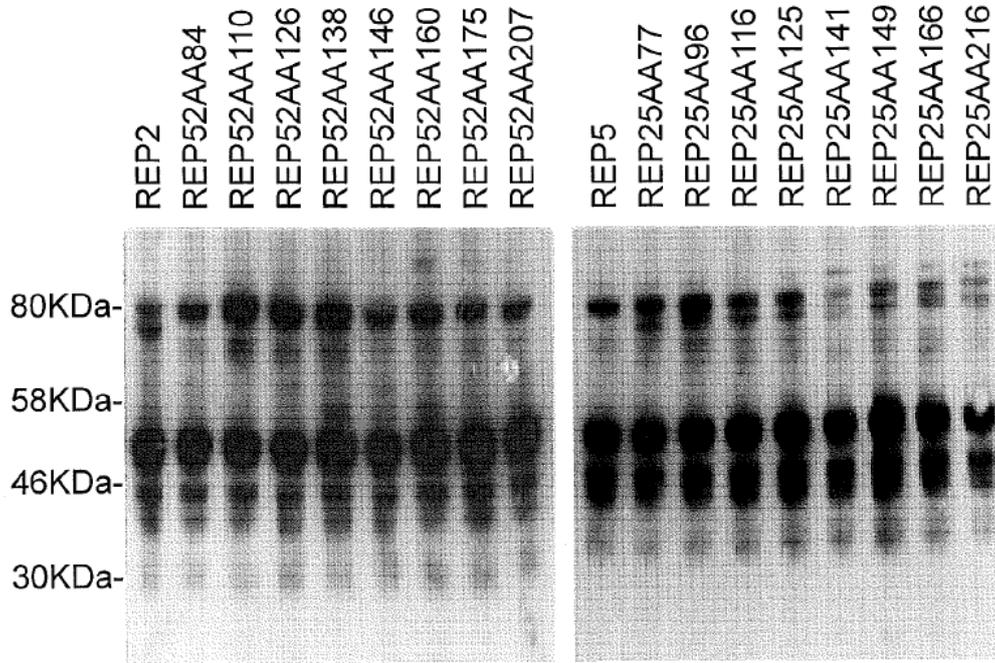


FIG. 5C

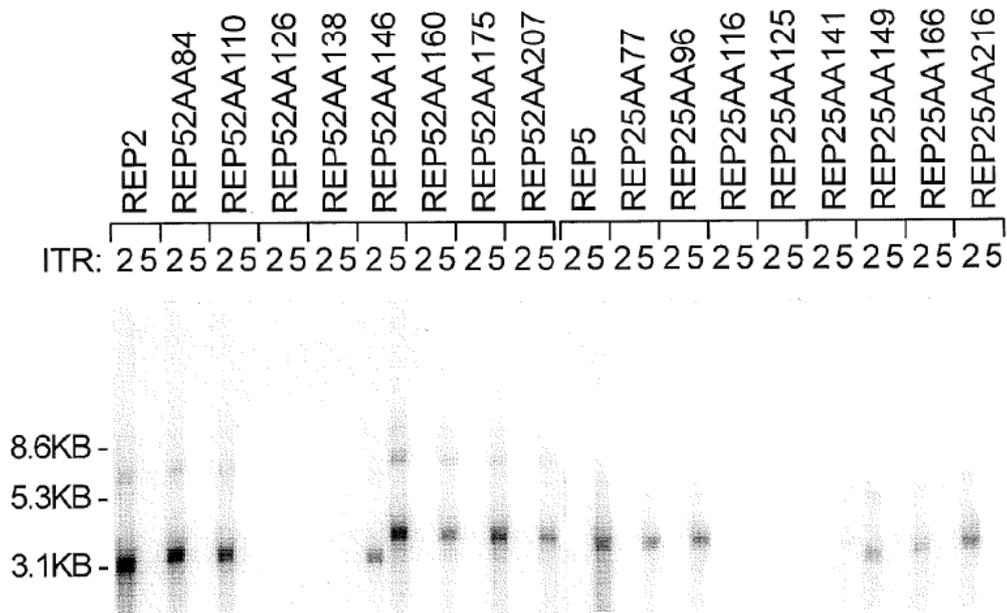


FIG. 5D

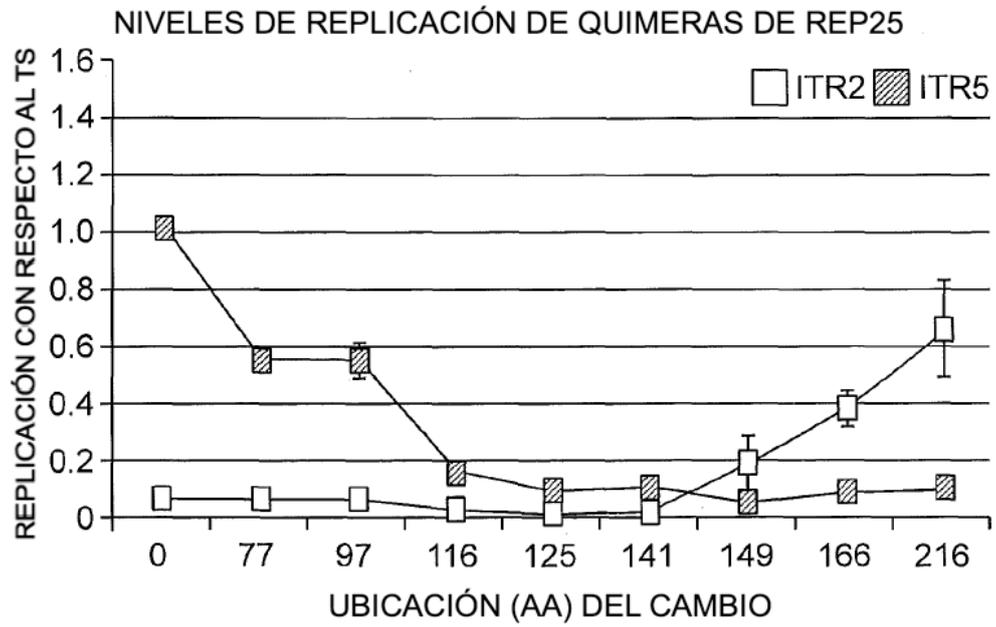
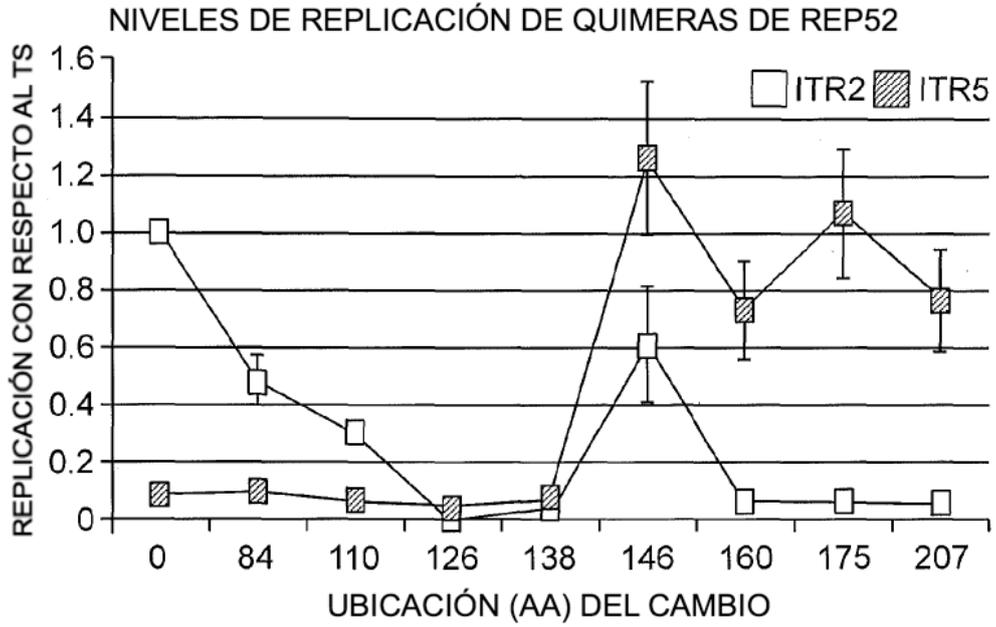


FIG. 5E

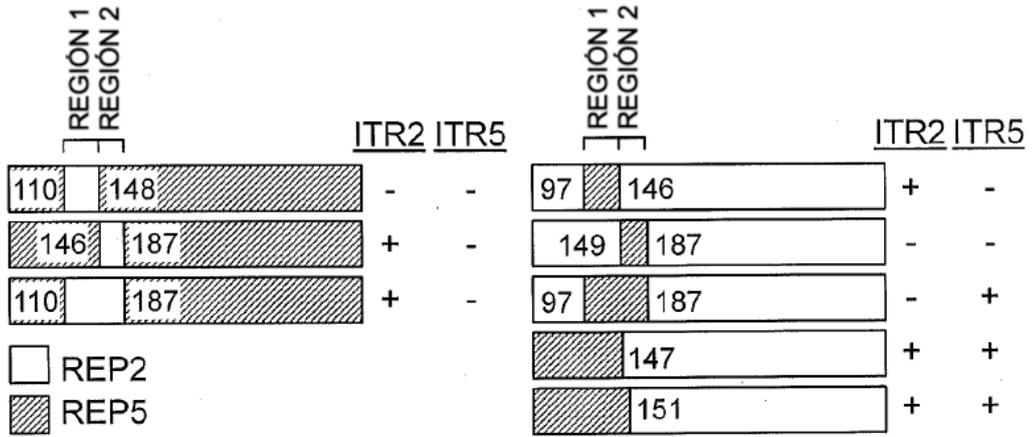


FIG. 6A

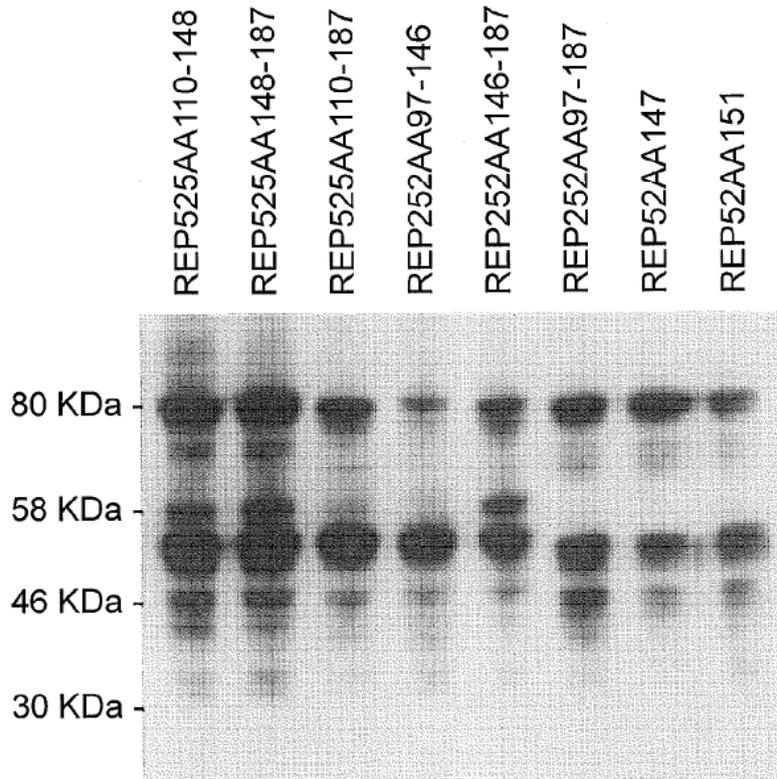


FIG. 6B

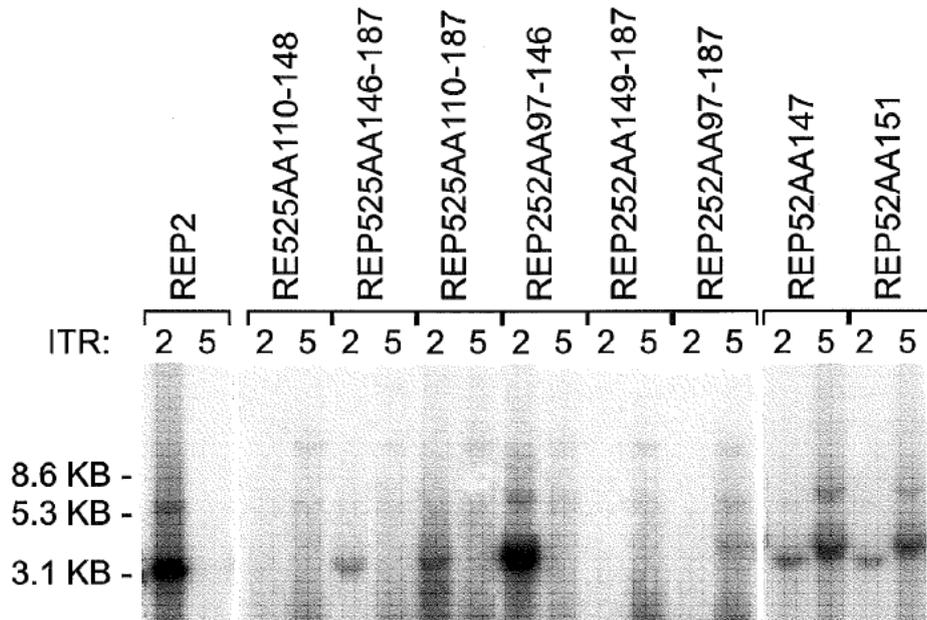


FIG. 6C

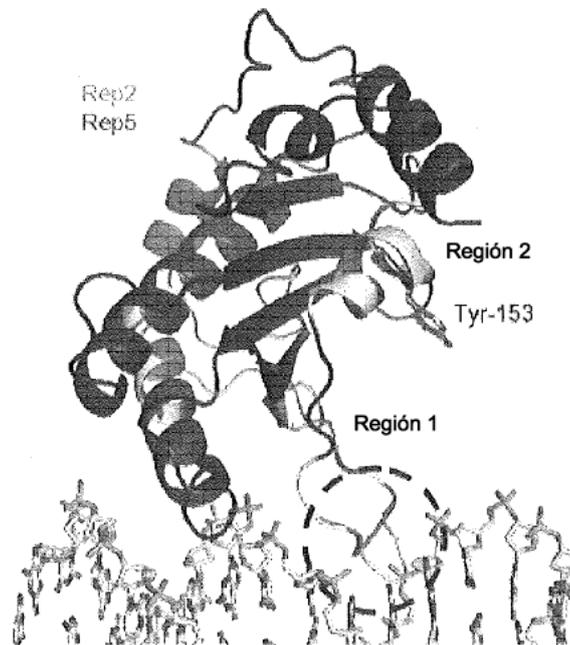


FIG. 6D

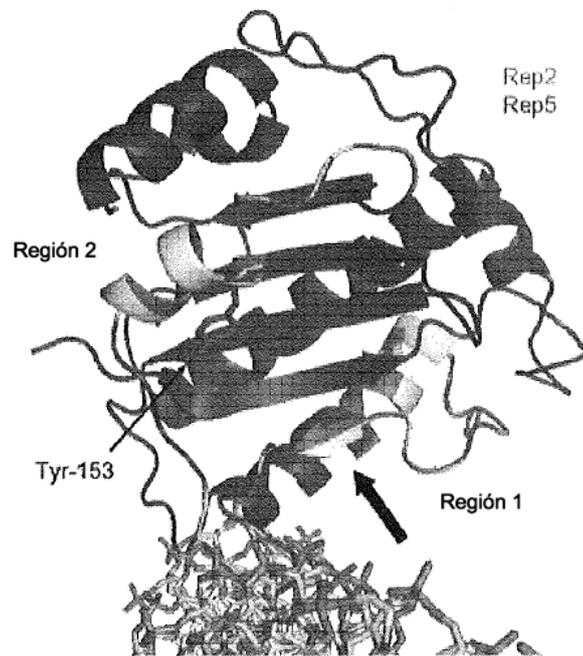


FIG. 6E

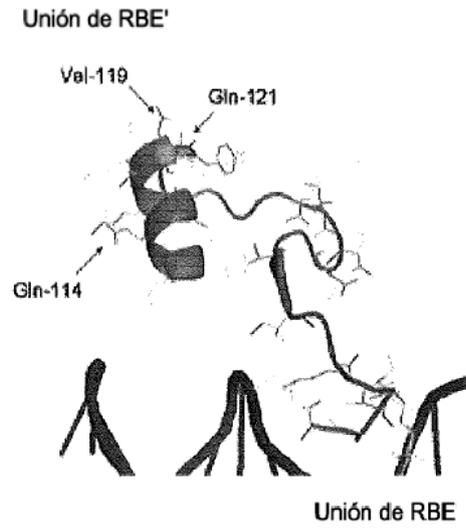


FIG. 6F

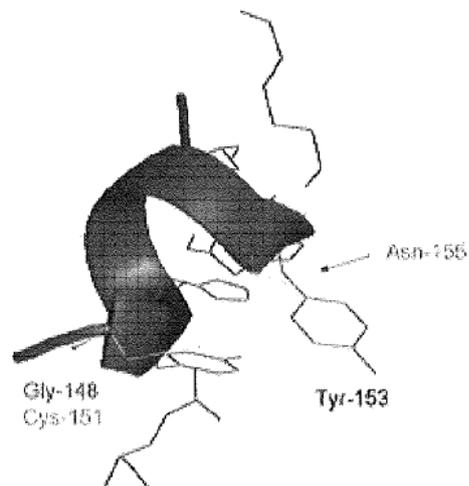


FIG. 6G

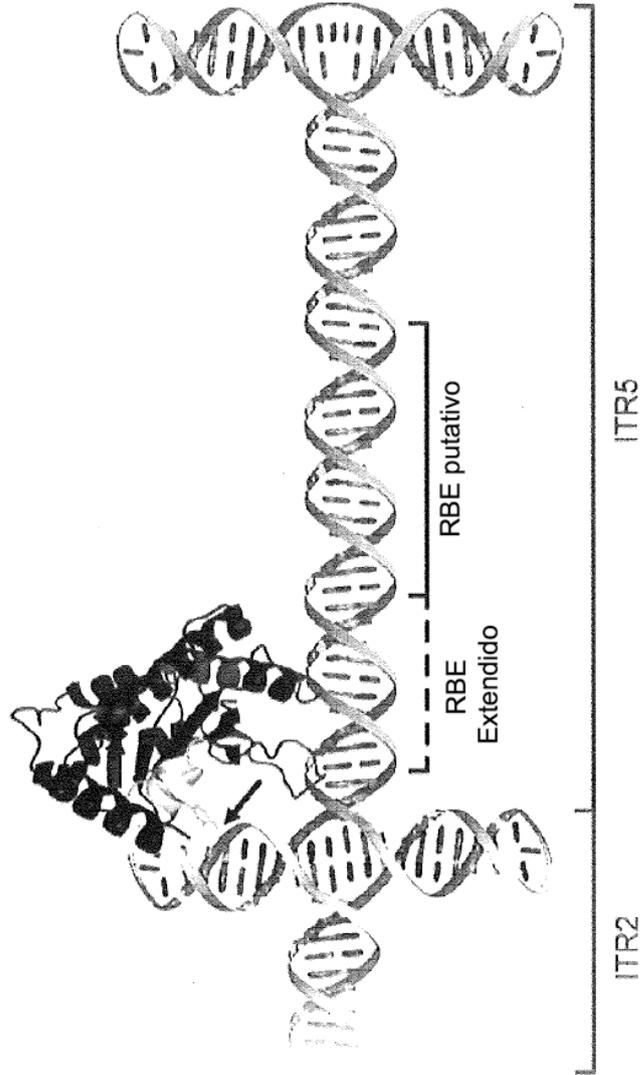


FIG. 7C

AAV-1, (SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. NC_002077 Y XIAO BT AL. (1999) J. VIROL. 73:3994

TTGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCGGTTGGGGCCTGCCGACCAAAGGTCCGCAGACGGCA
GAGCTCTGCTCTGCCGGCCCCACCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGCAACTCCATCACTA
GGGGTAATCGCGAAGCGCCTCCCACGCTGCCGCGTCAAGCGTGAACGTAATTAACGTCATAGGGGAGTG
GTCCTGTATAGCTGTACAGTGTGCTTTTGGACATTTTGGACACCACGTTGGCCATTTAGGGTAT
ATATGGCCGAGTGTAGCGAGCAGGATCTCCATTTTGAACCGGAAATTTGAACGAGCAGCAGCCATGCCG
GGCTTCTACGAGATCGTGTCAAGGTGCCGAGCGACCTGGACGAGCACCTGCCGGGCATTTCTGACTC
GTTTGTGAGCTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGCTGCCCGGATTTCTGACATGGATCTGAATCTGA
TTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTCTGGTCCAATGGCCCGCGTG
AGTAAGGCCCGGAGGCCCTCTTTCTTTGTTCAAGTTCGAGAAGGGCGAGTCTTACTTCCACTCCATAT
TCTGGTGGAGACCACGGGGTCAAATCCATGGTGTGGGCGCTTCTGAGTCAGATAGGGACAAGC
TGGTGCAGACCATCTACCGCGGGATCGAGCCGACCTTGCCCAACTGGTTCCGCGTGCACCAAGACGCGT
AATGGCCCGGAGGGGGGAACAAGGTGGTGGACGAGTGTACATCCCCAACTACCTTCTGCCAAGAC
TCAGCCCGAGCTGCAGTGGGCGTGGACTAACATGGAGGAGTATATAAGCGCCTGTTTGAACCTGGCCG
AGCGCAAACGGCTCGTGGCGCAGCACCTGACCCACGTCAGCCAGACCCAGGAGCAGAACAGGAGAAT
CTGAACCCCAATTTCTGACGCGCTGTCTCCGGTCAAAAACCTCCGCGCGTACATGGAGCTGGTCCG
GTGGTGGTGGACCGGGCATCACCTCCGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCGTACATCT
CTTTCAACGCGCTTCCAACCTCGCGTCCAGATCAAGGCGCTCTGGACAATGCCGGCAAGATCATG
GGCTGACCAAATCCGCGCCCGACTACCTGGTAGGCCCGCTCCGCGCGGACATTA AAAACCAACCG
CATACCCGCTCTGGAGCTGAACGGTACGAACCTGCCTACGCGCGCTCCGTTCTTCTCGGCTGGG
CCGAGAAAAGTTCCGGAAGCGCAACACTCTGGCTGTTTGGGCGGCCACCAAGCAAGCAAC
ATCGCGGAAGCCATCGCCACGCGCTGCCCTTCTACGGCTCGTCAACTGGACCAATGAGAATTTTCC
CTTCAATGATTGCGTGCACAAGATGGTGTCTGGTGGGAGGAGGGCAAGATGACGGCCAAGGTCTGG
AGTCCGCCAAGGCCATTCTCGGCGGCAGCAAGGTGCGCGTGGACCAAAAAGTGAAGTCTCGCCCGAG
ATCGACCCCAACCCCGTGTACCTCAACCAACAACATGTGCGCGTGTGACGGGAACAGCAC
CACCTTCCGAGCACCAGCAGCGGTTGCGAGGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCGCTCTGGAGC
ATGACTTTGGCAAGGTGACAAAGCAGGAAGTCAAAGAGTCTTCCGCTGGGCGCAGGATCACGTGACC
GAGGTGGCGCATGAGTTCTACGTGAGAAAGGTTGGAGCCAAACAAAAGACCCGCCCCGATGACGCGGA
TAAAAGCGGACCCAAAGCGGGCTGCCCTCAGTCCGCGATCCATCGACGTGACAGCGCGAAGGAGCTC
CGGTGGACTTTGCCGACAGGTAACAAAACAATGTTCTCGTCAACGCGGGCATGCTTCAAGTGTCTGTT
CCCTGCAAGACATGCGAGAGAATGAATCAGAATTTCAACATTTGCTTCAACGACGGGACGAGAGACTG
TTCAGAGTCTTCCCGCGTGTGAGAATCTCAACCGTGTGTCAGAAAGAGGACGATCGGAAACTCT
GTGACCATTCATCTGCTGGGGCGGGCTCCCGAGATGCTTGTCTCGGCTGCGATCTGGTCAACGTTG
GACCTGGATGATGTTTCTGAGCAATAAATGACTTAAACAGGTATGGTGGCGGATGGTTATCTTC
CAGATTTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTCGCGAGTGGTGGGACTTGAACCTGGAGCCCG
AAGCCCAAGCCAAACGACAAAAGCAGGACGCGCGGGTCTGGTGTCTTCTGGTACAAGTACTCT
CGGACCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGTTCAACGCGGCGGACGACGCGGCCCTCGAGCAG
ACAAGGCTACGACGAGCAGCTCAAAGCGGTGACAATCCGTAACCTGCGGTATAACACGCGCGACGCC
GAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGC
CAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGCTCTCGGAAAGAAC
GTCCGGTAGAGCAGTCCGCAAGAGCCAGACTCCTCCTCGGGCATCGGCAAGACAGGCCAGCAGCCC
GCTAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAAGTGGGCACTACTACAATGGCTTCAAGCGGCGCAGCACTTGG
AGAACCTCCAGCAACCCCGCTGTGTGGGCACTACTACAATGGCTTCAAGCGGCGCAGCACTTGG
CAGACAATAACGAAGGCGCCGAGGGGTAATGCTTCAAGAAATGGCATTGCGATTCCACATGG
CTGGGCGACAGAGTCAACACCAGCACCCGACCTGGGCTTGGCCACTACAATAACCACTCTA
CAAGCAAACTCCAGTGTCTCAACGGGGGCGCAACGACAACCACTACTTCCGCTACAGCACCCCT
GGGGTATTTTGGATTTCAACAGATTTCACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAGCGACTCATCAAC
AACAAATGGGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAACCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCA
GACGAATGATGGCGTCAACAACCATCGTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCG
AGTACCAGCTTCCGTACGTCCTCGGCTCTGCGCACAGGGCTGCTCCTCCCTCCGTTCCCGGCGGACG
TTCATGATTCGCAATACGGCTACCTGACGCTCAACAATGGCAGCAGCAAGCCGTGGGACGTTCACTCT
TTACTGCCTGGAATATTTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACGGGCAACAACCTTTACCTTCACTACACCT
TTGAGGAAGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGTATGAATCCTCTC
ATCGACCAATAACCTGTATTACCTGAACAGAATCAAATCAGTCCGGAAGTGCCCAAAAACAAGGACTT
GCTGTTTAGCCGTGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTCAAGCCAAAACCTGGCTACCTGGACCTGTT
ATCGGCAGCAGCGCTTTCTAAAACAAAACAGACAACAACAACAGCAATTTTACCTGGACTGGTGTCT
TCAAAATATAACCTCAATGGGCGTGAATCCATCATCAACCTGGCACTGCTATGGCCTCACACAAGA
AGCAAGACAAGTTCTTTCCATGAGCGGTGTCTGATGATTTTGGAAAAGAGAGCGCCGGAGCTTCAA
ACACTGCATTGGACAATGTCTGATTAACAGACGAAGAGGAAATTAAGCCACTAACCTGTGGCCACC
GAAAGATTTGGGACCGTGGCAGTCAATTTCCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGTGCA
TGCTATGGGACATTACCTGGCATGGTGTGGCAAGATAGAGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATTTGGG
CCAAAATTCCTCACACAGATGGACACTTTCACCCGTCCTCTTATGGGCGGCTTTGGACTCAAGAAC
CCGCTTCTCAGATCCTCATCAAAAACACGCTGTTTCTGCGAATCCTCCGGCGGAGTTTTTCACTAC
AAAGTTGCTTCAATTCATCAACCAATACTCCACAGGACAAGTGTGGAAATTAAGTGGGACTGCTG
AGAAGAAAACAGCAAGCGCTGGAATCCGGAAGTGCAGTACACATCCAATTAATGCAAAATCTGCCA
GTTGATTTTACTGTGGACAACAATAAGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCATTTGGCACCCGTTACCTTAC
CCGTCCCTGTAATTAAGTGTAAATCAATAAACCGGTTGATTGTTTCAAGTTGAACCTTGGTCTCCTG
TCCTTCTTATCTTATCGGTTACCATGGTTATAGCTTACACATTAACCTGCTTGGTGTGGCTTCCGCA
AAAGTCTACGTCAATCGGTTACCCCTAGTGTGAGTTGCCACTCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGC
TCGGTGGGGCCTGCCGACCAAAGGTCCGCGAGCGGAGAGCTCTGCTCTGCCGGCCCCACCGAGCGAG
CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGGCAA

FIG. 8

AAV-2, (SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. NC_001401 Y
 CHIORINI ET AL. (1999) J. VIROL. 73:1309
 TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCC
 GGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCCATCACTA
 GGGGTTCCCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACGTGAATACCTCATAGGGTTAGGGAGGTCCTGTATTAGAG
 GTCACGTGAGTGTGTTGCGACATTTGCGACACCCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGAG
 CACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTGAACGCGCAGCCGCGATGCCCCGGGTTTTACGAGAT
 TGTGATTAAGTCCCCAGCGACCTTGACGGGCATCTGCCCGCATTTCTGACAGCTTTGTGAACGGG
 TGGCCGAGAAAGGATGGGAGTTGCCGCCAGATTTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCC
 CTGACCCGTGGCCGAGAAGCTGACGCGGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGCCCCGGA
 GGCCCTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGACAGTGTCTCGTGGAAACCA
 CCGGGGTGAAATCCATGGTTTTGGGACGTTTTCTGAGTCAGATTTCCGGAATAACTGATTGAGAGAAAT
 TACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTCAAAAAGACCAAGAAATGGCGCCGAGG
 CCGGAACAAGTGGTGGATGAGTGTACATCCCAATTAACCTTTGCTCCCCAAAACCCAGCCCTGAGCTCC
 AGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTG
 GTGGCGCAGCTCTGACGCACGTGTGCGAGACGCGAGGAGCAGAACAAGAGAAATCAGAATCCCAATTC
 TGATGCGCCGGTATCAGATCAAAAACCTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTGGGTTGGCTCGGCAAGC
 AGGGGATTAACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGCCCTCATAACATCTCCTTCAATGGCGCC
 TCCAACCTCGCGGTCCCAATCAAGGCTGCCTGGACAAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAAC
 CGCCCCGACTACCTGGTGGCCAGCAGCCGCTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTT
 TGGAACTAAACCGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGCTTTCTGGGATGGGCCCCGAAAAAGTTT
 GGCAAGAGGAACCCATCTGGCTGTTTGGGCCGTGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCAT
 AGCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTG
 TCGACAAGATGGTGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCAAGGTCGTGGGATCGGCCAAAGCC
 ATTTCTCGGAGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCTCGGCCAGATAGACCCGACTCC
 CGTGATCGTCACTTCCAACCAACATGTGCGCCGTGATTTGACGGGAACTCAACGACTTCCGAACACC
 AGCAGCCGTTGGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACCTACCCGCGCTCTGGATCATGACTTTGGGAAG
 GTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGA
 ATTTACGTCAAAAAGGTTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGGAGCCCA
 AACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTGACAGCGGAAAGCTTCGATCAACTACGCGAGC
 AGGTACCAAAAACAAATGTTCGTGACGTGGGCTGAAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATCGGCA
 GAGAATGAATCAGAAATCAAATATCTGCTTCACTCACGGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCCTTCCCG
 TGTGAGAATCTCAACCCGTTTCTGTGCTCAAAAAGGGCGTATCAGAAAAGTGTGCTACATTCATCATATC
 ATGGGAAAGGTGCCAGACGCTTGCACCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTCCTT
 TGAACAATAAATGATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACT
 CTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAAGCTCAAACCTGGCCACCACCACCAAGCCCGCAGAGCG
 GCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCTCTGGGTACAAGTACCTCGGACCTTCAACGGACTCG
 ACAAGGGAGAGCCGTCACAGAGGACAGCGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAAGCCTACGACCCGGCAG
 CTCGACAGCCGAGACAAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCGCAGCGGAGTTTTCAGGAGCGCCTTAA
 AGAAGATACGTCCTTTGGGGGCAACCTCGGACCGAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAAGAGGGTCTTTGAAC
 CTCTGGCCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAAAGAGGCCGCTGAGACTCCTCCT
 GTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTT
 TGGTCAGACTGGAGACGACAGACTCAGTACCTGACCCCCAGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCTC
 CTGGTCTGGGAACTAATACGATGGCTACAGGCGAGTGGCGCAACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCGCC
 GACGGAGTGGGTAATCTCCTCGGAAATTTGGCATTGGCATTCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCAC
 CACCAGCACCAGCCTGGGCCCTGCCACCTACAACAACCACTCTACAACAACAATTTCCAGCCAAAT
 CAGGAGCCTCGAAACGACAATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTTGGGGGTATTTGACTTCAACAGA
 TTCCACTGCCACTTTTCAACAGTACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGACCCAA
 GAGACTCAACTTCAAGCTCTTTAAACATTCAAGTCAAAGAGGTCACGCAGAATGACGGTACGACGACGA
 TTGCCAATAACCTTACCAGCAGGTTCAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCCTC
 GGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTCCCGCCGTTCCAGCAGCAGCTCTTCAATGGTGCACAGTATGGATA
 CCTCACCTGAACAACGGGAGTCAGGCAGTAGGACGCTCTTCAATTTACTGCTGAGTACTTTCCCTT
 CTCAGATGCTGCGTACCGGAAACAACCTTACCTTACGCTACACTTTTGGAGAGCTTCTTTCCACAGC
 AGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCTTCTCATCGACCAGTACCCTGATTACTTT
 GAGCAGAACAAACACTCCAAGTGGAAACCACACGACGTCAGGCTTTCAGTTTTCTCAGGCCGGAGCGA
 GTGACATTCGGGACCACTTAGGAACCTGGCTTCTTGGACCTGTACCCGACGACGAGTATCAAAG
 ACATCTGCGGATAACAACAACAGTGAATACTCTGTGACTGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATGGCAG
 AGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCCGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTCTCTC
 AGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAATGTGAACATTTGAAAGGTCATG
 ATTACAGACGAAGAGGAAATCGGAACAACCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATCGTTCTGTATCTAC
 CAACCTCCAGAGAGCAACAGACAAGCAGCTACCCGAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCA
 TGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACTTTAGGGGCCATCTGGGCAAAAGATTCCACACAGCGGACGGA
 CAITTTTCAACCCCTCTCCCTCATGGGTGGATTCCGACTTAAACACCCCTCTCCACAGATTTCTCATCA
 GAACACCCCGTACTTGGCAATCCTTCCAGCACCTTTCAGTGGCGCAAAGTTTGCTTCTTCTCATCACAC
 AGTACTCCACGGGACAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGG
 AATCCCGAAATTCAGTACACTTCCAACACAACAAGTCTGTTAATCGTGGACTTACCGTGGATACTAA
 TGGCGTGTATTGAGAGCCTCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTCGTAACTGTAAATGCTTGTFTA
 ATCAATAAACCGTTTAAATTCGTTTTCAGTTGAACCTTTGGTCTCTGCGTATTTCTTTCTTATCTAGTTT
 CATGGCTACCTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCACTAATACTACAAGGAACCCCTAGTGTGGAGTT
 GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCAGTACTGAGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCAGCAGCCCGG
 GCTTTGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

FIG. 9

AAV-3A, (SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. NC_001729 Y
MURAMATSU ET AL. (1996) VIROLOGY 221:208
TTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGGCGACCAAAGGTGCGCCAGACGGACG
TGCTTTGCACGTCCGGCCCCACCGAGCGAGCGAGTGCATAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGA
GGTATGGCAGTGCAGTAACGCGAAGCGCGGAAGCGAGACCACGCTACCAGCTGCGTTCAGCAGTCAAG
TGACCCCTTTGCGACAGTTTGGCACACCAGTGGCCGCTGAGGGTATATATTTCTCGAGTGAGCGAACCA
GGAGCTCCATTTTACCCGCGAAATTTGAACGAGCAGCAGCCATGCGGGGTTCTACGAGATTTGCTCTGA
AGGTCCCGAGTGCACCTGGACGAGCGCCTGCCGGCATTTCCTAACTCGTTTGTAACTGGGTGGCCGAGA
AGGAATGGGACGTGCCGCCGGAITCTGACATGGATCCGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGG
CCGAAAAGCTTCAGCGCGAGTTCCTGGTGGAGTGGCGCCGCTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTCTTTT
TTGTCCAGTTTCAAAGGGGGAGACTACTTCCACTGACCTGCTGATTGAGACCATCGGGTCAAAT
CCATGGTGGTGGCCGCTACGTGAGCCAGATTAAGAGAAGCTGGTGAACCCGATCTACCCGCGGTCG
AGCCGAGCTTCCGAAGTGGTTCGCGTGACCAAAACGCGAAATGGCGCCGGGGGGGAAACAGGTGG
TGGACGACTGCTACATCCCAACTACCTGCTCCCAAGACCAGCCGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTA
ACATGCCAGCTATTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCGCGGAGCGTAAACCGCTGGTGGCGCATCTGA
CGCACGTGTCGACAGCGCAGGAGCAGAACAAAGAGAATCAGAACCCCAATCTGACGCGCCGCTCATCA
GGTCAAAAACCTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTTCGGGTGGCTGGTGGACCGCGGGATCACGTCAAGAA
AGCAATGGATTTCAGGAGGACAGGCCCTGTAATCTCCTTCAACGCGCCCTCAAATCGCGCTCCAGAG
TCAAGGCCGCGCTGGACAATGCCCTCCAAAGATCATGACCTGACAAAGACCGCTCCGACTACCTGGT
GCAGCAACCCGCGGAGGACATTACCAAAAATCGGATCTACCAAAATCTGGAGCTGAACGGGTACGATC
CGCAGTACGCGCCCTCCGTCTTCTGGGCTGGGCGCAAAGAAGTTCGGGAAGAGGAACACCATCTGGC
TCTTTGGGCGCGCCACGACGGGTAAAACCAACATCGCGGAAGCCATCGCCACGCGCTCCCTTCACG
GCTGCGTAAACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGATTGCGTCCGACAAGATGGTGATCTGGTGGG
AGGAGGGCAAGATGACGGCCAAAGTCTGGAGAGCGCCAAAGGCCATTCTGGGCGGAAGCAAGTGCAGC
TGGACAAAAGTGCAGTCACTCGCCAGATCGAACCCACTCCCGTGTATCGTCACTCAACACCAACA
TGTGCGCCGTGATTGACGGGAACAGCACCACTTCGAGCATCAGCAGCCGCTGCAGGACCGGATTTTG
AATTTGAACCTACCCGCGTTTGGACCATGACTTTGGGAAGGTCAACAAACAGGAAGTAAAGGACTTTT
TCCGGTGGGCTTCCGATCAGTGACTGACGTGGCTCATGAGTTCTACGTGAGAAAGGTTGGAGCTAAGA
AACGCCCCGCTCCAATGACGCGGATGTAAGCGAGCCAAAACAGGGAGTGCACGTCACITGGCGAGCCGA
CAACGTGACAGCGGAAGCACCCGCGGACTACGCGGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGG
GCATGAATCTGATGCTTTTCCCTGTAAAACATGCGAGAGAATGAATCAAATTTCCAATGTCTGTTTTA
CGCATGGTCAAAGACACTGTGGGGAAATGCTTCCCTGGAAATGTGAGAATCTCAACCGTTTCTGTCGTC
AAAAGAAGACTTATCAGAAACTGTGTCCAATTCATCATATCTGGGAAGGGCACCCGAGATTTGCCGTGT
CGCCCTGCGATTTGGCCAATGTGGACTTGGATGACTGTGTTTCTGAGCAATAAATGACTTAAACAGGT
ATGGCTGCTCAGCGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTTTCTGAAGGCAATCTGTCAGTGGT
GCTCTGAACCTGGAGTCCCTCAACCCAAAGCGCAACAAACACAGGACAACCGTTCGGGCTTCTGTG
CTTCCGGTTACAATACTCCGACCCGGTAAACGACTCGACAAAGGAGAGCCGGTCAACGAGGCGGAC
GCGGCAGCCCTCGAACACGACAAGCTTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGTGAACACCCGTACCTCAAG
TACAACACGCGGACGCGGAGTTTTCAGGAGCGTCTCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACCTTGGC
AGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATCCTTGAGCCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGCAGCTAAAACG
GCTCCTGGAAAGAAGGGGGCTGTAGATCAGTCTCCTCAGGAACCCGACTCATCATCTGGTGTGGCAA
TCGGGCAAAACAGCCTGCCAGAAAAGACTAAATTTCCGGTCAAGTGGAGACTCAGAGTCACTCCAGAC
CCTCAACCTCTCGGAGAACCACAGCAGCCCCCAAGTTTGGATCTAATAACAATGGCTTTCAGGCGGT
GGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGTGGCGATGGAGTGGGTAATTCCTCAGGAAATTTGGCATTGC
GATTTCCAAATGGCTGGGCGACAGAGTCAACACCAGCACCAGAACCTGGGCCCAGCCACTTACAAC
AACCATCTCTAACAGCAATCTCCAGCAATCAGGAGCTTCAAACGACAACCACTACTTTGGCTACAGC
ACCCCTTGGGGGATTTTGAATTTAACAGATTTCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCCACTC
ATTAACAACAACCTGGGGATTTCCGGCCCAAGAACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTTAGAGGG
GTCAAGCAGAACGATGGCAGCAGACTATTGCCAATAACCTTACCAGCAGGTTCAAGTGTTTACGGAC
TCGGAGTACAGTCCGTACGTGCTCGGTCCGCGCAACCAAGGCTGTCTCCCGCGTTTCCAGCGGAC
GTCTTCATGGTCCCTCAGTATGGATACCTCACCCTGAACAACGGAAGTCAAGCGGTGGGACGCTCATCC
TTTTACTGCTGGAGTACTTCCCTTCGAGATGCTAAGGACTGGAATAAATCTCCAATTCAGCTATACC
TTGAGGATGTAACCTTTTACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTTTGGATCGCTTGATGAATCCTCTT
ATTGATCAGTATCTGTACTACCTGAACAGAACGCAAGGAACAACCTCTGGAACAACCAACCAATCACGG
CTGCTTTTTAGCCAGGCTGGGCTCAGTCTATGTCCTTTGACGGCCAGAAATTTGGCTACCTGGGCCCTGC
TACCGGCAACAGAGACTTTCAAAGACTGCTAACGACAACAACAACAGTAACCTTCCITGGACAGCGGCC
AGCAATATCATCTCAATGGCCGCGACTCGTGGTGAATCCAGGACCAGCTATGGCCAGTCAACAAGGAC
GATGAAGAAAAATTTTTCCCTATGCAAGCAATCAATATTTGGCAAAGAAGGGACAACGGCAAGTAAAC
GCAGAATTAGATAATGTAATGATTACGGATGAAGAAGAGATTCTGACCACCAATCTGTGGCAACAGAG
CAGTATGGAAGTGTGGCAATAAATTTGACAGACTCAAATACAGCTCCCAGACTGGAAGTGTCAATCAT
CAGGGGCTTACCTGGCATGGTGTGGCAAGATCGTGACGTGTACCTTCAAGGACCTATCTGGGCAAAG
ATTCTCACACGGATGGACACTTTTCACTCTCTCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAACATCCGCT
CCTCAAATCATGATCAAAAATACTCCGTACCGGCAAAATCCTCCGACGACTTTTCCAGCCGCAAGTTT
GCTTCAATTTACTCACTCACTCCACTGGACAGGTGAGCGTGGAAATTTAGTGGGACTACAGAAAGAA
AACAGCAAACTTTGGAATCCAGAGATTCAGTACACTTCCAACATAACAAGTCTGTTAATGTGGACTTT
ACTGTAGACACTAATGGTGTATATAGTGAACCTCGCCCTATTGGAACCCGGTATCTCACACGAACTTG
TGAATCTGTGTTAATCAATAAACCGTTTAAATTCGTTTCAAGTTGAACTTTGGCTCTTGTGCACTCTTTA
CTTTTACTTGTTTTCCATGGCTACTGCGTAGATAAGCAGCGGCTGCGGCGCTTCCGCTTCCGCTTTA
CAACTGCTGGTTAATATTTAACTCTCGCCATACCTCTAGTGTGGAGTTGGCCACTCCCTCTATGCGCA
CTCGCTCGCTCGGTGGGGCCTGGCGACCAAAGGTGCGCAGACGACGCTGCTTTGCACGTCCGGCCCCAC
CGAGCGAGCGAGTGCATAGAGGGAGTGGCCAA

FIG. 10

AAV-3B, SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. NC 001863
 TGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCGCTCGCTCGTGGGGCCTGGCGACCAAAGGTGCGCCAGACGGACGT
 GCTTTGACAGTCCGGCCCCACCGAGCGAGCGAGTGCATAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGAG
 GTATGGCAGTACGTAACGCGAAGCGCGCGAAGCGAGACCACGCTACCAGCTGCGTCAAGCAGTCAAGT
 GACCTTTTTCGACAGTTCGCGACACCACGTGGCCGCTGAGGGTATATATTTCTCGAGTGAAGCAACCAG
 GAGCTCCATTTTACCGCGAAATTTGAACGAGCAGCACCATGCCGGGGTTCACGAGATTTGCTCTGAA
 GGTCCCGAGTACCTGGACGAGCACCTGCGGGCATTTCTAACTCGTTTGTAACTGGGTGGCCGAGAA
 GGAATGGGAGCTGCCCGGATTCTGACATGGATCCGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGC
 CGAAAAGCTTCAGCGCGAGTTCCTGGTGGAGTGGCGCCGCTGAGTAAGGCCCGCGAGGCGCTCTTTT
 TGTCCAGTTGAAAAGGGGGAGACCTACTTCCACCTGCACGTGCTGATTGAGACCATCGGGTCAAATC
 CATGGTGGTCCGCGCTACGTGAGCCAGATTAAGAGAAAGCTGGTGACCCGCATCTACCGCGGGTCCA
 GCCGAGCTTCGGAATGGTTCGCGGTGACCAAAACGCGAAATGGCGCCGGGGCGGGAAACAGGTGGT
 GGACGACTGCTACATCCCACTACCTGCTCCCCAAGACCAGCCCGAGCTCCAGTGGCGTGGACTAA
 CATGGCCAGTATTTAAGCGCTGTTTGAATCTCGCGGAGCTAAACGGTGGTGGCGCGCATCTGAC
 GCACGTGTCGACAGCGCAGGAGCAGAACAAGAGAATCAGAACCCCAATTTCTGACGCGCCGGTTCATCAG
 GTCAAAACCTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCCGGTGGCTGGTGGACCGCGGGATCAGTCAAGAAA
 GCAATGGATTGAGGAGCAGGCTCTGATCTCTTCAACGCGCTCCAATCTCGCGTCCCAGAT
 CAAGGCCGCGTGGACAATGCCTCCAAGATCATGAGCTGACAAAGACGGTCCGGACTACCTGGTGGG
 CAGCAACCCGCGCGGAGGACATTACCAAAAATCGGATCTACCAAAATCTGGAGCTGAACGGTACGATCC
 GCAGTACGCGGCTCCGTCTTCTGGGCTGGGCGCAAAAGAAGTTCGGGAAGAGGAACACCATCTGGCT
 CTTTGGGCGCGCCACCGAGTAAAACCAACTCGCGAAGCCATCGCCACGCGCTTCTGTCAGCG
 CTGCGTAAACTGGACCAATGAGAATTTCCCTTCAACGATTCGCTCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGA
 GGAGGGCAAGTACCGCCAAAGTCTGGAGAGCGCCAAAGGCCATTTCTGGGCGAAGCAAGGTCCGCGT
 GGACAAAAGTCAAGTCACTCGGCCAGATCGAACCCACTCCCGTGAATCTCACCTCAAACCAACAT
 GTGCGCCGTGATTGACGGGAACAGCACCACCTTCGAGCATCAGCAGCCGCTGCAGGACCGGATGTTTAA
 ATTTGAATTTACCGCGCTTGGACCATGACTTTGGGAAGGTCAACAAACAGGAAGTAAAGGACTTTTT
 CCGGTGGGCTCCGATCAGGTGACTGACGTGGCTCATGAGTTCACGTCAAGAGGTGGAGCTAAGAA
 ACGCCCCGCTCCAATGACGCGGATGTAAGCGAGCCAAAACGGCAGTGCACGTCACTTGGCAGCCGAC
 AACGTCAAGCGCGAAGCACCGGCGGACTACGCGACAGGTACCAAAAACAATGTTCTCGTCAAGTGGG
 CATGAATCTGATGCTTTTCCCTGTAACAATCGCAGAGAATGAATCAAATTTCCAATGTCGTTTAC
 GCATGTTCAAAGAGACTGTGGGAATGCTTCCCTGGAAATGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCGTCAA
 AAAGAAGACTTATCAGAACTGTGTCAAATTCATCATATCTTGGGAAGGGCACCCGAGATTGCTGTTC
 GGCCTCGCATTTGGCCAATGTGGACTTGGATGACTGTGTTCTGAGCAATAAATGACTTAAACCAGGTA
 TGGCTGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTTTCTGAAGGCATTCGTGAGTGGTGGG
 CTCTGAACCTGGAGTCCCTCAACCCAAAGCGAACCAACAACACAGGACAACCGTCCGGGCTTTGTG
 TTCCGGGTTACAAATACCTCGGACCCGGTAACCGACTCGACAAAGGAGAGCCGTTCAACGAGCGGACG
 CGGACGCCCTCGAACACGACAAAGCTTACGACCGAGCTCAAGGCCGGTGAACAACCCGTACCTCAAGT
 ACAACCCAGCGCGCCGAGTTTCAGGACCGTCTTCAAGAAGATAAGTCTTTTGGGGCAACCTTGGCA
 GAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATCCTTGGAGCTTCTGGTCTGGTGGAGGAGCAGTAAAACGG
 CTCCTGGAAAGAAGAGGCTGTAGATCAGTCTCTTCAAGAACCGGACTCATCATCTGGTGTGGCAAAAT
 CGGGCAACAGACTTCCAGAAAAGACTAAATTTCCGTTCAAGTCTGAGACTGGCGACTCAGAGTCAAGGAC
 CTCAACCTCTCGGAGAACACCAGCAGCCCCACAGTTTGGGATCTAATAACAATGGCTTCAGGCGGTG
 GCGACCAATGGCAGACAATAACGAGGGTGCAGATGGAGTGGGTAATTCCTCAGGAAATTTGGCATTTGCG
 ATTTCCAATGGTGGGCGACAGAGTCACTACCACCAGCACCAGAACCTGGGCCCTGCCACTTACAACA
 ACCATCTCTACAAGCAAATCTCCAGCCAATCAGGAGCTTCAAACGACAACCACTACTTGGCAGCAGCA
 CCCCTTGGGGTATTTTGAATTTAACAGATTTCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTCA
 TTAACAACAACCTGGGATTTCCGGCCAAAGAACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACATCAAAGTTAAAGAGG
 TCAAGCAGAACGATGGCAGCAGACTATTGCCAATAAACCCTTACCAGCAGGTTCAAGTGTTTACGGACT
 CGGAGTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTGGCGCACCAAGGCTGTCTCCCGCCGTTTCCAGCGGACG
 TCTTATGGTCCCTCAGTATGGATACCTCACCTGAAACAACGGAAGTCAAGCGGTGGGACGCTCATCT
 TTTACTGCTGGAGTACTTCCCTTCGAGATGCTAAGGACTGGAAATAACTTCCAATTCAGTATACCT
 TCGAGGATGTAACCTTTTACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTTTGGATCGCTTGATGAATCTCTTA
 TTGATCAGTATCTGACTACCTGAACAGAAGCAAGGAACAACCTCTGGAACAACCAACCAATCACGGC
 TGCTTTTATAGCCAGCTGGGCTCAGTCTATGCTTTTCAGGCGCAGAAATTTGGCTACCTGGGCCCTGT
 ACCGGCAACAGACTTTCAAAGACTGCTAACGCACAACAACAGTAACCTTCTTGGACAGCGGCCA
 GCAAATATCATCTCAATGGCCGCGACTCGCTGGTGAATCCAGGACCAGCTATGGCCAGTCAACAGGACG
 ATGAAGAAAATTTTCCCTATGCACGGCAATCTAATATTTGGCAAAGAAGGGACAACGGCAAAGTAAAG
 CAGAATTAGATAATGTAATGATTACGGATGAAGAAGAGATTTCGTACCACCAATCTGTGGCAACAGAGC
 AGTATGGAACCTGGCACAATAACTTGCAGAGCTCAAATACAGCTCCACAGACTAGAACTGTCAATGATC
 AGGGGGCCTTACCTGGCATGGTGTGGCAAGATCTGACGTGTACCTTCAAGGACCTATCTGGGCAAGA
 TTCTCACACGGATGGACACTTTCATCTTCTCTCTGATGGGAGGCTTTGGACTGAAACATCCGCTC
 CTCAAATCATGATCAAAAATACTCCGGTACCCGGCAAATCTCCGACGACTTTAGCCCGGCAAGTTT
 CTTTATTTTATCACTCAGTACTCCACTGGACAGGTGAGCGTGGAAATTTGAGTGGGAGCTACAGAAAGAAA
 ACAGCAACCGTTGGAATCCAGAGATTGATACACTTCCAATACAACAAGTCTGTTAATGTTGACTTTA
 CTGTAGACACTAATGGTGTTTATAGTGAACCTCGCCCTATTGGAAACCCGGTATCTCACACGAAACTTGT
 AATCTTGGTTAATCAATAAACCGTTTAAATTCGTTTCAAGTTGAACTTTGGCTCTTGTGCACTTCTTATCT
 TATCTTGTTTCCATGGCTACTGCGTAGATAAGCAGCGCCCTGCGGCGCTTGGCCTTCCGCGTTTACAAC
 TGCTGGTTAATATTTAACTCTCGCCATACCTCTAGTGGATTGGCCACTCCCTCTATGCGCACTCG
 CTCGCTGGTGGGCGGACGTGCAAAGCACGTCCTGCTGGCGACTTTGGTGGCCAGGCCACCGAG
 CGAGCAGTGCATAGAGGGAGTGGCCAA

FIG. 11

AAV-4, SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. NC_001829 Y
 CHIORINI AT AL. (1997) J. VIROL. 71:6823
 TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGTCACTCACTCGGCCCTGGAGACCAAAGGTCTCCAGACTGCCG
 GCCTCTGGCCGGCAGGGCCGAGTGAGTGAGCGAGCGCGCATAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCATCTAG
 GTTTGCCCACTGACGTCAAATGTCAGCGTCTTAGGGTTAGGGAGGTCCCTGTATTAGCACTCACGTGAGTG
 TCGTATTTTCGCGGAGCGTAGCGGAGCGCATACCAAGCTGCCACGTCACAGCCACGTGGTCCGTTTGGCA
 CAGTTTGGGACACCAATGTGGTTCAGGAGGGTATAATAACCGCGAGTGAGCCAGCGAGGAGCTCCATTTTGC
 CCGCAATTTTGAACGAGCAGCAGCCATGCCGGGTCTACGAGATCGTGTGAAGGTGCCAGCGACC
 TGGACGAGCACCTGCCCGCATTTCTGACTCTTTTGTGAGCTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGCTGC
 CGCCGATTTCTGACATGGACTTGAATCTGATTTAGCGAGCGCCCTGACCGTGGCCGAAAAGCTGCCAAC
 GCGAGTTCTGTGAGTGGCGCGCGTGGTAAAGCCCCGGAGGCCCTCTCTTTTGTCCAGTTCCGAGA
 AGGGGACAGCTACTTCCACCTGCACATCCTGGTGGAGACCGTGGGGCTCAAATCCATGGTGGTGGGCC
 GCTACCTGAGCCAGATTAAGAGAGAGCTGGTACCCGCATCTACCGCGGGTTCAGCCGAGCTCCGA
 ACTGGTTTCGCGGTGACCAAGACCGCTAATGGCGCGGAGGCGGGAAACAAGGTGGTGGACGACTGCTACA
 TCCCCAATACCTGCTCCCCAAGACCCAGCCGAGCTCCAGTGGGGCTGGACTAACATGGACCAGTATA
 TAAGCCCTGTTTGAATCTCGCGGAGCGTAAACCGCTGGTGGCGCAGCATCTGACCGACTGTCGCGAGA
 CGCAGGAGCAGAACAAGGAAAACCGAACCCTAATCTGACGCGCGCGTCACTGAGTCAAAAACCTCCG
 CCAGTACATGGAGCTGGTCCGGTGGCTGGTGGACCGCGGGATCAGTCAAAAAGCAATGGATCCAGG
 AGGCCGATTTCTGACATCTCCTTCAACGCGCGCTCCAACCTCGCGTCAAAAACCTGCGCGCTGG
 ACAATGCTCCAAAATCATGAGCCTGACAAAAGACCGCTCCGACTACCTGGTGGGCCAGAACCCGCGG
 AGGACATTTCCAGCAACCGCATCTACCGAATCCTCGAGATGAACGGTACGATCCGCGTACGCGCCCT
 CGTCTTCTGGGCTGGCGCAAAAGAGGTTTCGGGAAGAGGAACACCATCTGGCTCTTTGGCCGGCA
 CGACGGTAAAACCAACATCGCGGAAGCCATCGCCACGCGTGCCTCTACGGTGGTGAACCTGGA
 CCAATGAGAATTTCCGTTCAACGATTCGGTTCGCAAGATGGTGAATCTGGTGGGAGGAGGGCAAGATGA
 CCGCAAGGCTCGTAGAGAGCGCCAGGCCATCCTGGCGGAAGCAAGGTGCGCGTGGCAAAAAGTGGCA
 AGTCACTGGCCAGATCGACCAACTCCCGTGTCTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCGTCACTG
 ACGGAACTCGACCACCTTCGAGCACCAACAACCACTCCAGGACCGGATGTTCAAGTTCCAGTCAACA
 AGCCCTGGAGCAGACTTTGGCAAGGTCAACAGGAGGAGTCAAAAGACTTTTTCCGTTGGGCGTCAAG
 ATCACTGACCGAGGTGACTCACGAGTTTACGTCAGAAAGGGTGGAGCTAGAAAAGAGGCCCGCCCA
 ATGACCGAGATATAAGTGGCCCAAGCGGGCTGTCGGTCAAGTTGGCAGCCATCGACGTCAAGCGCGG
 AAGTTCGGTACTACGCGGACAGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCACTGGGTATGAATCTGATCG
 TTTTCCCTGCGCGCAATGCGAGAGAAATGAATCAGAATGTGGACATTTGCTTCCGCAAGGGTCACTG
 ACTGTGCGGATGCTTTCCCGTGTGAGAATCTCAACCGTGTCTGTCTGTCAGAAAGCGGACGTATCAGA
 AACTGTTCGATTCATCACTCATGGGGAGGGCGCCGAGGTGGCTGCTCGCCGTCAGAACTGATCG
 ATGTGACTTGGATGACTGTGACATGGAACAATAAATGACTCAAACAGATATGACTGACGGTTACCTT
 CCAGATTTGGCTAGAGGACAACCTCTCTGAAGGCTTCGAGAGTGGTGGCGCTGCAACCTGGAGCCCT
 AAACCAAGGCAAAATCAACAACATCAGGACAACCGCTCGGGTCTTGTGCTTCCGGTTTACAAATACCTC
 GGACCGGCAACCGACTCGACAAGGGGAACCGTCAACGCGAGCGGACCGCGGAGCCCTCGAGCAGGAC
 AAGCCCTAAGACAGCAGCTCAAGGCGGTGACAACCCCTACCTCAAGTACAACCAACCGCGGAGGAG
 TTCCAGCAGCGGCTTCAGGGCGACATCGTTTGGGGCAACCTCGGCAAGCAGTCTTCCAGGCAAA
 AAGAGGTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTGGAGCAAGCGGGTGGAGCGGCTCCTGGAAGAAGAGACCG
 TTGATTTGAATCCCCCAGCAGCCGACTCCTCCACGGGTATCGGCAAAAAGGCAAGCAGCCGGCTAAA
 AAGAAGCTCGTTTTCGAAGACGAACTGGAGCGGCGGAGCGGACCCCTGAGGGATCAACTTCCGGAGCC
 ATGTCTGATGACAGTGAATGCGTGCAGCAGCTGGCGGAGCTGCAGTCCAGGGCGGCAAGGTGCCGAT
 GGAGTGGGTAATGCCCTCGGGTATTGGCAATTCGCAATCCACTGGTCTGAGGGCCAGTCAAGCACC
 AGCACCAAGCTGGGTCTTGGCCACTCAACAACCAACCTCTACAGCGACTCGGAGAGAGCCTGCAAG
 TCCAACACCTACAACGGATTTCTCCACCCCTGGGGTACTTTGACTTCAACCGCTTCCACTGCCACTTC
 TCACCAGCTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACCACTGGGGCATGCGACCCAAAGCCATGGCGGTTCAA
 ATCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGTCAAGCAGTCAAGCAGTCAAGCAGTCAAGCAGTCAAGCAGTCAAG
 AGCAGGTTTCAAGTCTTTGCGGACTCGTCTGACCACTGCGGTACGTTGATGGATGCGGGTCAAGAGGGC
 AGCCTGCCTCCTTTTCCCAACGACGTCCTTATGGTGGCCAGTACGGCTACTGTGGACTGGTGAACGGC
 AACCTTTCGAGCAACAGACTGACAGAAATGCCCTTCTACTGCTGGAGTACTTTCCCTTCGAGATGCTG
 CGGACTGGCAACAACCTTTGAAATTTAGTTACAGTTTGGAGAAGGTGCCCTTCCACTCGATGTACGCGAC
 AGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGAACCTCTCATCGACCAGTACCTGTGGGGACTGCAATCGACCACC
 ACCGGAACCACTGAATGCCGGGACTGCCAACCAACTTTACCAAGCTGCGGCCCTACCAACTTTTCC
 AACTTAAAAGAACTGGCTGCCCGGGCTTCAATCAAGCAGCAGGGCTTCTCAAGACTGCCAATCAA
 AACTACAAGATCCCTGCCACCGGGTCAAGCAGTCTCATCAATACGAGACGCACAGCACTCTGGACGGA
 AGATGGAGTGCCTGACCCCGGACTTCAATGGCCACGGCTGGACCTGCGGACAGCAAGTTCAAGCAAC
 AGCCAGCTCATTTGCGGGGCTAAACAGAACGGCAACACGGCCACCGTACCCGGGACTCTGATCTTC
 ACCTCTGAGGAGGAGCTGGCAGCCACCAACGCCACCGATACGGACATGTGGGGCAACCTACCTGGCGGT
 GACCAGAGCAACAGCAACCTGCGGACCGTGGACAGACTGACAGCCTTGGGAGCGGTGCTGGAATGGT
 TGGCAAAACAGAGCAATTTACTACCGGGTCCATTTGGGCAAGATTCCTCATACCGATGGACACTTT
 CACCCCTCACCGCTGATTTGGTGGTGGGCTGAAACACCCCGCTCCTCAAATTTTTATCAAGAACC
 CCGTACCTGCGAATCCTGCAACGACTTTCAGCTTACTCCGGTAAACTCCTTCAITACTCAGTACAGC
 ACTGGCCAGGTGTCTGTCAGATTTACTGGGAGATCCAGAAGGAGCGGTCCAAACGCTGGAACCCCGAG
 GTCAGTTTACTTCAACTACGGACAGCAAACTCTCTGTTGTGGGCTCCCGATGCGGCTGGGAAATAC
 ACTGAGCTAGGGCTATCGGTACCCGCTACCTACCCACCCAGCTGTAATAACCTGTTAATCAATAAAC
 GGTATTATCGTTTCACTTGAACCTTTGGTCTCCGTGCTCTTCTATCTTATCTCGTTTCCATGGCTACTG
 CGTACATAAGCAGCGGCTGCGGCGCTTGGCTTCCGGTTTACAACCTGCGGTTAATCAGTAACTTCT
 GGCAACCAAGATGATGGAGTTGGCCACATAGCTATGCGCGCTCGTCACTCACTCGCCCTGGAGACC
 AAAGTCTCCAGACTGCCGGCTCTGGCCGGCAGGGCCGAGTGGTGGAGCGGCGCATAGAGGGAGT
 GGCCAA

FIG. 12

AAV-5, SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. NC_006152 Y CIORINI ET AL. (1999) J. VIROL. 73:1309

CTCTCCCCCTGTGCGTTCGCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGTGGCAGCTCAAAGAGCTGCCAG
 ACGACGGCCCTCTGGCCGTGCCCCCACCAGAGCCAGCGAGCGAGCGAACCGCAGGGGGGAGAGT
 GCCACACTCTCAAGCAAGGAGGTTTGTAAAGCAGTGATGTATAATGATGTAATGCTTATTTGTCACGCG
 ATAGTTAATGATTAACAGTCATGTGATGTGTTTTATCCAATAGGAAGAAAGCGCGCGTATGAGTTCTCG
 CGAGACTTCCGGGTATAAAGACCGAGTGAACGAGCCCGCCGATTCTTTGCTCTGGACTGCTAGAG
 GACCCTCGCTGCCATGGCTACCTTCTATGAAGTCATTTGTTGCGGTCCCATTGACGTGGAGGAACATCT
 GCCTGGAATTTCTGACAGCTTTGTGGACTGGTAACTGGTCAAATTTGGGAGCTGCCCTCCAGAGTCAGA
 TTTAAATTTGACTCTGGTTGAACAGCCTCAGTTGACGGTGGCTGATAGAATTCGCCGCGTGTCTCTGTA
 CGAGTGGAAACAAATTTTCCAAGCAGGAGTCCAAATTTCTTGTGCAGTTTGAAGGGGATCTGAATATTT
 TCATCTGCACACGCTTGTGGAGACCTCCGGCATCTCTCCATGGTCTCGGCCGCTACGTGAGTCAGAT
 TCGCGCCACGCTGGTGAAGTGGTCTTCCAGGGAATTTGAACCCAGATCAACGACTGGGTCGCCATCAC
 CAAGGTAAGAAGGGCGGAGCCAATAAGGTGGTGGATTCTGGGTATAATTTCCCGCTACCTGCTGCCGAA
 GGTCCAACCGGAGCTTCACTGGGGCGTGGACAAACCTGGACGAGTATAAATTTGGCCGCCCTGAATTCGGA
 GGCACCAACCGGCTCGTCCGCGAGTTCTTGGCAGAATCTTCGACGCGCTCGCAGGAGCGGATTCGCA
 GCGTGAGTTCTCGGCTGACCCGGTCACTCAAAAGCAAGACTTCCAGAAATACATGGCGCTCGTCAACTG
 GCTCGTGGAGCACGGCATCACTTCCGAGAACGAGTGGATCCAGGAAAATCAGGAGAGCTACCTCTCTT
 CAACTCCACCGGCAACTCTCGGAGCCAGATCAAGGCGCGCTCGACAACGCCACAAAATTTAGTCT
 GACAAAAGCGCGGTGGACTACCTCGTGGGAGCTCCGTTCCCGAGGACATTTCAAAAAACAGAATCTG
 GCAAATTTTGGAGATGAATGGCTACGACCCCGCTACGCGGGATCCATCTCTACGGCTGGTTCAGCG
 CTCTTCAACAGAGGAACACCGTCTGGCTTACCGACCCGACAGCCGCAAGACTGGGTCGCCATCGCGGA
 GGCCATCGCCACACTGTGCCCTTTACGGCTGCGTGAACTTGGACCAATGAAAACCTTTCCCTTTAATGA
 CTGTGTGGACAAAATGCTCATTTGGTGGGAGGAGGAAAGATGACCAACAAGTGGTGAATTCGCGCAA
 GGCCATCTTGGGGGCTCAAAGGTGGGTCGATCAGAAATGTAATCTCTGTTCAAATGATTTCTAC
 CCTGTCTATGTAACCTCCAATACAACTGTGTGTGGTGGTGGATGGGAATTCACAGACTTTGAACA
 CCAGCAGCCGCTGGAGGACCGCATGTTCAAATTTGAAGTACTAAGCGGCTCCCGCCAGATTTTGGCAA
 GTTACTAAGCAGGAAGTCAAGGACTTTTTGCTTGGGCAAGGTCAATCAGGTGCGGACTCAGCA
 GTTTAAAGTTCCAGGGAATTTGGCGGAACTAAAAGGGCGGAGAAATCTCTAAAACGCCCTGGGTGA
 CGTCAACAACTAGCTATAAAAAGCTGGAGAAAGCGGGCCAGGCTCTCATTTGTTTCCCGAGAGCGCTCG
 CAGTTCAGAGTGACTGTTGATCCCGCTCTCTGCGACCGTCAATTGGAATTAAGGATGATTTGCAA
 ATGTGACTATCATGCTCAATTTGACAACATTTCTAACAAATGTGATGAATGTGAATATTTGAATCGGGG
 CAAAATGGATGTATCTGTCACAATGTAACCTCACTGTCAAATTTGTCTATGGGATTTCCGCCCTGGGAAA
 GGAAACTTGTAGATTTTGGGATTTTGCAGTATGCAAGTCAAGTCAAGTAAAGAAAGTAAAGCGAGTACTCAT
 GTCTTTTGTGATCACCTCCAGATTTGGTGGGAAAGTTGTTGAAGGTCTTCCGCGAGTTTTTGGCCCT
 TGAAGCGGGCCACCAGAACCAAAACCCAACTCAGCAGCATCAAGATCAAGCCCGTGGTCTGTGCTGCC
 TGGTTATAACTATCTCGACCCGGAACGGTCTCGATCGAGGAGAGCCTGTCAACAGGGCAGGAGGT
 CGCGGAGAGCACAGCATCTCGTACAACGAGCAGCTTGGGCGGGAGACAACCCCTACCTCAAGTACAA
 CCACCGGAGCGCGGAGTTTCAAGGAAAGCTCGCCGACGACACATCTTCCGGGAAACCTCGGAAAGGC
 AGTCTTTCAAGCAAGAAAAGGGTTCTCGAACCTTTTGGCTGGTTGAAGAGGGTCAAGAGGATTTGCC
 TACCGGAAAGCGGATAGACGACCACTTTTCAAAAAGAAAGAAAGGCTCGGACCGAAGAGGACTCCAAGCC
 TTTCCACTCTCTCAGACCGCGAAGCTTGACCCAGCGGATCCAGCAGCTGCAATTTCCAGCCCAACAGC
 CTCAAGTTTGGGAGCTGATACAATGTCTGCGGAGGTGGCGGCCATTTGGGCGAACAATAAGAGGTGC
 CAGTTGGAGTGGCAATGCTCTCGGAGATTGGCATTGCGATTTCCAGTGGATGGGGGACAGAGTCTGTAC
 CAAGTCCACCGAACCTGGTGTCTGCCAGCTTACAACAACCAAGTACCGAGAGATCAAAGCGGCTC
 CGTGCAGCGAAGCAACGCCAACGCTACTTTGGATACAGCACCCCTGGGGTACTTTGACTTTAACCCG
 CTTCACAGCCACTGGAGCCCGGAGACTGGCAAAGACTCATCAACAACACTAGTTGGGCTTCAGACCCCG
 GTCCCTCAGAGTCAAATCTTCAACATTTCAAGTCAAAGAGGTCAAGGTCAGGACTCCACCACCACTAT
 CGCCAAACACTCACCTCCACCGTCCAAGTGTTTACGGACGACGACTACCAGCTGCCCTACGTCTGTCCG
 CAAAGGACCGGAGGATGCTTCCCGGCTTCCCTCCGAGGTCTTTACGCTGCGCGAGTACGGTTACGC
 GACGCTGAACCGGACAACACAGAAAATCCACCGAGAGGAGCAGCTTCTTCTGCTAGAGTACTTTCC
 CAGCAAGATGCTGAGAACGGCAACAACCTTTGAGTTTACCTACAACCTTTGAGGAGGTGCCCTCCACTC
 CAGCTTCGCTCCAGTCAGAACCTCTTCAAGCTGGCCAAACCCGCTGGTGGACAGTACTTTGACCGCTT
 CGTGAGCACAAATAACACTGGCGGAGTCCAGTTCAACAAGAACCTGGCCGGGAGATACGCCAACACCTA
 CAAAACGGGTTCCCGGGCCCATGGCCGAACCCAGGGCTGGAACCTGGGCTCCGGGGTCAACCGCGC
 CAGTGTGAGCGCTTCCGCCACGACCAATAGGATGGAGCTCGAGGGCGGAGTTACCAGGTGCCCGCA
 GCCGAACGGCATGACCAACAACCTCCAGGGCAGCAACACCTATGCCCTGGAGAACACTATGATCTTCAA
 CAGCCAGCCGGGAAACCCGGGACCAACCCGCTACCTCGAGGGCAACATGCTCATCACCAGCGAGAG
 CGAGACGACGCGGTGAACCGGCTGGCGTACAACGTCGGCGGCGAGATGGCCCAACAACCCAGAGCTC
 CACCATGCCCGCGACCGGCAGTACAACCTCCAGGAAATCGTGCCCGGACGCTGTGGATGGAGAG
 GGAGTGTACTTCAAGGACCATCTGGCCAAAGTCCAGAGACGGGGCGACTTTTACCCTCTCC
 GGCCATGGGCGGATTCGACTCAAACACCCACCGCCATGATGCTCATCAAGAACACGCTGTGCCCGG
 AAATATCACCAGCTTCTCGGAGTGGCGCTCAGCAGCTTCACTACCCAGTACAGCACCGGGCAGGTCA
 CGTGGAGATGGAGTGGGAGCTCAAGAAGGAAAACCTCAAAGAGGTGGAACCCAGAGATCAGTACACAAA
 CAACTACAACGACCCCGAGTTTGTGGACTTTGCCCGGACAGCACCGGGGAAATACAGAACCACAGACC
 TATCGGAACCCGATACCTTACCAGACCCCTTTAACCCATTCATGCTCGCATACCTCAATAAACCGTGT
 TCGTGTGAGAGTGTGGCACTCTCCCCCTGTGCGTTGCTGCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGCG
 ACGCCAGAGGGCGTCTGTCGAGCTCTTTGAGCTGCCACCCCCCAAACGAGCCAGCGAGCGAGCG
 AACCGACAGGGGGGAGAG

FIG. 13

AAV-6, SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. NC 001862
 TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGGGCGACC^{AA}AGGTGCGCCGACGCCCC
 GGCTTTGCCCCGGGCGCCCTCAGTGAGCGGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGG
 GGTTCCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACGTGAAT^{TA}ACGT^{CA}TAGGGTTAGGGAGGTCTGTATTAGAGGTC
 ACGTGAGTGT^{TT}TGCGACAT^{TT}TGCGACACCATGTGGTCA^{CG}CTGGGTAT^{TT}TAAGCCCAGGTGAGCACG
 CAGGGTCTCCAT^{TT}TGAAGCGGGAGG^{TT}TGAACGCGCAGCGCCATGCCGGG^{TT}TACGAGATTGTGAT
 TAAGGTCCCCAGCGACCT^{TT}GACGAGCATCTGCCCGCAT^{TT}CTGACAGCT^{TT}TGAACTGGGTGGCCGA
 GAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGT
 GGCCGAGAAGCTGCAGCGGACT^{TT}CCTGGTCCAGTGGCGCGCGT^{GAG}TAAGGCCCGGAGGCCCTCTIT
 CTTTGTTCAGTTCGAGAAGGGCGAGTCTACT^{TT}CCACT^{CC}ATATTCTGGTGGAGACCACGGGGGTCAA
 ATCCATGGTGTGGGCCCT^{TT}CCTGAGTCAGATTAGGGACAAGCTGGTGCAGACCATCTACCGCGGAT
 CGAGCCGACCCCTGCCAACTGGT^{TT}CGCGGTGACCAAGACGCGTAATGGCGCCGAGGGGGGAACAAGGT
 GGTGGACGAGTGTACATCCCCAACTACCTCCTGCCAAGACTCAGCCCGAGCTGCAGTGGGCGTGGAC
 TAACATGGAGGAGTATA^{TA}AGCGCGTGT^{TT}AAACCTGGCCGAGCGCAAACGGCTCGTGGCGCACGACCT
 GACCCAGCTCAGCCAGACCCAGGAGCAGAACAAGCGGAATCTGAACCCCAATCTGACGCGCCTGTCTAT
 CCGTCAAAAAACCTCCGCAAGCTACATGGAGCTGTTCGGGTGGCTGGTGGACCGGGGCATCACCTCCGA
 GAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCGTACATCTCCTTCAACGCGCCCTCCAACCTCGCGTCCCA
 GATCAAGGCGCTCTGGACAATGCCGCAAGATCATGGCGCTGACCAATCCGCGCCCGACTACCTGGT
 AGGCCCGCTCCGCCCGCGACATTAAACCAACCGCAT^{TT}TACCGCATCTGGAGCTGAACGGCTACGA
 CCTGCTACGCGCGCTCCGTCT^{TT}CTCGGCTGGGCCAGAAAAGG^{TT}CGGAAAACGCAACCCATCTG
 CTTGT^{TT}TGGGCCCGCCACCAAGGCAAGACCAACTCGCGGAAGCCATGCCCAAGCCGTGCCCTCTA
 CGGCTGGTCAACTGGACCAATGAGAACT^{TT}CCCT^{TT}CAACGATTGCGTGCACAAGATGGTGTCTGGT
 GAGGAGGGCAAGATGACGGCCAAGGTCTGGAGTCTCGCCAAGGCCATTCTCGCGCGCAGCAAGGTGCG
 GTGGACCAAAAAGTCAAGTCTCGCCAGATCGATCCCACCCCGTGTCTGCTCACCAACACCACTGCT
 CATGTGCGCCGTGAT^{TT}GACGGGAACGACCCACTCTGAGCACAGCAGCCCTTGCAGCACAGCAGCCGTT
 CAAATTTGAACTCACCCGCGTCTGGAGCATGACT^{TT}TGGCAAGGTGACAAAGCAGGAAGTCAAAGAGTT
 CTTCCGCTGGGCGCAGGATCAGTGCACCGAGGTGGCGCATGAGT^{TT}CTACCTCAGAAAGGTTGGAGCCAA
 CAAGAGACCCCGCCGATGACGGCCAAGGTCTGGAGTCTCGCCAAGGCCATTCTCGCGCGCAGCAAGGTGCG
 GTGGACCAAAAAGTCAAGTCTCGCCAGATCGATCCCACCCCGTGTCTGCTCACCAACACCACTGCT
 ATCGACCTCAGACCGGAAAGGAGCTCCGGTGGACT^{TT}TGCCGACAGGTACCAAAAACAATGTTCTCGTCA
 CCGCGGCTAGCTCAGATGCTGT^{TT}CCCTGCAAAAACATGCGAGAGAATGAATCAGAAT^{TT}TCAACAT^{TT}TG
 CTTCAAGCAGCGGACCCAGAGACT^{TT}TCAGAATGTT^{TT}CCCCGGCGTGT^{TT}CAGAATCTCAACCGGCTCGT
 AAAGAGGACGTATCGGAAACTCTGTGCCAT^{TT}CATCATCTGCTGGGGCGGGCTCCCAGATTGCTTGTCT
 GGCTTGGATCTGGTCAACGTGGATCTGGATGACTGTGT^{TT}CTGAGCAATAAATGACT^{TT}AAACAGGTA
 TGGTTCGGATTGTTATCT^{TT}CCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTCGCGAGCTGGT
 ACTTGAAACCTGGAGCCCGAAAACCAAGCCAAAGCAGCAAAAAGCAGGACGACCGCGGGGTCTGGTGC
 TTCTTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACCGACTCGACAAGGGGGAGCCCTCAACGCGCGGATG
 CAGCGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCGCAGCTCAAAGCGGTGACAATCCGTACCTGCGGT
 ATAAACCCCGCAGCCGAGT^{TT}TGAGGCGTCTGCAAGAAGATACTGTCT^{TT}TGGGGCAACTCCGGC
 GAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGAGGGTCTCGAACCT^{TT}TGGTCTGGTTGAGGAAGGTGCTAAGACGG
 CTCTGGAAAGAAACGTCCGGTAGAGCAGTCCGCAAGAGCCAGACTCCTCCTCGGGCATTGGCAAGA
 CAGGCCAGCAGCCCGCTAAAAGAGACTCAAT^{TT}TGGT^{TT}CAGACTGGCGACTCAGACTCAGTCCCGGACC
 CACAACCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCTGTGGGACCTACTACAATGGCTT^{TT}CAGGCGGTG
 GCGACCAATGGCAGACATAACGAAGGCGCGCAGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAAT^{TT}GGCATTGGC
 ATTCACATGGCTGGGCGACAGAGTCA^{TT}CACCAGCACCCGAAACATGGGCT^{TT}GGCCACCTATAACA
 ACCACCTCTACAAGCAAACTCTCAGTGTCTCAACGGGGCCAGCAACGACAACCACTACT^{TT}CGGCTACA
 GCACCCCTGGGGGTAT^{TT}TGAT^{TT}CAACAGATTCCACTGCCATT^{TT}CTCACCAGTGTACTGGCAGCGAC
 TCA^{TT}CAACAACAAT^{TT}GGGAT^{TT}CCGGCCAAAGAGACTCAACT^{TT}CAAGCT^{TT}CAACATCCAAGTCAAG
 AGGTCAAGCAAGTGAATGGCGTCAAGACCATCGCTAATAACCTTACAGCACGGTCAAGTCTTCTCGG
 ACTCGGAGTACAGT^{TT}GGCGTACGTCTCGGCTCTGCGCACAGGGCTGCCTCCTCCGTTCCCGCGCG
 ACGTGT^{TT}CATGAT^{TT}CCGAGTACGGCTACCTAACGTCAACAATGGCAGCCAGGAGTGGGACGGTCAI
 CCT^{TT}TACTGCTCGGAATAT^{TT}CCCATCGCAGATCTGAGAAACGGGCAATAACT^{TT}TAACCTTCAAGCTACA
 CCTTCGAGGACGTGCC^{TT}TTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGCTGATGAATCCTC
 TCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGAACAGAACTCAGAATCAGTCCGGAAGTGCCAAAACAAGGACT
 TGCTGT^{TT}TAGCCGGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGT^{TT}CAGCCAAAACCTGGCTACCTGGACCCTGTT
 ACCGGCAGCAGCGGT^{TT}CTAAAACAAAACAGACAACAACAACAGCAACT^{TT}TACCTGGACTGGTGTCT
 CAAAATATAACCTTAATGGGCGTGAATCTATAATCAACCCCTGGCAC^{TT}GTATGGCTCACACAAGAGC
 ACAAGACAAGT^{TT}CTTCCATGAGCGGTGT^{TT}CATGAT^{TT}TGGAAAGGAGAGCGCCGAGCTTCAAACA
 CTGCAATGGACAATGT^{TT}CATGATCACAGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAAACCCGTGGCCACCGAAA
 GAT^{TT}TGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGTGCATGTTA
 TGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACTGCAGGCTCCTAT^{TT}TGGGCCAAAA
 TTCTCACACGGATGGACACT^{TT}TACCCGTCTCCTCATGGGCGGCT^{TT}TGGACTAAGCACCCGCTC
 CTCAGATCCTCATCAAAAACAGCCTGTCTCTGCGAATCCTCCGGCAGAG^{TT}TTTGGCTACAAAGTTG
 CTTCA^{TT}TATCATCCCAAGTATTCCACAGGACAAGTGAAGCTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAA
 ACAGCAACCGTGGAAATCCGAAAGTGCAGTATACATCTAACTATGCAAAAATCTGCCAACGTTGAT^{TT}CA
 CTGTGGACAACAATGGACT^{TT}TATACTGAGCCTCGCCCAT^{TT}GGCACCCGTTACTCACCCGTCCCCTGT
 AATGTGTGTTAATCAATAAACCGGT^{TT}TAATCTGTGTCAGTGAAC^{TT}TGGTCTCATGTCTGTATTATCT
 TATCTGGTCAACATAGCAACCGGTTACACATTAACCTGCTTAGTTGGCTTCCGCAATACCCCTAGTCT
 GGAGTTGCCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCGGTGGGGCGGGCAGAGCAGAGCTCTGCCGTCT
 GCGGACCT^{TT}TGGTCCGACAGCCCCACCGAGCGAGCGAGCGCATAGAGGGAGTGGGCAA

FIG. 14

AAV-7, SECUENCIA COMPLETA, GENBANK. ACCESO NO. AF513851 Y GAO ET
 AL. (2002) PNAS 99:11854
 TTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGCTCGCTCGGTGGGGCCCTGCGGACCAAGGTCCGCAGACGGCAG
 AGCTCTGCTCTGCGCGCCACCGAGCGAGCGCGCATAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGG
 GGTACCGGAAGCGCCTCCACGCTGCGCGTCAAGCGCTGACGTAAATCAGCTCATAGGGGAGTGGTCC
 TGTATTAGCTGTACGTGAGTGTCTTTGCGACATTTTGGCAGACCCAGTGGCCATTTGAGGTATATATG
 GCCGAGTGGAGCAGCAGGATCTCCATTTTGGACCGGAAATTTGAACGAGCAGCAGCCATGCCGGTTTC
 TACGAGATCGTGATCAAGGTGCGGAGCGACCTGGACGAGCACCTGCCGGGCATTTCTGACTCGTITGTG
 AACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGCTGCCCGCGATTTCTGACATGGATCTGAATCTGATCGAGCAG
 GCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGACGCGGACTTCTTGGTCCAATGGCGCCGCTGAGTAAGGCC
 CCGGAGGCCCTGTTCTTTGTTTCACTTCCGAGAAGGGCGAGAGCTACTTCCACCTTCCAGTTCCTGGTGGAG
 ACCACGGGGGTCAAGTCCATGGTGTAGGCCGCTTCTTGGATCAGATTCCGGGAGAAGCTGGTCCAGACC
 ATCTACCGCGGGTCCAGCCACGCTGCGCAACTGGTTCGCGGTGACCAAGACGCGTAATGGCGCCGCG
 GGGGGAAACAAGGTGGTGGACGAGTGTACATCCCCAACTACCTTCTGCCAAGACCCAGCCGAGCTG
 CAGTGGGCGTGGACTAACATGGAGGATATATAAGCGCGTGTTTGAACCTGGCCGAACGCAACCGCTC
 GTGGCGCAGCACCTGACCCAGCTCAGCCAGACGCGAGGAGCAGAACAAGGAGAATCTGAACCCCAATCT
 GACGCGCCCGTGTACAGGTCAAAAACCTCCGCGCGTACATGGAGCTGGTGGGTGGCTGGTGGACCGG
 GGCATCACCTCCGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCCAGGCCCTCGTACATCTCCTTCAACGCCGCTCC
 AACTCGCGGTCCAGATCAAGGCCGCGCTGGACAATGGCCGCAAGATCATGGCGTGCACCAATCCGCG
 CCGGACTACCTGGTGGGGCCCTCGCTGCCCGCGGACATTAACAACAACCGCATCTACCGCATCTGGAG
 CTGAACGGGTACGATCTGCTACGCGCGCTCGCTCTTTCTCGGCTGGGCCAGAAAAGTTCCGGGAG
 CGCAACACCATCTGGTGTITGGGCCCGCCACCCGCAAGACCAACATTTGCGGAAGCTCCGCCAC
 GCCGTGCCCTTCTACGGCTCGTCAACTGGACCAATGAGAATTTCCCTTCAACGATTCGTTCGACAG
 ATGGTGTCTGGTGGGAGGAGGCAAGATGACGCGCAAGGTCTGGAGTCCGCCAAGGCAATTTCCGG
 GGCAGCAAGGTGGCGTGGACCAAAAAGTGAAGTCTCGGCCAGATCGACCCACCCCGTGTATCGTC
 ACCTCCAACCAACATGTGCGCCGTGATTTGACGGGAACAGCACCACTTCCGAGCACCAGCAGCCGTTG
 CAGGACCGGATGTTCAAATTTGAACCTCACCCGCGTCTGGAGCACGACTTTGGCAAGGTGACGAAGCAG
 GAAGTCAAAGAGTTCTTCCGCTGGGCCAGTGTACGCTGACCGAGGTGGCGCATGAGTTCTACGTCAGA
 AAGGCGGAGCCAGCAAAAGACCCGCCCGGATGACGCGGATATAAGCGAGCCCAAGCGGGCCGCTGCC
 TCACTCGCGGATCCATCGACCTCAGACCGGGAAGGAGCTCCGTTGGACTTTGCCGACAGTACCAAAAC
 AAATGTTCTCGTCAAGCGGGCATGATTGAGATGCTGTTCCCTGCAAAACGTCGCGAGAGATGAATCAG
 AATTTCAACATTTGCTTCAACACCGGGGTGAGAGACTGTTTAGAGTGTTCCTCCGGCGTGTGAGAATCT
 CAACCGGTCTGAGAAAAGAGCGTATCGGAAACTCTGCGGATTCATCATCTGCTGGGAGCCGCGCC
 GAGATTTGCTTGTCCGGCTCGGACCTGTTCAACGTGACCTGGACGACTGCTTTCTGAGCAATAAATG
 ACTTAAACCAGGTATGGCTGCCGATGTTTCTTCCAGATTTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCAT
 TCCGGAGTGGTGGGACTTGAACCTGGAGCCCGAAACCCAAAGCCAAACAGCAAAAGCAGGACAAACGG
 CCGGGTCTGGTGTCTTCCCTGCTACAAGTACCTCGGACCTTCAAACGACTCGACAAGGGGGACCCGT
 CAACCGGGCGGACGCGAGCGCCCTCGAGCACGACAAGGCCCTACGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGA
 TCCGTTACCTGCGGTAAACACCGCCGACCGCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCAATTTGG
 GGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGA
 AGGCGCTAAGACCGCTCTTGCAAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCGTCACCTCAGCGTTCCCGGACTCCTC
 CACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCCAGAAAGAGACTCAATTTCCGTCAGACTGGCGACTC
 AGAGTCAGTCCCGACCCCTCAACCTCTCGGAGAACCTCCAGCAGCGCCCTTAGTGTGGGATCTGGTAC
 AGTGGCTGCAAGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGTGCGGACGGAGTGGTAAATGCCCT
 AGGAATTTGGCATTCGATTCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAATACCACCAGCACCCGAACCTGGGC
 CCTGCCACCTACAACAACCACTCTACAAGCAAACTTCCAGTGAAAACCTGAGGTAGTACCAACGACAA
 CACTTCTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTAAITTTGACTTTAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCC
 ACGTACTGGCAGCGACTCATACAACAACCTGGGGATTCCCGCCAAAGAAGCTGCGGTTCAAGCTCTT
 CAACATCCAGGTCAAGGAGGTACGACGAATGACGCGGTTACGACCATCGCTAATAACCTTACCAGCAC
 GATTCAGGTATTCTCGACTCGGAATACCAGCTGCGGTACGTTCTCGGCTCTGCGCACCGGGCTGCCT
 GCCTCCGTTCCCGGCGGACGCTTTCATGATTCCTCAGTACGGTACCTGACTCTCAACAATGGCAGTCA
 GTCTGTGGGACGTTCCCTCTTCTACTGCTGGAGTACTTCCCTCTCAGATGCTGAGAAGCGGCAACAA
 CTTTGGATTGAGTACAGCTTCCAGGACGTCCTTTCCACAGCAGCTACGCACACAGCCAGAGCCTTGA
 CCGGCTGATGAATCCCTCATCGACCAGTACTTGTACTACCTGGCCAGAACACAGAGTAAACCCAGGAG
 CACAGCTGGCAATCGGGAACCTGCAAGTTTACCAGGGCGGGCCCTTCAACTATGGCCGAACAAGCAAGAA
 TTGGTTACCTGGACCTTGTCTCCGGCAACAAGAGTCTCCAAAACGCTGGATCAAAACAACAACAGCAA
 CTTTGTCTGGACTGGTGGCCACCAATATCACCTGAACGGCAGAACTCGTTGGTTAATCCCGGCGTCCG
 CATGGCAACTCAAGGACGACGAGGACCGCTTTTCCCATCCAGCGGAGTCTGATTTTGGAAAAAC
 TGGAGCAACTACAACAACCTACATTGGAAAATGTGTTAATGACAATGAAGAAGAAATTCCTCTACTAA
 TCCTGTAGCCACGGAAGAATACGGGATAGTACGACCAACTTACAAGCGGCTAATACTGCGACCCAGAC
 ACAAGTTGTCAACAACCGGGAGCCTTACCTGGCATGGTCTGGCAGAACCAGGACGCTGACTGCGAGG
 TCCCATCTGGGCCAAGATTCTCACACGATGGCAACTTTACCCGCTCTCTTTGATGGCGGGCTTTGG
 ACTTAAACATCCGCTCTCAGATCCTGATCAAGAACAACCTCCGTTCCCGCTAATCTCCGGAGGTGTT
 TACTCTGCCAAGTTTGTCTGCTTCACTCACACAGTACAGCACCGGACAAGTCAAGCTGGAAATCGAGTG
 GGAGCTGCAGAGGAAAAACAGCAAGCGCTGGAAACCGGAGATTGAGTACACTTCAACTTTGAAAAGCA
 GACTGGTGTGGACTTTGCGGTGACAGCAGGGTGTITACTCTGAGCCTGCCCTTATGGCACTCGTTA
 CCTCACCCGTAATCTGTAATGTCATGTTAATCAATAAACCGGTTGATTGTTTCACTTGAACCTTTGGTC
 TCCTGTGCTTCTTATCTTATCGGTTTCCATAGCAACTGGTTACACATTAACCTGCTGGGTGCGCTTAC
 GATAAGAACAACCTGACGTCACCGCGTACCCCTAGTGTGAGTGGAGTTGGCCACTCCCTCTATGCGCGCTCGC
 TCGCTCGGTGGGGCTGCGGACCAAGGTTCCGACAGCGCAGAGCTCTGCTCTGCGGCCCCACCGGAGC
 GAGCGAGCGCATAGAGGGAGTGGCCAA

FIG. 15

AAV-8, SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. AF513852 Y GAO ET AL. (2002) PNAS 99:11854

CAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTAGCGCGAAGCGCCTCCCACGCTGCCGCGTACAG
GCTGACGTAAATACGTCATAGGGGAGTGGTCCCTGTATTAGCTGTACGTCAGTGTAGTCTTTTGGCGCAT
TTTGGCACACCACGTTGGCCATTTGAGGTATATATGGCCGAGTGAGCGAGCAGGATCTCCATTTTGGAC
CGCGAAATTTGAACGAGCAGCAGCCATGCCGGGCTTCTACGAGATCGTGATCAAGGTGCCGAGCGAC
CTGGACGAGCACCTGCCGGGCATTTCTGACTCGTTTGTGAACCTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGC
TGCCCCCGGATTTCTGACATGGATCGGAATCTGATCGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCT
GCAGCGCGACTTCCCTGGTCCAATGGCGCCGCGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTCTTCTTTGTTTCA
TTCGAGAAGGGCGAGAGCTACTTTCACCTGCACGTTCTGGTTCGAGACCACGGGGGCAAGTCCATGG
TGCTAGGCGCTTCTGAGTCAGATTTCGGGAAAAGCTTGGTCCAGACCATCTAACCCCAATTCTGACGCG
CCCCACCTTGCCCAACTGGTTCGCGGTGACCAAAGACGCGGTAATGGCGCCGGCGGGGGGAAACAAG
GTGGTGGACGAGTGTACATCCCCAATACCTCCTGCCAAGACTCAGCCCGAGCTGCAGTGGGCGT
GGACTAACATGGAGGAGTATATAAGCGCGTGTGAACCTGGCCGAGCGCAAACGGCTCGTGGCGCA
CCACTGACCCACGTCAGCCAGACGCGAGGAGCAGAACAGGAGAATCTGAACCCCAATTCTGACGCG
CCCGTGTACAGGTCAAAAACCTCCGCGCGCTATATGGAGCTGGTCCGGTGGCTGGTGGACCGGGGCA
TCACCTCCGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCGTACATCTCCTTCAACGCCCGCTCCAA
CTCGCGTCCCAGATCAAGGCCGCGCTGGACAATGCCGCAAGATCATGGCGCTGACCAATCCGCG
CCCGACTACCTGGTGGGCGCTCGCTGCCGCGGACATTACCCAGAACCAGCCTCCGATCCTCCG
CTCTCAACGGCTACGACCTGCCCTACGCCGCTCCGTCTTTCTCGGCTGGGCTCAGAAAAAGTTCCG
GAAACGCAACACCATCTGGCTGTTGGACCCGCCACCACCGGCAAGACCAACATTCGGAAGCCATC
GCCACGCGCTGCCCTTCTACCGCTGCGTCAACTGGACCAATGAGAATTTCCCTTCAATGATTGCG
TCGACAAGATGGTGTGTTGGTGGAGGAGGGCAAGATGACGGCCAAGGTCGTGGAGTCCGCCAAGGC
CATTTCTCGGCGGCAGCAAGGTGCGCGTGGACCAAAGTGAAGTCCGTCGCCCAGATCGACCCACC
CCCGTGTACCTCCAAACACCAACATGTGCGCGTGATGACCGGGAACAGCACCACCTTCGAGC
ACCAGAGCTCTCCAGGACCGGATGTTAAGTTTCAAGTCCGAACTCACCCGCGCTGGAGCAGCATTTGG
CAAGGTGACAAAGCAGGAAGTCAAAGAGTTCTTCCGCTGGGCCAGTGTACGTCAGCCGAGGTGGCG
CATGAGTTTTACGTCAGAAAGGGCGGAGCCAGCAAAGACCCGCCCCCGATGACCGCGGATAAAAAGG
AGCCCAAGCGGGCTGCCCTCAGTCCGGATCCATCGACGTCAGACCGGAAGGAGCTCCGTTGGGA
CTTTCCGACAGGTTACCAAAAACAAATGTTCTCGTCAAGCGGGCATGCTTCAGATGCTGTTTCCCTGC
AAAACGTCGAGAGAATGAATCAGAAATTTCAACATTTGCTTTCACACACGGGGTCAAGAGCTGCTCAG
AGTGTTTCCCGGGCTGTGAGAATCTCAACCGTGTGTCAGAAAGAGGACGATCGGAAACTCTGTGC
GATTCATCATCTTCTGGGGCGGGCTCCCGAGATTGCTTGTCTCGGCCTGCGATCTGGTCAACGTGGAC
CTGGATGACTGTGTTTCTGAGCAATAAATGACTTAAACCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCA
GATTTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCGA
AGCCAAAGCCAAACAGCAAAGCAGGACGACCGCGGGGCTGTTGGTCTTCTGGCTCAAGTACTCT
CGGACCTTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGCTCAACCGCGCGGACGCAAGCCCTCGAGCAC
GACAAGGCCTACGACCAGCAGCTGCAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACCACGCGGACG
CCGAGTTTACGAGAGCTGTGCAAGAAGATACGTTCTTTTGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCA
GGCCAAGAAGCGGGTCTCGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGCGCTCCTGGAAAG
AAGACAGCGGTAGAGCCATCAACCCAGCGTCTCCAGACTCTCTACGGGATCTCGGAAATTTGGCAT
AACAGCCCGCCAGAAAAAGACTCAATTTTGGTTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAAGTCCAGACCCTCA
ACCTCTCGGAAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGACCTAATACAATGGCTGCAGGCGGTGGC
GCCTCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGAGTGGGTAGTTTCTCGGAAATTTGGCATTTGCG
ATTTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAACACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAA
CAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAACGGGACATCGGGAGGAGCCACCAACGACAACACCTACTTC
GGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTACTTTAAGATTCCACTGCCACTTTTACCACGTTGACT
GGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCGGGCCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTCAACAT
CCAGGTCAAGGAGGTACGCGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTCACCAGCACCATC
CAGGTGTTTACGGACTCGGAGTACCAGCTGCCGTACGTTCTCGGCTCTGCCACCAGGGCTGCCTGC
CTCCGTTCCCGCGGACGTTTCTGATTTCCCGAGTACCGCTACCTAACACTCAACAACGGTAGTCA
GGCCGTGGGACGCTCCTCCTTCTACTGCTTGGAAATCTTCTTCTCGCAGATGCTGAGAAACCGGCAAC
AACTTCCAGTTTACTTACACCTTTCGAGGACGTGCCCTTTCACAGCAGCTACGCCACAGCCAGAGCT
TGGACCGGTGATGAATCCTCTGATTTGACCAGTACCTGTACTACTTGTCTCGGACTCAAACAACAGG
AGGCACGGCAAATACGCAGACTCTGGGCTTCAGCCAAGGTGGGCCTAATACAATGGCCAATCAGGCA
AAGAATGGCTGCCAGGACCTGTTACCGCCAACAACCGCTCTCAACGACAACCGGGCAAAAACAACA
ATAGCAACTTTGCCTGGACTGCTGGGACCAAATACCATCTGAATGGAAGAAATTCATTGGCTAATCC
TGGCATCGCTATGGCAACACACAAGACGACGAGGAGCGTTTTTTTTCCAGTAACGGGATCTGATTT
TTTTGGCAAACAATAATGCTGCCAGAGACAATGCGGATACAGCGATGTCTCACCAGCGAGGAAG
AAATCAAAACCACTAACCTGTGGCTACAGAGGAATACGGTATCGTGGCAGATAACTTGCAGCAGCA
AAACACGGCTCCTCAAAATTTGAACGTGCAACAGCCAGGGGGCCTTACCCGGTATGGTCTGGCAGAAC
CGGACGTTGACTACCTGCAGGTTCCATCTGGGCCAAGATTCTTCCACAGCAGCTACGCCACAGCCAGAGCT
CTCCGCTGATGGGCGCTTTGGCCTGAAACATCTCCGCTCAGATCCTGATCAAGAACACGCCTGT
ACCTGCGGATCCTCCGACCACCTTCAACCAGTCAAAGCTGAACCTTTTCATCACGCAATACAGCACC
GGACAGGTGAGCGTGGAAATTTGAATGGGAGCTGCAGAAAGGAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCCGAGA
TCCAGTACACTCAAACTACTACAAATCTACAAGTGTGGACTTTGCTGTTAATACAGAAGCGTGTGA
CTCTGAACCCCGCCCATTTGGCACCCGTTACCTCACCCGTAATCTGTAATTTGCTGTTAATCAATAA
ACCGGTTGATTCGTTTCAAGTTGAACTTTGGTCTCTGCG

FIG. 16

AAV-9, GENBANK .ACCESO NO. AX753250 Y GAO ET AL. (MAYO 14, 2003)
 EP1310571

CAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTAATCGCGAAGCGCCTCCCACGCTGCCGCGTC
 AGCGCTGACGTAGATTACGTCATAGGGGAGTGGTCTGTATTAGCTGTACGTGAGTGCTTTTGC
 GACATTTTGCACACCCACATGGCCATTTGAGGTATATATATGGCCGAGTGAGCGAGCAGGATCTCCA
 TTTTGACCGCGAAATTTGAACGAGCAGCAGCCATGCCGGGCTTCTACGAGATTGTGATCAAGGTG
 CCGAGCGACCTGGACGAGCACCTGCCGGGCATTTCTGACTCTTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAA
 GGAATGGGAGCTGCCCGGATTTCTGACATGGATCGGAATCTGATCGAGCAGGCACCCCTGACCG
 TGGCCGAGAAGCTGCAGCGGACTTCTGGTCCAATGGCGCCGCTGAGTAAGGCCCGGAGGCC
 CTCTTCTTTGTTTCAGTTTCGAGAAGGGCGAGGCTACTTTTACCTGCACGTTCTGGTCCAGACCA
 GGGGGTCAAGTCCATGGTGTAGGCCGCTTCTGAGTCAGATTCGGGAGAAGCTGGTCCAGACCA
 TCTACCGCGGGATCGAGCCGACCCCTGCCCAACTGGTTCGCGGTGACCAAGACCGGTAATGGCGCC
 GGCGGGGGGAACAAGGTGGTGGACGAGTGTACATCCCCAACTACCTCCTGCCCAAGACTCAGCC
 CGAGCTGCAGTGGGCGTGGACTAACATGGAGGATATATAAGCGCGTGCTGAACTGGCCGAGC
 GCAAACGGCTCGTGGCGCAGCACCTGACCCACGTCAGCCAGACGCAGGAGCAGAACAAGGAGAAT
 CTGAACCCCAATTTCTGACGCGCCCGTGTACAGGTCAAAAACCTCCGCGCGCTACATGGAGCTGGT
 CGGGTGGCTGGTGGACCGGGGCATCACCTCCGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCCTCGT
 ACATTCCTTCAACGCGCCTCCAACCTCGCGGTCAGATCAAGGCCGCGCTGAACTGGCCGAGC
 AAGATCATGGCGCTGACCAAAATCCGCGCCCGACTACCTGGTAGGCCCTTCACTTCCGGTGGACAT
 TACGAGAACCGCATCTACCGCATCTGCGACTCAACGGCTACGACCCCTGCCTACGCCGGCTCCG
 TCTTTCTCGGCTGGGCACAAAAGAAGTTCCGGAAACGCAACACCATCTGGCTGTTGGGGCCGGCC
 ACCACGGGAAGACCAACATCGCAGAAGCCATTGCCACGCGCTGCCCTTCTACGGTGGCTGCTCAA
 CTGGACCAATGAGAATTTCCCTTCAACGATTCGCTCGACAAGATGGTGTGTTGGTGGGAGGAGG
 GCAAGATGACGGCCAAGGTCTGGAGTCCGCCAAGGCCATTTCTCGGCGGCAGCAAGGTGCGCGTG
 GACCAAAAAGTGAAGTCTGCGCCAGATCGACCCCACTCCCGTGTGCTCACCTCCAACACCCAA
 CATGTGCGCGTGTGATGACGGGAACAGCACCTTCCAGCACCAGCAGCCTTCCAGGACCGGA
 TGTTTAAGTTCGAACTCACCGCGCTGGAGCAGACTTTGGCAAGGTGACAAAGCAGGAAGTCA
 AAGAGTTCCTCCGCTGGGCCAGTGTACGTCGACCGAGGTGGCGCATGAGTTTTTACGTGAGAAA
 GGGCGGAGCCAGCAAAAAGACCCGCCCCGATGACGCGGATAAAAAGCGAGCCCAAGCGGGCCTGCC
 CCTCAGTCGCGGATCCATCGAGCTCAGACGCGGAAGGAGCTCCGGTGGACTTTGCCGACAGGTAC
 CAAAACAAATGTTCTCGTACGCGGGCATGCTTTCAGATGCTGCTTCCCTGCAAAACGTCGAGAG
 AATGAATCAGAATTTCAACATTTGCTTACACACCGGGTTCAGAGACTGCTCAGAGTGTTCCTCCG
 GCGTGTGAGAATCTCAACCGGTCTGTCAGAAAGAGGACGTATCGGAAACTCTGTGCGATTCAATCA
 CTGTGTTCTGGCAATAAATGACTTAAACAGGTATGGCTGCCGATGGTATCTTCCAGATTTGG
 CTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCGAAGCC
 CAAAGCCAACAGCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGTCTTCTGGCTACAAGTACCTCG
 GACCTTCAACCGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCAC
 GGCAAGGCTTACGACCAGCAGCTGCAGGCGGGTGAACAATCCGTACCTGCGGTATAACCAAGCCGA
 CGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTTCTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGCTCT
 TCCAGGCCAAGAAGCGGGTCTCTGAACCTCTCGGTCTGGTTGAGGAAGGGCTAAGACGGCTCCT
 GGAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCAGCGTTCTCCAGACTCCTTACGGGCTACGGCAA
 GAAAGGCCAACAGCCCGCCAGAAAAGACTCAATTTTGGTTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTTTC
 CAGACCTTCAACCTCTCGGAGAACCTCCAGCAGCGCCCTCTGGTGTGGGACTTAATCAATAAGTCT
 GCAGGCGGTGGCGACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGTAAATTTCTCGGG
 AAATTTGGCATTTGCGATTCCACATGGCTGGGGGACAGAGTCATACCACAGCACCAGCAACCTGGG
 CATTTGCCACCTACAACAACACCTTACAAGCAATCTCCAATGGAACATCGGGAGGAAGCACC
 AACGACAACACCTACTTTGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTTGAATTCACAGATTCAGACTG
 CCACTTCTCACCAGCTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCAAAGAGAC
 TCAACTTCAAGCTGTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTTACGACGAACGAAGGCACCAAGACCATC
 GCCAATAAACCCTTACCAGCACCGTCCAGGTCTTTACGGACTCGGAGTACCAGTACCCTACGTCT
 AGGCTCTGCCACCAAGGATGCTGCCACCGTTTCTGTCAGACGCTTTCATGTTCTCTCAGTACG
 GCTACCTGACGCTCAACAATGGAAGTCAAGCGTTAGGACGTTCTTCTTTCTACTGTCTGGAATAC
 TTCCCTTCTCAGATGCTGAGAACCAGGCAACAACCTTTCAGTTCAGCTACACTTTCGAGGACGTGCC
 TTTCCACAGCAGCTACGCACACAGCCAGAGTCTAGATCGACTGATGAACCCCTCATCGACCAGT
 ACCTATACTACTGGTTCAGAACACAGACAACCTGGAACCTGGGGAACTCAAACCTTTGGCATTTCAGC
 CAAGCAGGCCCTAGCTCAATGGCCAATCAGGCTAGAAAACCTGGGTACCCGGGCCCTGTACCCGTC
 GCAGCGGTCTCCACAACCACCAACCAAAATAACAACAGCAACTTTGCGTGGACGGGAGCTGCTA
 AATTCAGCTGAACGGGAGAGACTCGTAATGAAATCCTGGCGTGGCTATGGCATCGCACAAAGAC
 GACGAGGACCGCTTCTTCCATCAAGTGGGCTTCTCATATTTGGCAAGCAAGGAGCCGGGACGGA
 TGGACTCGACTACGACCCAGGTGCTGATTCAGATTCAGATGAGGAAGAAATTAAGGCCACCAACCTGTAG
 CCACAGAGGAATACGGAGCAGTGGCCATCAACAACAGGCGCTAACACGCAGGCGCAAACCTGGA
 CTTGTGCATAACCAGGGAGTTATTTCTGGTATGGTCTGGCAGAACCAGGACGTGTACCTGCAGGG
 CCTTATTTGGGCTAAAATACCTCACACAGATGGCAACTTTCACCCGTCTCCTCTGATGGGTGGAT
 TTGGACTGAAACACCCACCTCCACAGATTTAATTAATAAATAACACAGTGGCGGAGCAGTCTCCT
 CTTACCTTCAATCAAGCCAAGCTGAACCTTTTCATCACGAGTACAGCACGGGACAAGTCAAGCT
 GGAATCGAGTGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAGCGCTGGAATCCAGAGATCCAGTATACTT
 CAAACTACTACAAATCTACAAATGTGGACTTTGCTGTCAATACCAAGGTGTTTACTCTGAGCCT
 CGCCCCATTTGGTACTCGTTACCTCACCCGTAATTTGTAATTTGCCCTGTTAATCAATAAACCGGTTA
 ATTCGTTTCAGTTGAACCTTTGGTCTCTGCG

FIG. 17

AAV-11, GENES DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL Y DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE, CDS COMPLETO ,
 GENBANK ACCESO NO. AY631966 Y MORI ET AL. (2004) VIROL. 330:375
 ATGCCGGGCTTCTACGAGATCGTGATCAAGGTGCCGAGCGACCTGGACGAGCACCTGCCGGGC
 ATTTCTGACTCGTTTTGTGAACTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGCTGCCCCCGGATTCTGAC
 ATGGATCGGAATCTGATCGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCCGACTTC
 CTGGTCCACTGGCGCCGCGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTCTTCTTTGTTCAGTTGAGAGAAG
 GCGAGTCTTACTTCCACCTCCACGTTCTCGTCGAGACCACGGGGTCAAGTCCATGGTCTTG
 GGCCGCTTCTGAGTCAGATCAGAGACAGGCTGGTGCAGACCATCTACCGCGGGGTTCAGCCCC
 ACGCTGCCCAACTGGTTCGCGGTGACCAAGACGCGAAATGGCGCCGGCGGGGGAACAAGGTG
 GTGGACGAGTGCTACATCCCCAACTACCTCTGCCCAAGACCCAGCCCCGAGCTGCAGTGGGCG
 TGGACTAACATGGAGGAGTATATAAGCGCGTGTCTAAACCTCGCGGAGCGTAAACGGCTCGTG
 GCGCAGCACCTGACCCACGTGACCCAGACGCAGGAGCAGAACAAGGAGAATCTGAACCCGAAT
 TCTGACGCGCCCGTGATCAGGTCAAAAACCTCCGCGCGCTACATGGAGCTGGTTCGGGTGGCTG
 TCGAGCCGGGCATCACCTCCGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCCTCGATCATCTCC
 TTCAACGCCGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAGATCAAGGCCGCGCTGGACAATGCCGGAAAGATC
 ATGGCGCTGACCAATCCGCGCCCGACTACCTGGTAGGCCCGTCTTACCCGCGGACATTAAG
 GCCAACCGCATCTACCGCATCTGGAGCTCAACGGCTACGACCCCGCTACGCGGGCTCCGTC
 TTCTGGGCTGGGCGCAGAAAAAGTTCCGTAACGCAACACCATCTGGTGTTTGGGCCGCC
 ACCACCGGCAAGACCAACATCGCGGAAGCCATAGCCACGCGCCGTGCCCTTCTACGCTGCGTG
 AACTGGACCAATGAGAACTTTCCCTTCAACGATTGCGTCGACAAGATGGTGTCTGGTGGGAG
 GAGGGCAAGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCCGCCAAGGCCATTCTGGGCGGAAGCAAGGTG
 CGCTGGACCAAAAGTGCAGTCTCCGCGCAGATCGACCCACGCCCCGTGATCGTCACTCC
 AACCAACATGTGCGCCGTGATCGACGGGAACAGCACCACTTCGAGCACCAGCAGCCGCTG
 CAGGACCGCATGTTCAAGTTCGAGCTCACCCGCGCTCTGGAGCAGGACTTTGGCAAGGTGACC
 AAGCAGGAAGTCAAAGAGTTCTTCCGCTGGGCTCAGGATCACGTGACTGAGGTGGCGCATGAG
 TTCTACGTGAGAAAGGGCGGAGCCACCAAAAGACCCGCCCCAGTGCAGCGGATATAAGCGAG
 CCCAAGCGGGCCTGCCCTCAGTTCGGGACCATCGACGTCAGACGTCAGACGCGGAAGCACCGTGGAC
 TTTGCGGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCACGCGGGCATGCTTCAGATGCTGTTTCCC
 TGCAAGACATGCGAGAGAATGAATCAGAATTTCAACGTCCTTACGCAAGGGGTGAGAGAC
 TGCTCAGAGTGCTTCCCGGGCGCTCAGAATCTCAACCCGTCGTCAGAAAAAAGACGTATCAG
 AAACGTGCGCGATTCACTCATCTGCTGGGCGGGCACCCGAGATTGCGTGTTCGGCTGCGAT
 CTCGTCAACGTGGACTTGGATGACTGTGTTTCTGAGCAATAAATGACTTAAACAGGTATGGC
 TGCTGACGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTCGCGAGTGGTG
 GGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAGCCCAAGGCCAACCAGCAGAAGCAGGACGACGGCCGGGG
 TCTGGTGTCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCCGT
 CAACGCGGCGGACGCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTAAAGCGGG
 TGACAATCCGTACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGA
 TACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGAGGGTACTCGAACC
 TCTGGGCTGGTTGAAGAAGGTGCTAAAACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGTTAGAGTCACC
 ACAAGACCCGACTCCTCTCGGGCATCGGCAAAAAAGGCAACAACAGCCAGAAAGAGGCT
 CAACTTTGAAGAGGACACTGGAGCCGGAGCAGACCCCTGAAGGATCAGATACCAGCGCCAT
 GTCTTCAACATTTGAAATGCGTGCAGCACCGGGCGGAAATGCTGTGATGCGGGACAAGGTTT
 CGATGGAGTGGGTAATGCCTCGGGTGTATGGCATTGCGATTCCACCTGGTCTGAGGGCAAGGT
 CACAACAACCTCGACCAGAACCTGGTCTTGCCACCTACAACAACCACTGTACTTGCCTCT
 CGAACAACATCAAGCAGCAACACCTACAACGGATTCTCCACCCCTGGGGATATTTTGACTT
 CAACAGATTCCACTGTCACTTCTCACACGCTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACCTGGGG
 ACTACGACCAAAAGCCATGCGCGTTAAAATCTTCAATATCCAAGTTAAGGAGGTCAACAACGTC
 GAACGGCGGAGACTACGGTGCCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATATTTGCGGACTCGTC
 GTATGAGCTCCCGTACGTGATGGACGCTGGACAAGAGGGGAGCCTGCCTCCTTTCCCAATGA
 CGTGTTCATGGTGCCTCAATATGGCTACTGTGGCATCGTGAAGTGGCGAGAATCAGAACCACAA
 GGACAGAAACGCTTTCTACTGCCTGGAGTATTTTCTTCCGAAATGTTGAGAAGTGGCAACAA
 CTTTGAATGGCTTACAACCTTTGAGAAGGTCCGTTCCACTCAATGTATGCTCACAGCCAGAG
 CCTGGACAGACTGATGAATCCCTCCTGGACGACTCCTGTGGCACTTACAGTCGACTACCTC
 TGGAGAGACTCTGAATCAAGGCAATGCAGCAACCACATTTGGAAAAATCAGGAGTGGAGACTT
 TGCCTTTTACAGAAAGAACTGGCTGCCTGGGCCTTGTGTTAAACAGCAGAGATTCTCAAAAAC
 TGCCAGTCAAAATTACAAGATTCTGCCAGCGGGGGCAACGCTCTGTTAAAGTATGACACCCA
 CTATACCTTAAACAACCGCTGGAGCAACATCGCGCCCGGACCTCCAATGGCCACAGCCGGACC
 TTCGGATGGGGACTTCAGTAACGCCAGCTTATATTTCCCTGGACCATCTGTTACCCGGAATAC
 AACAACTTCAGCCAACAATCTGTTGTTTACATCAGAAGAAGAAATGCTGCCACCAACCCAAG
 AGACACGGACATGTTTGGCCAGATTGCTGACAATAATCAGAATGCTACAACCTGCTCCATAAC
 CGGCAACGCTGACTGCTATGGGAGTGTGCTGCTGGCATGGTGTGGCAAAACAGAGACATTTACTA
 CCAAGGGCAATTTGGGCCAAGATCCCACGCGGACGAGACTTCTATGTTGTGGGCTCCTGATAACTGG
 TGGTGGGTTTGGACTGAAACACCCGCTCCCGAGATATTCATCAAGAACAACCTCCCGTACCTGC
 CAATCCTGCGACAACCTTCACTGCAGCCAGAGTGGACTCTTTCATCACACAATACAGCACCGG
 CCAGGTGCTGTTTCAAGTGAATGGGAAATTTGAAAAGGAACGCTCCAACCGCTGGAATCCTGA
 AGTGCAGTTTACTTCAAACCTATGGGAACAGCTTCTATGTTGTGGGCTCCTGATAACTGG
 GAAGTATACAGAGCCCGGGTTATTGGCTCTCGTTATTGACTAATCATTGTAA

FIG. 18

AAV-13, GENES DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL Y DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE, CDS COMPLETO, GENBANK . ACCESO NO. EU285562 . Y SCHMIDT ET AL. (2008) J. VIROL.

82:8911

CCGCGAGTGAGCGAACCCAGGAGCTCCATTTTTGCCCGGAATTTTGAACGAGCAGCAGCCATGC
 CGGGATTCTACGAGATTGTCTGAAGGTGCCAGCGACCTGGACGAGCACCTGCCTGGCATT
 CTGACTCTTTTGTAAACTGGGTGGCGGAGAAGGAATGGGAGCTGCCGCCGGATTCTGACATGG
 ATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTAACCGTGGCCGAAAAGCTGCAACGCGAATTCCTGG
 TCGAGTGGCGCCGCGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTCTTCTTTGTTTCTGAGTTCGAGAAGGGGG
 ACAGCTACTTCCACCTACACATTCTGGTGGAGACCGTGGGCGTGAATCCATGGTGGTGGGCC
 GCTACGTGAGCCAGATTAAGAGAAAGCTGGTGACCCGCATCTACCGCGGGGTGAGCCGCGAGC
 TTCCGAACTGGTTCCGCGTGACCAAGACCGTAATGGCGCCGGAGGCCGGAACAAGGTGGTGG
 ACCGTCGGATACATCCCAACTACCTGTCTCCCAAGACCCAGCCGAGCTCCAGTGGCGTGGGA
 CTAATATGGACCAGTATTTAAGCGCTGTTTGAATCTCGCGGAGCGTAAACGGCTGGTGGCGC
 AGCATCTGACGCACGTGTGCGAGACGCAGGAGCAGAAACAAAGAGAACCAGAATCCCAATCTG
 ACGCGCCGGTGTAGATCAAAAACCTCCGCGAGGTACATGGAGCTGGTCCGGTGGCTGGTGG
 ACCCATGTGCGCGGTCAAGCAAAAGCAATGGATCCAGGAGGACCAGGCCCTTACATCTCCTTCA
 ACGCCGCTCCAACCTCGCGGTCAAAATCAAGCCCGCACTGGACAATGCTTCCAATTTATGA
 GCCTGACAAAAACGGCTCCGGACTACCTGGTGGGAAACAACCCGCGGAGGACATTACCAGCA
 ACCGGATCTACAAAATCCTCGAGATGAACGGGTACGATCCGCGAGTACGCGGCCCTCCGTCTTCC
 TGGGCTGGGCGCAAAAGAAGTTCCGGAAGAGGAACCAATCTGGCTCTTTGGGCCGGCCACGA
 CGGTAAAACCAACATCGCTGAAGCTATCGCCACCGCCGCTGCCCTTTTACGGCTGCGTGAAT
 GGACCAATGAGAACTTTCCGTTCAACGATTGCGTGCACAAGATGGTGTATCTGGTGGGAGGAGG
 GCAAGATGACGGCCAAGGTGCTGGAGTCCGCCAAGGCCATTCTGGGCGGAAGCAAGGTGCGCG
 TGGACCAAAAGTGCAAGTCAATCGGCCAGATCGACCCAACCTCCGTCATCGTCACTCCAACA
 CCAACATGTGCGCGGTCAACGACGAAATTCACCACTTTCGAGCACCAACCACTCCAAG
 ACCGGATGTTCAAGTTCGAGCTCACCAAGCGCTGGAGCACGACTTTGGCAAGGTCAACCAAGC
 AGGAAGTCAAGGACTTTTCCGGTGGGCGTCAAGTCACTGAGGTGTCTCACGAGTTTT
 ACGTCAGAAAAGGGTGGAGCTAGAAAAGAGGCCCGCCCAATGACGCGAGATATAAGTGGAGCCCA
 AGCGGCTGTCCGTGAGTGGCGAGCCATCGAGCTCAGACGCGGAAGCTCCGGTGGACTACG
 CGGACAGGTACCAAAACAAATGTCTCGTCAAGTGGGCGTGAATCTGATGCTTTTTCCCTGCC
 GGCAATGCGAGAGAATGAATCAGAATGTGGACATTTGCTTCAACGACGGGGTCACTGGACTGTG
 CCGAGTGTCTCCCGTGTGAGAATCTCAACCCGCTGTCTGTGCTGAGAAAAGCGGACATATCAGA
 AACTGTGTCCGATTCACTCATATGAGGAGGGCGCCCGAGGTGGCTTGTTCGGCTGCGATC
 TGGCCAATGTGGACTTGGATGACTGTGAGATGGAGCAATAAATGACTCAAAACAGATATGACT
 GACGGTTACCTTCCAGATTGGCTAGAGGACAACCTCTCTGAAGGCGTTCGAGAGTGGTGGGCG
 CTGCAACCTGGAGCCCCATAACCCAAAGGCAAATCAACAACATCAGGACAACGCTCGGGGTCTT
 GTGCTTCCGGGTTACAAATACCTCGGACCCCGCAACGGACTTGACAAGGGGGAACCCGTCAAC
 GCAGCGGACCGCGAGCCCTCGAACACGACAGGCTTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGTTGAC
 AACCCCTACCTCAAGTACAACCAAGCGGACCGGAGTTTTCAGGAGCGTCTTCAAGAAGATACG
 TCTTTTGGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGATCCTTGAGCCTCTG
 GGTCTGGTTGAGGAAGCGGCTAAGACGGCTCCTGGAAAAAGAGACCTGTAGAGCAATCTCCA
 GCAGAACCGGACTCCTCTTCCGGCATCGGCAATCAGGCCAGCAGCCCGCTAGAAAAAGACTG
 AATTTTGGTCAGACTGGCGACACAGAGTCACTCCAGACCCTCAACCACTCGGACAACTCCC
 GCAGCCCCCTCTGGTGTGGGATCTACTACAATGGCTTTCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGAC
 AATAACGAGGGTGCAGATGGAGTGGTAATTCCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCCAATGG
 CTGGGCGACAGAGTCACTACCACAGCACCCGCACTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCAC
 CTCTACAAGCAAATCTCCAGCCAATCAGGAGCCAAACGACAAACCACTACTTTTGGCTACAGC
 ACCCCCTGGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCACCTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAA
 AGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGACCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTTAACATT
 CAAGTCAAAGAGGTACGCGAGAATGACGGTACGACGAGATTGCCAATAACCTTACCAGCAGG
 GTTCAGGTGTTTACTGACTCCGAGTACCAGTCCCGTACGTCTCCGGCTCGGCGCATCAGGGA
 TGCCCTCCCGCCGTTCCAGCAGACGTCTTCTGTTCCACAGTATGGATACTCACCCTGAAC
 AACGGGAGTCAAGCGGTAGGACGCTCTTCTTTTACTGCTGGAGTACTTTCCTTCTCAGATG
 CTGCGTACTGGAACAACCTTTTCAAGTTTACTTACACTTTTGAAGACGTGCCCTTCCACAGCAGC
 TACGCTCACAGCCAAAGTCTGGACCGTCTCATGAATCTCTGATCGACCAGTACCTGTACTAT
 CTGAACAGGACACAAACAGCCAGTGGAACTCAGCAGTCTCGGCTACTGTTTGGCAAGCTGGA
 CCCACCAGTATGTCTCTTCAAGCTAAAACTGGCTGCCCTGGACCTTGCTACAGACAGCAGCGT
 CTGTCAAAGCAGGCAACAGCAACAACAACAGCAACTTCCCTGGACTGGTGCCACCAATAT
 CATCTGAATGGCCGGGACTCATTGGTGAACCCCGGCCCTGCTATGGCCAGTCAACAAGGATGAC
 AAAGAAAAGTTTTTCCCATGCATGGAACCTGATATTTGGTAAAGAAGGAACAAATGCCAAC
 AACCGGATTTGGAAAAATGTCATGATTACAGATGAAGAAGAAATCCGCACCACCAATCCCGTG
 GCTACGGAGCAGTACGGGACTGTGTCAAATAATTTGCAAACTCAAACGCTGGTCCAACACT
 GGAACCTGTCAATCACAAGGAGCGTTACCTGGTATGGTGTGGCAGGATCGAGACGTGTACTG
 CAGGACCAATTTGGGCCAAGATTCCTCACACCGATGGACTTTCATCCTTCTCCACTGATG
 GGAGTTTTTGGGCTCAAAACACCCGCTCCTCAGATCATGATCAAAAACACTCCCGTTCCAGCC
 AATCCTCCCAACAACCTTGTAGTGCAGCAAGTTTTGCTTCTTCTCATCACACAGTACTCCACGGGG
 CAGGTACGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAGAACAGCAACCGCTGGAATCCCGAA
 ATTCAGTACACTTCCAACACAACTCTGTTAATGTGGACTTTACTGTGGACACTAATGGT
 GTGTATTTCAGAGCCTCGCCCTTGGCACCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGT
 AATCAATAAACCGGTTAATTCG

FIG. 19

B19 PARVOVIRUS, SECUENCIA COMPLETA, GENBANK .ACCESO NO. NC 000883 Y
 SHADE ET AL. (1986) J. VIROL. 58:921
 CCAAATCAGATGCCGCGGTCGCGCGCGGTAGCGGGACTTCCGGTACAAGATGGCGGACAATTACGTCATTT
 CCTGTGACGTCATTTCTGTGACGTCACCTCCGGTGGCGGGACTTCCGGAATTAGGGTTGGCTCTGGGCCAG
 CTGTGTTGGGGTTGCCTTGACACTAAGACAAGCGGCGCGCCGCTTGTCTTAGTGGCACGTCAACCCCAAGCGC
 TGGCCAGAGCCAACCCTAATTCGGGAAGTCCCGCCACCGGAAGTGACGTACAGGAAATGACGTACAGGA
 AATGACGTAATTTGTCGCCCATCTGTACCGGAAGTCCCGCTACCGGCGGCGACCGCGGCATCTGATTTGGT
 GTCTTCTTTTAAATTTTAGCGGGCTTTTTTCCCGCCTTATGCAAATGGGCAGCCATTTAAGTGTTCACATAT
 AATTTTATGGTCAGTTTGTAAACGGTTAAAATGGGCGGAGCGTAGGCGGGGACTACAGTATATATAGCACCG
 CACTGCCGACGCTCTTTCTTTCTGGGCTGCTTTTTCCCTGGACTTTCTTGTCTTTTTTTGTGAGCTAACAA
 GGTATTTATACTACTTGTAAACATACTAATGAGCTATTTAGAGGGGTGCTTCAAGTTCTTCTAATGTTTC
 TGGACTGTGCTAACGATAACTGGTGGTGTCTTTACTGGATTTAGACACTTCTGACTGGGAACCCACTAATCA
 TACTAACGACTAATGGCAATATACTTAAGCAGTGTGGCTTCTAAGCTTGACTTTACCGGGGCCACTACGCG
 GGGTGTCTGTACTTTTTTCAAGTAGAATGTAACAAATTTGAAGAAGGCTATCATTTCAATGGTTATTGGGG
 GGCCAGGGTTAAACCCAGAAACCTCACAGTGTGTGTAGAGGGGTTATTTAATAATGTACTTTATCACCTTGT
 AACTGAAAATGTAAGCTAAAATTTTCCAGGAATGACTACAAAAGGCAAATACTTTAGAGATGGAGAGCAG
 TTTATAGAAAACCTTTAATGAAAAAATACCTTTAAATTTGTATGGTGTGTTAATTAATGGATGATATA
 TAGATACCTGTATTTCTGCTACTTTTAGAAGGGGAGCTTGGCATGCCAAGAAACCCCGCATTACCACAGCCAT
 AATGACACTAGTAGTGTGCTGGGAGTCTAGCGGCACAGGGGCGAGAGTTGTGCCAATTAATGGGAAGGGA
 ACTAAGGCTAGCATAAAGTTTCAAACCTATGGTAAACTGGTTGTGTGAAAACAGAGTGTTTACAGAGGATAAGT
 GGAAACTAGTTGACTTTAACCCAGTACACTTTACTAAGCAGTAGTCACAGTGGAAAGTTTCAAATTCAAAGTGC
 ACTAAAACCTAGCAATTTATAAAGCAACTAATTTAGTGCCTACAAGCACATTTCTATTGCATACAGACTTTGAG
 CAGGTTATGTGTATTAAGACAATAAAATTTGTTAAATTTGTTACTTTTGTCAAACCTATGACCCCTATAGTGG
 GGCAGCATGTGTTAAAGTGGATTGATAAAAAATGTGGCAAGAAAAATACACTGTGGTTTATGGGCCGCCAAG
 TACAGGAAAAACAACTTGGCAATGGCATTGGCTTAAAGTGTTCAGTATATGGCATGGTTAACTGGAATAAT
 GAAAACTTTCCATTTAATGATGTAGCAGGGAAAAAGCTTGGTGGTCTGGGATGAAGGTATTTAAGTCTACAA
 TTGTAGAAGCTGCAAAAGCCATTTTAGGCGGGCAACCCACCAGGGTAGATCAAAAAATGCGTGGAAAGTGTAGC
 TGTGCTGGAGTACCTGTGGTTATAACCAGCAATGGTGACATTACTTTTGTGTAGCGGGAACTACAAACA
 ACTGTACATGCTAAAGCCTTAAAGAGCGAATGGTTAAAGTTAACTTTACTGTAAAGTACAGCCCTGACATGG
 GGTTACTAACAGAGGCTGTATGTAACAGTGGCTTACATGGTGTAAATGCACAAAGCTGGGACCCTATGAAAA
 CTTGGGCAATAAATACACTTTTGTATTTCCCTGGAAATTAATGCAGATGCCCTCCACCAGACCTCAAACACC
 CCAATTTGTCACAGACCCAGTATCAGCAGCAGTGGTGGTAAAGCTCTGAAGAATCAGTGAAGCAGCTTTT
 TTAACCTCATCACCCAGGGCCTGGAAACCTGAAACCCCGCGCTCTAGTACGCCCTCCCGGGCAGCTTTC
 AGGAGAATTTGTCGGAAGCTCAGTTTCTCCGAAGTTGTAGCTGCATCGTGGGAAGAAGCCTTCTACACA
 CCTTTGGCAGACCAGTTTCCGTGAAGTGTGGGTTGATTTATGTGTGGGACGGTGAAGGGGTTACCTGT
 TGTGTTGTGTGCAACATATTAACAATAGTGGGGAGGCTTGGGACTTTGTCCCATGCAATTAATGTAGGGGC
 TTGGTATAATGGATGGAATTTTCGAGAATTTACCCAGATTTGGTGGCGTGTAGCTGCCATGTGGGAGCTTCT
 AATCCCTTTCTGTGCTAACCTGCAAAAAATGTGCTTACCTGTCTGGATTGCAAGCTTTGTAGATATGAGT
 AAAGAAAGTGGCAAAATGGGAAAGTGTATGATAAATTTGCTAAAGCTGTGTATCAGCAATTTGTGGAATTTT
 ATGAAAAGGTTACTGGAACAGACTTAGAGCTTATTCAAATATTAAGATCACTATAATATTTCTTTAGATAA
 TCCCTTAGAAAACCCATCTCTGTGTTGACTTAGTTGCTCGTATTAATAAATACCTTAAAAACTCTCCAGAC
 TTATATAGTCATCATTTTCAAAGTCATGGACAGTTTACTGACCACCCCATGCTTTATCATCAGTAGCAGTC
 ATGCAGAACCTAGAGGAGAAAAATGCAGTATTATCTAGTGAAGACTTACACAAGCCTGGGCAAGTTAGCGTACA
 ACTACCCGGTACTAATATGTTGGGCTGGCAATGAGCTACAAGCTGGGCCCCCGCAAAGTGTGTTGACAGT
 GGTGCAAGGATTCATGACTTTAGGTATAGCCAATGGCTAAGTTGGGAATAAATCCATATCATTGGACTG
 TAGCAGATGAAGAGCTTTTAAAAAATATAAAAAATGAACTGGGTTTCAAGCACAAAGTAGTAAAAGACTACTT
 TACTTTAAAAGGTGCAGCTGCCCTGTGGCCATTTTCAAGGAAGTTTCCCGGAAGTTCCCGCTTACAAACGCT
 TCAGAAAAATACCCAGCATGACTTTAGGTATAGCCAATGGCTAAGTTGGGAATAAATCCATATCATTGGACTG
 ATCCTGTCAAAGCATGTGGAGTGGGGGGCCACTTTTAGTGCCAACCTCTGTAACTTGTACATTTTCCAGACA
 GTTTTAAATTCCTTATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCAAGCAGCTGCCACAATGCC
 AGTGGAAAGGAGTCAAAGGTTTGCACAATTAGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATT
 TTAATGCTTTAAATTTATTTTTTTTACCTTTAGAGTTTTCAGCACTTAATGAAAATTAATGGAATATAGACTCC
 TGATGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATGCTGTTAAGGATGTTACAGACAAAACCTGGAGGGGGGTACAG
 GTTACTGCACAGACTACAGGGCGCCTATCCATGTTAGTACACCATGAATACAAGTACCACATATGTTTGGAC
 AAGGTGAGGACTACTTTAGCCCAAGAACTTCTATTTGGGTATACTTTCCCTCAATATGCTTACTTAAACAGT
 AGGAGATGTTAACACACAAGGAATCTCTGGAGACAGCAAAAAATAGCAAGTGAAGAATCAGCATTTTATGTT
 TTGGAACACAGTTCTTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGTACAGCAACTATGTCCTTATAAGTTTCCCTCCAGTGC
 CCCCAGAAAAATTTAGAGGGCTGCAGTCAACACTTTTATGAAATGTACAATCCCTTATACGGATCCCGCTTAGG
 GGTTCCTGACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGACCATGCAATTCAGCCCCAA
 AACTTCATGCCAGGGCCACTAGTAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGAGACAGCTCTAATACTGGAGCTGGAA
 AAGCTTAAACAGGCCTTAGCACAGGCACCTCTCAAACACTAGAATATCCTTACGCCCTGGGCGAGTGTACA
 GCCATAACCACACTGGGACACAGATAAATATGTTCCAGGAATAAATGCCATTTCTCATGGTTCAGACCCTTAT
 GGTAACCGCTGAAGACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGATTTCCAAATGAAAAAGAACAGCTAAAAACAGT
 TACAGGGTTTAAACATGCACACCTATTTCCCAATAAAGGAACCCAGCAATATACAGATCAAATTTAGCGCCC
 CCTAATGGTGGGTTCTGTATGGAACAGAAGAGCCCTTCACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAAAATTCAAAT
 TTAGATGACAGTTTAAAAACTCAGTTTGCAGCCTTAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCCACCTCTCAAATAT
 TTTTAAAAATATACCACAAAGTGGGCCAATGGAGGTATTAATCAATGGGAATTTACTTTAGTTTCAAGTA
 TGCCGTGGGAATTTATGACAGTAACTATGACATTTAAATTTGGGGCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGAAATCCT
 CAACCTGGAGTATATCCCCCGCAGCAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCCAAGCTACAGATG
 CAAAACCAACACAGCATGGATACGAAAAGCCTGAAGAATTTGGACAGCCAAAAGCCGTGTGCAACCCATTT
 GTAACACTCCCCACCGTGCCTCAGCCAGGATGCGTAACTAAACGCCACCAGTACCACCCAGACTGTACCT
 GCCCTCCTGTACTATAAAGACGCCTAACACAAAAGATATAGCAATGTAGAAATTTAAGTATTTAACACAGA
 TATGAAACAACATGTTATAGAATGTTAAGATTTGTTAATATGTTATCAAAATTTAGAAAAATAACATTTGTTG
 TGGTTAAAAAATATGTTTGTGGCTTTAAAAATTTAAAAGAAGACCCAAATCAGATGCGCCCGGTGCGCCG
 CGGTAGGCGGGACTTCCGGTACAAGATGGCGGACAATACGTCATTTCTGTGACGTCATTTCTGTGACGTC
 ACTTCCGGTGGGCGGGACTTCCGGAATTAGGGTTGGCTTGGGCCAGCGCTTGGGGTTGACAGTGCACATAAGA
 CAAGCGCGCGCGCTTGTCTTAGTGTCAAGGCAACCCCAAGCAAGCTGGCCAGAGCCAACTTAATTCGGG
 AAGTCCCGCCACCGGAAGTGACGTACAGGAAATGACGTCACAGGAAATGACGTAATTTGTCCGCCATCTGT
 ACCGGAAGTCCCGCCTACCGGCGGCGACCGGCGGCATCTGATTTGG

FIG. 20

VIRUS DIMINUTO DE RATÓN (MVM), SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO

NO. NC 001510

ATTTTITAGAACTGACCAACCATGTTACGTAAGTGTGACGTGATGACGCGCGCTGCGCGCGCCTTC
GGACGTCACACGTCACCTTACGTTTACATGGTTGGTCAGTTCTAAAAATGATAAAGCGTTTCAGGGA
GTTTAAACCAAGGCGCGAAAAGGAAGTGGCGTGGTTTAAAGTATATAAGCAACTACTGAAGTCAG
TTACTTATCTTTTCTTTCATTCTGTGAGTGCAGACGCACAGAAAGAGAGTAACCAACTAACCATGC
CTGGAAATGCTTACTCTGATGAAGTTTGGGAGCAACCAACTGGTTAAAGGAAAAAGTAACCAGG
AAGTGTCTCATTGTTTTTTAAAAATGAAAATGTTCAACTGAATGAAAAGATATCGGATGGAATA
GTTACAAAAAGAGCTGCAGGAGGACGAGCTGAAATCTTTTACAACGAGGAGCGGAAACTACTTTGGG
ACCAAGCGAGGACATGGAATGGGAACCACAGTGGATGAAATGACCAAAAAGCAAGTATTCTATT
TTGATCTTTGGTTAAAAATGTTTATTTGAAGTCTTAAACACAAAAGATATATTTCTGGTGATG
TTAATTTGGTTTGTGCAACATGAATGGGAAAAGACCAAGGCTGGCACTGCCATGTACTAATTGGAG
GAAAGGACTTTAGTCAAGCTCAAGGAAATGGTGGAGAAGGCAACTAAATGTTTACTGGAGCAGAT
GGTTGGTAAACGCTGTAATGTGCAACTAACACCGCTGAAAGAATTAACATAAGAGAAAATAGCAG
AAGACAATGAGTGGTTACTCTACTTACTTATAAGCATAAGCAAACCAAAAAGACTATACCAAGT
GTGTTCTTTTGGAAAACATGATTGCTTACTATTTTTTAACTAAAAAGAAAATAAGCACTAGTCCAC
CAAGAGACGGAGGCTATTTTTCTTAGCAGTACTCTGGCTGGAAAACCTAATTTTTTAAAAAGAGGCG
AGCGCCATCTAGTGAGCAAACATACACTGATGACATGCGGCCAGAAACGGTTGAAACCACAGTAA
CCACTGCGCAGGAACTAAGCGCGGCAGAAATCAAACATAAAAAGAAATTTCTATTAAAACACTAC
TTAAAGAGCTGGTGCATAAAAAGAGTAACTCACCAGGACTGGATGATGATGCAGCGACAGCTT
ACATGAAATGATGGCTCAACCAGGTTGGAGAAAACCTGCTGAAAAATACGCTAGAGATTTGTACAC
TAACTCTAGCCAGAAACCAACAGCATTTGACTTAAATTTAGAAAAAGCTGAAACCAGCAAACATA
CCAACTTTTCACTGCCTGACACAAGAACCCTGCAGAAATTTTTGCTTTTCATGGCTGAACTATGTTA
AAGTTTGGCCATGCTATTTGCTGTGTTTTTAAACAGACAAGGAGGCAAAAAGAAATACTGTTTTATTTT
ATGGACAGCCAGCAGCAGGCAAACTATTTATTTGACACAGCCATAGCACAGCAGTGGCAGTGGT
GTTGCTATAATGCAGCCAATGTAACTTTCCATTTAATGACTGTACCAACAAGAATTTGATTTGGG
TAGAAGAAGCTGGTAACTTTGGACAGCAAGTAAACAGTTTTAAAGCCATTTGCTCTGGTCAAAC
TTTCGATTTGATCAAAAAGGAAAAGGCGCAACAGATTTGAAACCAACCCAGTCACTATGACCACAA
ATGAGAACATTAACAGTGGTCAAGATAGGCTCGAAGAAAAGACCAACACACTCAACCAATCAGAG
ACAGAATGCTTAACTATCATCTAACACATACCTTGCTGGTGAATTTGGTTGGTCAAAAATG
AATGGCCCATGATTTGTGCTTGGTTGGTAAAGAATGGTTACCAATCTACCATGGCAAGCTACTGTG
CTAAATGGGGCAAAGTTCCTGATTTGGTCAGAAAACCTGGGCGGAGCCAAAGGTGCCAATCTCTATA
ATTTACTAGGTTTCGGCACGCTCACCATTACAGCACCCGAAAAGTACGCCCTCTCAGCCAGAATATG
CACTAACTCCACTTGCATCGGATCTCGAGGACCTGGCTTTAGAGCCTTGGAGCACACCAAACTACT
CTGTTGCGGGCACTGCAGAAACCCAGAACACTGGGGAGCTGGTTCCAAAGCCTGCCAAGATGGT
AACTGAGCCCAACTTGGTCAGAGATCGAGGAGGATTTGAGAGCGTGCCTTCGGTGGGAAACCGTTGA
AGAAAGACTTCAGCGAGCCGCTGAACCTTGGACTAAGGTACGATGGCGCCTCCAGCTAAAAGAGCTA
AAAGAGGTAAAGGTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGTTAATGTTTAAATACCTGTTTTACAG
CGCTGAAATCACTTGGTTTTAGGTTGGTGGCTCCTGGCTACAAGTACCTGGGACAGGAAACCGC
CTTGACCAAGGAGAACCAACCAATCCATCTGACGCGCTGCCAAAAGAGCACGACGAGGCTATGAT
CAATACATCAAACTCGGAAAAAATCCTTACCTGACTTCTCTGCTGCTGATCAACGCTTTTTATTTG
CAAACCAAGGACCGCAAAGACTGGGAGGCAAGTTGGTCACTACTTTTTTTAGAACCAAGCGCT
TTTTGCACCTAAGCTTGCTACTGACTTGAACCTGGAACCTTCTGGTGTAAAGCAGAGCTGGTAAACCG
ACTAGACCACCTGCTTACATTTTTATTAACCAAGCCAGAGCTAAAAAAAACCTACTTCTTCTGCT
GCACAGCAAAGCAGTCAAACCATGATGATGGCACCAGCCAACTGACAGCGGAAACGCTGTCCAC
TCAGCTGCAAGAGTTGAACGAGCAGCTGACGGCCCTGGAGGCTTGGGGGTGGGGCTCTGGCGGG
GGTGGGGTTGGTGTCTACTGGGTCTTATGATAATCAAACGCATTATAGATTTCTGGGTGACGGC
TGGGTAGAAATTACTGCACCTAGCAACTAGACTAGTACATTTAAACATGCCTAAATCAGAAAATAT
TGCAGAAATCAGAGTTCACAATAACAACAGACACATCAGTCAAAGGCAACATGGCAAAAAGATGCT
CATGAGCAAATTTGGACACCATGGAGCTTGGTGGATGCTAATGCTTGGGGAGTTGGCTCCAGCCA
AGTGACTGGCAATACATTTGCAACACCATGAGCCAGCTTAACTTGGTATCACTTTGATCAAGAAATA
TTCAATGTAGTGTGAAAACCTTACAGAGCAAGACTTAGGAGGTCAGCTATAAAAATATAACAAC
AATGACCTTACAGCTTGCATGATGGTTGCAGTAGACTCAAACAACATTTTTGCCATACACACCTGCA
GCAAACTCAATGGAACACTTGGTTTCTACCCTGGAACCAACCATAGCATCACCATAAGGTTAC
TATTTTGGCTTGCAGAGATCTTTCAGTGAACCTACGAAAATCAAGAAGGCACAGTTGAACATAAT
GTGATGGGAACACCAAAAGGAATGAATTTCTCAATTTTTTACCATTGAGAACACACAACCAATCACA
TTGCTCAGAACGGGGACGAATTTGCCACAGGTACTTACTACTTTGACACAATTCAGTTAAACTC
ACACACAGTGGCAAAACCAACCGTCACTTGGACAGCCTCCACTGCTGTCAACCTTTCTGTAAGCT
GACACTGATGCAGGTACTTACTGCTCAAGGGAGCAGACATGGAAACAACAACCAATGGGGGTTAAC
TGGGTGAGTGAAGCAATCAGAACCAGACCTGCTCAAGTAGGATTTTGTCAACCACACAATGACTTT
GAAGCCAGCAGAGCTGGACCATTTGCTGCCCAAAGTTCCAGCAGATATTACTCAAGGATAGAC
AAAGAGCCCAATGGCAGTGTTAGATACAGTTATGGCAAACAGCATGGTGAANAATGGGCTTACAT
GGACCAGCACCAGAGCGCTACACATGGGATGAAACAAGCTTTGGTTCAAGGTAGAGACACCAAGAT
GGTTTTATTCAATCAGCACCCTAGTTGTTCCACCACCCTAAATGGCATTCTTACAAATGCAAAAC
CCTATTTGGGACTAAAAATGACATTCATTTTTCAAATGTTTTTAAACAGCTATGGTCCACTAACTGCA
TTTTACACCCAAAGTCTGTATACCTCAAGGACAAATATGGGACAAAGAATAGATCTTTGAACAC
AAACCTTAGACTTACATAACTGCTCCATTTGTTTAAAAACAATGCACCTGGACAAATGTTGGTT
AGATTAGGACCAAACTAAGTACCAATATGATCCAAACGGAGCCACACTTTCTAGAAATGTTTACA
TACGGTACATTTTTCTGGAAAGGAAAACCTAACCATGAGAGCAAACTTAGAGCTAACCCACTTGG
AACCCAGTGTACCAAGTAAAGTGTGAAGACAATGGCAACTCATACTGAGTGTAACTAAATGGTTA
CCAACCTGCTACTGGAACATGACAGTCTGTGCGCTTATAACAAGACCTGTTGCTAGAAAATACTAC
TAACTAACCATGCTTTTTCTTCTGTACTTTCATATAATTTAAGACTAATAAAGATACAACATAGA
AATATAATATTACGTATAGATTTAAGAAATAGAATAATATGGTACTTAGTAAGTAAATAAATAAT
AGAACCCTTTGGAATAACAAGATAGTTGGTTAATGTTAGATAGATAAAGAAAGATCATGTATAA
TGAATAAAGGGTGGAAAGGGTGGTTGGTAGGTTAATGTTAGATAGATAAAGAAAGATCATGTATAAT
GAATAAAGGGTGGAAAGGGTGGTTGGTAGGTTCCCTTAGACTGATGTTAAGGACCAAAAAAAT
AATAAAACTTTTTTAAACTCAACCAAGACTACTGCTTATTCACTGAGTAAACCAAGCAACTTAGTA
TTACTATGTTTTTAAAGGTGGGAGGGTGGGAGATACATGTGTTTCGCTATGAGCGAACCTGGTACTGGT
TGGTTGCTCTGCTCAACCAACAGACCGGCAAGCCGGTCTGGTTGGTTGAGCGCAACCAACAGT
ACCAGTTGCTCATAGCGAACACATGTATCTCCACCCTCCACCCTAAAAACATAGTAATACTAA

FIG. 21

(PARVOVIRUS DE GANSO, SECUENCIA COMPLETA, GENBANK ACCESO NO. NC 001701
 CTCATTGGAGGGTTCGTTCCGTTTCGAACCCAGCCAATCAGGGGGAGGGGGAAGTGACGCCAAGTTCGCGG
 TCACATGCTTCCGGTGACGCACATCCGGTGACGTAGTTCGCGGCACGTGCTTCCGTGTCACGTGCTT
 TCCGGTCACGTGACTTCCGGTCATGTGACTTCCGGTGACGTGTTTCCGGCTGTAGGTTGACCAC
 GCGCATGCCGCGCGGTGAGCCCAATAGTTAAGCCGGAACACGTACCCGGAAGTACCATGACCCGG
 AAGTCACGTGACCGGAACACGTGACAGGAAGCACGTGACCCGGAACACGTACCCGGAAGTACCATGACCCGG
 CACCCGGAAGCATGTGACCCGGAACCTTGCCTCACTTCCCCCTCCCCTGATTGGCTGGTTGAAACGAA
 CGAACCCCTCCAATGAGACTCAAGGACAAGAGGATATTTTGCAGCCAGGAAGTACCATGACCCGG
 CACCCATATAAAGCCAGGAACCTTCCGGTTTGTTCATTTCGTTACTCTGCTCTCAGAGAGAACC
 ACCTCAGGTCCGAGAGATGGCACTTCTAGGCCCTTTCAGATTTCTTCTGATAAATCTATGAAG
 TTATTATTAGATTATCATCGGATATTGATCAAGATGTCCCGGCTGTCTCTTAACTTTGTAGAA
 TGGCTTCTACCCGAGTTTGGGAGCCACGGGCATCTGGAAACATGGAGCATGTGAATCTACCCGAT
 GGTGACTTGGCAGAGAAGATCAAGAACATTTTCATACAAAGATGGAATCAGTTCACCCAGGACG
 AAACGGACTTCTTCTTCAACTGGAAGAAGCCAGTGAGTACATTTCATCTTCACTGCTGATTGCTC
 CAGGGCAATGTACCGTCTTTTGGTCTCGGGAGATATGTCTCAGATAAAAGACTCTATCATAAG
 AGATGTATATGAAGGAAACAAATCAAGATCCCGGATTTGGTTTGTCTATTACTAAAACAGAGGG
 GAGGACAGAATAAGACCGTGACTGCAGCATACTGCATTACCTTATTTCTAAAAGCAACT
 GAACTGCAATGGGCTTTTACCAATATGCCTTATTCACTGCTGCTGCTCTTTGTCTGCAAAAGCG
 GCAAGAATGTCTGGATGCATTTCAAGAAAGTGATTTGGCTGCCCTTTACCTGATCCTCAAGCAT
 CAACTGTGGCACCCTTATTTCCAACAGAGCCGCAAGAACATATAGCAACTTGTGTGATTGGCTC
 ATTGAAATGGGATAACATCTGAGAAGCAATGGCTCACTGAGAACCAGAGAGACTACAGAAGCTT
 TCAAGCAACTTCTCAAAATAAGACAAGTGAAGCTGCCTGGAAAATGCCCGTGTGAAATGT
 TATTGACAAAAGACTGCAACTGATTACCTGATAGGAAAAGACCCTGTCTGGATATAACTAAGAAT
 AGGGTCTATCAAAATCTGAAAATGAATAACTCAACCCCTCAATACATAGGAAGTATCCTGTGCGG
 CTGGGTGAAGAGAGAGTTCAACAAAAGAAACGCCATATGGCTCTACGGACCTGCCACCACCGGGA
 AGACCAACATGCGAGAAGCTATTGCCATGTCTGTACCCCTCTATGGCTGTGTTAACTGGCAAT
 GAGAATTTCCCTTTAATGATGTGTTGATAAAAATGCTGATTTGGTGGGAGGAGGGAAAATGAC
 TAATAAGGTGTGTAATCTGCAAAAGCAATTTTGGGAGGGTCTGCTGTCCGGTAGACCAGAAT
 GTAAGGATCTGTTTGTATTGAACCTACTCTGTAAATTAATTAAGTAATGATGATGTTGTAAG
 ATTTGTGATGGCAACTCTACTACAATGGAACATAGAATACCATTAGAGGAGCTGATGTTTCAAA
 TGTCTTACATAAATGGAGCCTTCTTTGGAAAAATTTCTAAAAGAAAGTCTCAGAGAATTTT
 TCAAAATGGGCAATGACAATCTAGTTTCTGTGTTGTCTGAGTTCAAAGTCCGAACTAATGAACAA
 ACCAATTTGCCAGAGCCCGTTTCTGAACGAGCGAAGCAGCCGGAGGAGCCTCTAAGATCTGGGG
 TCCCTCTACTAGGGAGGAGTTAGAAGAGCTTTTGAAGCCAGCCAGAATTTGTTCTCATCAGTCC
 CTCCAATTCCTGTGACTCCTCAGAACTCCCTGAGCCTAAGAGAAGCAGGAACAATTACCAGGTA
 CGCTGGCTTTGCATACTTATGACAATTCATGGATGATTTGAATGTATGGAATGTGAGAAGG
 AAATTTCTGAAATTTCAACCTCTGGGAGAAAATATTGTTGATGAACATGGGTGTTGATGTTG
 CTATATGTAAGAGTTGAAAATGAACCTGCAGAAAATGAGCATGTGTTTGGCTTGTATGATGCT
 GAAAATGAACAAATAAGATGACTCAAAGCAGATATGTCTACTTTTTTAGATTCTTTTGAAGAGTG
 GTATGAGACTGACCGCCCTCGTGGCGGAATCTGAAAGCTGGAGCCCTCAGCCAAAACCAATACC
 AGCAGTCTCAGTCTGTGCTCTCAGACAGAGAACCCGAAACGAAAAGATAATAATCGGGGCTTTGTA
 CTTCTGGCTATAAGTATCTTGGGCTGGTAAACGGCTGGATAAAGGCCCACTGTCAATAAGGC
 GGACAGCGTCCGCTTGAACACGCAAGGCTATGACCAGCAGCTTAAAGCCGGAGCAACCCAT
 ATATAAAATTCATCAGCTGACCAGGACTTTATAGATAGCCTCAAGACGACCACTCATTCCGA
 GGTAATCTTGAAGGCTGTATTTGAGCCAAAACAGCTATCTTAGAGCCATTGAGCCTAGTAGA
 AGATCCTGTCAACACGGCACCTGCAAAAAAAAAAATACAGGGAAAGCTTACTGACCATTACCCGGT
 TTAAGAAGCTTAACTTACCGGAGGAGTCACTGCGGGAGGTTGGTAGCAGTCCCGTCAAGACGGA
 GGAGCCACCGCGAGGGCACCGAAGCTGTGGCAGCATCTGAAATGGCAGAGGGAGGAGCGGAGC
 TATGGGCGACTCTTACGGGGGTGCCGATGGAGTGGGTAATGCCTCGGGAAATTTGGCATTGCCGAT
 CCCAATGGATGGGAAACACAGTCACTACAAAAGACCACAGAACCTGGGTCTGCCAAGCTACAAC
 AACCACTACTACAAAGCAATTTACAGCGGAACCTCTCAAGATGCAAAATGTCCAGTATGCAGGATA
 CAGTACCCCTTGGGGTACTTTGATTTCAACCGCTTCCACTGCCACTTCTCCCCTAGAGACTGGC
 AGAGACTTATCAACAACCATTTGGGGAATCAGACCCAGTCTCTTAAATTCAGATCTTCAATGTCT
 CAAGTCAAAGAATTCACAACGACAGGATCAGACAAAGACCATTGCAAAACAATCTCACCTAACAAT
 TCAAGTCTTTACGGATGATGAGCATCAACTCCCGTATGTCTTGGGCTCGGCTACGGAAAGGCACCA
 TGCCGCGCTTCCGTCGGATGTCTATGCCCTGCCGAGTACGGGTACTGCACAATGCACACCAAC
 CAGAATGGAGCACGGTTCAATGACCGTAGTGCATTTCTACTGCTTAGAGTACTTCCCCTAGTCAGAT
 GCTAAGAACAGGCAACAATTTGAGTTTACATTTGACTTTGAAGAAGTTCTTTTCCATAGCATATT
 TCGCTCATTCACAGGACTTAGACAGGCTGATGAAACCCCTAGTGGATCAATCCTCTGGAATTT
 AATGAGGTAGACAGCAGCAGAAATGCTCAATTTAAAAGGGCTGTGAAAGGGGCTTATGGCACCAT
 GGGCCGCAATTTGGCTGCCAGGACCTAAATTTCTGGATCAAAGAGTTAGGGCTTACACAGGAGGAA
 CAGACAACATATGCAAACTGGAACATCTGGAGTAATGGGAACAAGGTGAATTTGAAAGACAGACAG
 TATCTCTACAACCCGGACTGTGTGAGCTACTTACACAGAAGGGGAGGCTTCCAGCCTTCCAGC
 TCAAAATATTTTGGGATAGCTAAAGATCCATACAGATCAGGCAGCAGTACAGCAGGAATAAGTG
 ACATTTAGGTACCGAAGAACAAAGAGTAGCCTACAATGGAGTAGGGTGGAAACCAATAGT
 AGGACTGTAACGAATGAACAAAACACTACTACAGTCTCTACAAGTTTCAAGTCTGGATGTTCTTGG
 AGCTTTACCAGGAATGGTTTGGCAGAACAGGGATATATCTGACAGGACCTATTTGGGGCAAAA
 TACCGAAGACTGATGGTAAATTTCCATCCTTCTCCGAACTCTCGGAGGATTTGGCCTGCACAATCCA
 CCACCGCAGGTGTTTCATCAAGAATACACCAGTGCCTGCAGACCCTCCAGTAGAATACGTGCACCA
 GAAGTGGAAATTCCTACATAACCCAGTACTCTACGGGCCAGTGTACAGTAGAGATGGTGTGGGAGC
 TGAGAAAAGAGAAATTCAAAGAGATGGAACCCAGAAATCCAGTTTACCAGTAATTTCACTAACAGA
 ACAAGCATAAATGTTGACCTAATGAAACTGGTGGATATGTAGAAGATAGATTGATTTGGAACCAAG
 ATATCTAATCAAAATCTGTAATTTCTGTGTAATAAATTCAAATAAAGCACTTCTTGGCGCGCA
 ATATCCTCTTGTCTTGGTCTCATTGGAGGGTTCGTTTCCGTTTCAAGCCAGCCAATCAGGGGAGGG
 GGAAGTGACGCAAGTTCCGGTCACATGCTTCCGGTGACGCACATCCGGTGACGTAGTTCCGGTCA
 CGTGTCTTCTGTACGTGTTTCCGGTCACGTGACTTCCGGTCATGTGACTTCCGGTGTGACTGTTT
 CCGGCTTAACTATTTGGGCTGACCCGCGCATGCGCGTGGTCAACCTAACAGCCGGAACACCGTCA
 CCGGAAGTCAATGACCCGGAAGTCAAGTACCGGAAACCGTACAGGAAGCACGTGACCCGGAAC
 TACGTACCCGGATGTGCGTCAACCGAAGCATGTGACCCGGAACCTTCCCGTCACTTCCCCCTCCCCTG
 ATTGGCTGGTTCGAACGAACGAACCCCTCCAATGAGA

FIG. 22

PARVOVIRUS DE SERPIENTE 1, SECUENCIA COMPLETA. GENBANK ACCESO NO. NC 006148 y FARKAS ET AL. (2004) J. GEN. VIROL. 85:555
CGCCCCACCCCTAGTGTATCGCGCGCTCTCTCTTTGGGGCCTGACGGCCGAAGGCCGTGAGCT
GCCGAGCTTCGCTCGGCAGGCCCAAGAGAGAGCGCGCGGATCACTAGGGGTGGGGCGAGTG
CCCTGCTCAACGGGTTTTGGTGGGCGGCAATGACGTGACGGACATGTCTGGACATGTC
TTTGAGCAAGTCCATATAAGGAGTTCCGCGGATATGCAAATGAGCAATCGCGCAAAGCATTT
TGGGTAGTCACCATGAATAAAAAGGACAGCAAGAAAGATGACGCCCATATAATTTAATAGGAA
TTTTAACCATGGCGTTTACGAGGTTGTGTTTGGTTTGGCAAGAGACAATAACAACCTTGTGG
ATGAAGATAGATATCAGCCAGAGTTGAAAGAAGAAGATGACTGGCCTGAGGAATATTTAACCA
GTGAAGATGCCAGCTTTATCGGACTAGCCTATGCTGTGCTAAGTGAAATTCGGAGATTCTTTG
GAAAGGAATACAATGGTTTGGCCAGGTTGAATGGTGTCTACTGCTGGTTACCACATGCATG
TTTTGTTGAACCATCTTAAGCTGAGTAACAGACTTATGGAAGAAAGGTCAATGAACCTGGCTT
GCCGTATAGTCGATACCTTTGGCCTAATTAATCCAGAAGAAGTCATCAGTACCATTATGTTA
AAAGCAACTATGGACATAAAAAGGTGAGAGTCAATCACCTAGAGTCTTATTTGAAGAACTACT
TTTTCGAAGAGCTTTAGCTCCTCCCAATTAATCCGAGGAAGGAGACTATAAAAAGAGAGGAAG
AAGTCGTGTGGGTCATTTACGAATATCGTTCGCTTGGAAAGCCATTCGTGGCAATCTCATCA
AGAGATCGGAGCTAGCGACTGTTCTAAGCAACAGAGAATCCGGCGGGGAGACGGACCCGGCA
CTCGAGTGCAGGAAACCCGCCATTTTATGGAACCATCGACTGGTTGGTGAACACTGTTGAA
TTACTACAGAACGAGAATCTGCCACGCCAACCCGCTTTGTACCTGTCTATGCTGGCTTCTA
CTTCCGGGTGCTGGGCAGATTAAAAGAGCGCTGGACCAGGCGAAACACATGATGACCAGCACCA
TGTCAGCAGAGGATTAACCTGACAAACAGAAAGGATGTGATCGAACCACCTGATGAAATAGAA
TCTACAAGATTATGAAACTGAATCGCTATGATCCAGAACTAGCAGCTGCTCTCTTACCGGCT
GGACCTGCAAGAACTTTGGCAAGAGAAACACCATCTGGCTGTATGGTCCAGCTACTACCAGGCA
AAACCATCATCGCTCAAGCTATTGCACATGCTGTTAAACTGTTTGGCTGGTGTAAATTTGGACTA
ATGAAAACCTTTCCCTTCTGTAACTGTCCAGGGAAAACCTGCTTATCTGGTGGGAGGAGGGCAAGA
TGACAAAACAAATGGTGGAGACGGCTAAATGTATATACTGGGGGATCTGCTGATCCTGTAGACA
TCAAAGGCAAAACCCGCTGAAATGTGCTCAAAACCCCTGTATTATTACTAGCAATACTAACA
TGTGTCAAGTATATGATGGTAAATAGTTCTAGCTTTGAGCACCAAGAACCCTAGAGGAACGCA
TGTTTATGTTTCAAGCTTAATACTAACTGCCATCGACCTTTGGCAAGATCACAGAAGAGGAAG
TCAAACAGTTTATTACCTGGGGGAGGAGCTTAAAGGTTCAAGTTCCACATCAGTTTCAAGTGTG
CTACCACAGGAGAGTATAAAAAGGCCAGCCCGAGGCGAAAGCTCATTCTTGGATGAGCCGC
CAAAAGGAGAGGTCCGCGCTATTGATGACTCTCTAACCCAGGTATGTTAACAAATATTGATGAGT
CAGCTACCAGTAGAGAAATGTTTCTAGAGATTGCTAATACTAATCAATGTATGTTGCATCATT
GCTTTTCTTGTACCGAATGTTATCTGAAATTTGCTTGTATGACATGGACAAGCAACAAATAAACTT
ACTGATAACAGATATGGATTTTCTCGATGATTTCTTTGCAGATAAATAAAAAGAGACTGTTTAA
CGAACTCGGTAAACCCGCTCAATCCTAAACCTGTAAAACACATTAGCGAAGCTCACTCGCAACC
TGGCAGCAGGAGGGGCTTTGTGCTGCTGGGTATCGGTATCTTGGGCTGGTAAATAGCTTGGGA
CCGTGGAAAGCCGTTAACAAAGCAGACGAGGCTGCTAAAAGCAGGATCAAGAATACGATCA
ACAGTTAAAGCGGGAGACAATCCCTACATAAAAATAAATCACGCGGACGAAACAGTTTCCAGAA
AGACCTACAAGGTGATACCAGTCTAGCCGGCAACCGGCTAACGCTCTATTTCAAGGCAAAAA
GACTCTACTAGCCGCCCTTTGGCTAGTAGAGACCCTGTTCGGCAAAACGTTCAAAAAGCACA
ATTAGACGAATACTATCTTAAAGCTAAAAGGCCAAACAGGCTTGCAGATACCAGCTCCACC
TAAAGGCGGAGAAGAAGACTACATCGTCACAATCTGGAGGGAGCCAGCAGGTTCCGGATC
TAGCCGGCACATCTGTATGGCTACAGGAGGAGCGGCTCCGATGGCAGACGATAAACAGGCGC
CGAGGGAGTGGGTAATCTCAGGTGATTTGGCATTTGGATACCAAGTGGATGGGAGACCAGCT
CATTACAAGTCAACCAGAACTTGGGTGCTCCCCACTTACGGGAATCATCTACGGGCTAT
CAACTTTGACCGCACCAAGGTTCCGGTGTCTAATGCAGCCTATGCAGGATACAAGACTCCCTG
GGGTACTTTGACTTCAATCGATTCCATTTGCCACTTCTCCCCCGAGACTGGCAAAGACTCAT
CAACAACCAACAGGCATCAGGCCGAAAGGACTCAAAATCAAAGTCTTTAACGTTCAAAGTCAA
AGAAGTTACAACAAGATTCAACGAAACAATTTGCCAACAATCTCACCAGCACCGTACAGAT
CTTTGCGGAGGAATACGACTTACCATATGATATTAGGCAGTGTACACAAGGCACATTTCC
TCCATTTCCCAATGATGATTTATGTTACCACAATATGCTTATTGTACACTTCAAGGAAATTC
GGGAAATTTGTAGATAGAAGTGCTTTTATGTTTGAATATTTTCTTCAAAAATGCTGGAG
AACAGGAAACAATTTTGGATTCCAGTTTAAATTTGAAGAAGTTCCCTTTTCAATCTGGATGGGC
ACAGAGTCAAAGCCTAGACAGATTGATGAATCCGTTGCTTGTATCAATATCTGATAGGAGACTA
TGGAACAGATGCATCAGGAAACCTTATTTATCACAGAGCTGGTCCAATGATTTGAATGAATTT
CTACAAGAATTTGGGCACCTGCACCTATGAAATGATCCAGAATATTAACAGCAGTGAATAATAC
CAAGAATGCTAATTTCTATAAATGGTTCAAATTTCTACCAACAATGGGGACTACAAGGAAGACA
AGCATGGGATGCTCCAGGATTTGTTCAAGCTAGTACCTATGAAGGTGCAGCAGCAGGACAATC
TCTTCTTAAATGGCGTACTTACTTTTCGATAAAAAGTTTCACTACTACTTCTCCAGCTGCTAC
TGCAGTAAACAGAACAATTTGAAGACGAAATACAGGGTACCAATAATTTTGGTAATGCTAGAAA
TAACATTTGTTGCTATCAATCAACAAAACGAAAGGAACAAATCCAACAACAGGTAGTACATCTCA
ATTTGAGACAATGCCAGGTATGGTGTGGTCTAATAGAGACATTTACTTACAGGGGCTTATTTG
GGCTAAAATTTCAAATAACAGATGGACATTTTCTCCTTCTCCAGAATGGTGGTTTGGATT
AAAACATCTCCGCTATGATTTCTGATCAAAAATACACCAGTTTCTGCTGATCTCCAACCTAC
CTTCAATCCAATGCCACAGACTAGTTTTCATTACTGAATACAGTACAGGACAAGTAAGTGTGA
AATGTTTGGGAGGTACAGAAAGAACTCCTCAAAGATGGAATCCAGAAGTACAGTTTACTTTC
CAATTTTGGAACTTCAGATCCAGCTGTTGATGGAATACCGTTTGGAAATTAATAATTTGGGTAC
TTATGTTGAATCTAGACCTATTTGAACTCGTTATATTTCTAAACACTTGTAAATAATAAAAAT
TGTCAAATTTGCACTAAGAATTTGTTGTCAGGTGGTTGTTTACATGCTTGTCTAAAACACGCCCA
CCAAAACCCGTTGAGCAGGGCACTCGCCACCCTAGTGATCGCGCGCTCTCTTTGG
GGCTTCCGAGCAAGCTCGGCAGCTGACGCCCTTCCGCCGTGAGGCCCAAGAGAGAGCGCG
CGCGATCACTAGGGGTGGGGCG

FIG. 23

ITR QUIMÉRICOS

ITR2
 1 AGGAACCCCT AGTGAATGGAG TTGGCCACTC CCTCTCTGG CCTCTCTGG CTCACTGAG GCGGGGACC AAAGTGGCC CGAGCCCGCC CCTTTGGCC
 101 GGGCCCCCTCA GTGAGCGAGC GAGGGGAG AGAGGGAGTG GCGAACTCCA TCACTAGGGG TTCCCT

ITR5
 1 TACAAAACCT CCTTTGCTGA GAGTGTGGA CTCCTCCCTC TGTGGGTTT GCTGCTGTC TGGCTGTTT GGGGGGGGA CCGCCCAAG GGGCGTGTG
 101 TGGCAGCTCT TTGAGCTGCC ACCCCCCCA ACAGCGAGC GAGCGAGGA AGGCACAGG GGGGAGAGTG CCACACTCTC AAGCAAGGAG GTTTTGTGTA

ITR5+2SNS
 1 AGGAACCCCT AGTGAATGGAG TTGGCCACTC CCTCCCTCT GTCGGTTTG CGGCTGGCT CGCTACTGA GGGGGGGGA CCAAGGTTG CCGAGCCCG
 101 GCGCTTTGG CCGGGCCCT CAGTGAAGA GCGAGCGGC GAAAGGACA GGGGGGAGG AGTGGCCAA TCCTACTATA GGGGTTCTT

ITR2+5SNS
 1 TACAAAACCT CCTTTGCTGA GAGTGTGGA CTCCTCCCTC TGTGGGTTT GGGGCTGTC TGGCTACTG AGGGGGGG ACCAAGGTC GCGCGAGCC
 101 GCGCTTTGG GCGGGCCCT TCAGTGAAG ACCGAGGG GAAAGGACA GGGGGGAG GTGCCACT CTCAAGCAAG GAGTTTGT A

ITR5+2NS
 1 AGGAACCCCT AGTGAATGGAG TTGGCCACTC CCTCCCTCT GTCGGTTTG GGGGCTGTC TGGCTACTG AGGGGGGG ACCAAGGTC GCGCGAGCC
 101 GCGCTTTGG GCGGGCCCT TCAGTGAAG ACCGAGGG GAAAGGACA GGGGGGAG GTGCCACT CTCAAGCAAG GAGTTTGT A

ITR2+5NS
 1 AGGAACCCCT AGTGAATGGAG TTGGCCACTC CCTCCCTCT GTCGGTTTG GGGGCTGTC TGGCTACTG AGGGGGGG ACCAAGGTC GCGCGAGCC
 101 GCGCTTTGG GCGGGCCCT TCAGTGAAG ACCGAGGG GAAAGGACA GGGGGGAG GTGCCACT CTCAAGCAAG GAGTTTGT A

ITR2 - TA
 1 TACAAAACCT CCTTTGCTGA GAGTGTGGA CTCCTCTCT GGGCTGTC GCTCACTGAG GGGGGGGGA CAAAGTGGC CCGAGCCCG GCGCTTTGGG
 101 CCGGGGGCC CTCAGTGAAG GAGCGAGGC GCGAGAGAG TGGCACTC TCAAGCAAG AGTTTGTGTA

ITR5 + TA
 1 AGGAACCCCT AGTGAATGGAG TTGGCCCTCC TCTCTGGG CTGGCTGCT CACTGAGGC GGGCAACCA AGGTGCGCG ACCGCCCGCC CTTTGGGCGG
 101 GCGGGCCCTC AGTGAATGGAG CCGAGCGGA GAGAGGAG GCGCTCTAT CACTAGGGT TCCT

ITR5 + TA
 1 TACAAAACCT CCTTTGCTGA GAGTGTGGA CACTCTCC CCTTTGGT TGGCTGTC GCTGGCTGT TTGGGGGG GAGGGCCCA AGGGCGTGTG
 101 TCTGGCAGCT CTTTGAAGCTG CCGCCCCC AAGAGGCA GCGAGCGGC GAAAGGACA GGGGGGAG TGTCCACTC TCTAAGCA GAGTTTGTG
 201 TA

ITR2 -GC
 1 AGGAACCCCT AGTGAATGGAG TTGGCCACTC ATTCTGGG CTGGCTGCT CACTGAGGC GGGCAACCA AGGTGCGCG ACCGCCCGCC TTTTGGGCGG
 101 GCGCTCTAGT GAGCGAGGA GCGGGCAAA TGGAGTGGC AACTCCATAC TAGGGTTCC T

FIG. 24

ITR5 +3C
 1 TACAAAACT CCTGTCTGG AGAGTGTGC ACTCTCCCC CCTGTGGGT TCGCTGGCTC GCTGGCTCGT TTGGGGGGGC GAGGCCCAA AGGGCCGTGG
 101 TCTGGCAGT CHTTGGCTG CTAACCCCC AAAGAGCA GCGAGCGAG GAACCGACA GGGGGGAGA GTCCACTACT CTCFAGCAA GGAGTTTGG
 201 TA
ITR2 -2nt
 1 AGGAACCCCT AGTGTGTGG TTGGCCACT CCGGGGCTC GCTGGCTCAC TTAGGGGGGG CCAACCAAGG TCGCCCGAGC CCGGCCCTTT GGGCCCGGGC
 101 CCTCAGTGG CCGAGCGGG CCGCGGAGTG GCCAACTCCA GCACTAGGG TTUCCI
ITR2 5nt
 1 AGGAACCCCT AGTGGAGTGG GCCACTCTC TGGGGCTGG CTGGCTCACT GAGGGGGGC GACCAAGGT CGCCCGAGCC CGGCCCTTGG GGGCCGGGCC
 101 CTCAGTGGC GAGCGAGCC GCFAGAGGAT GGCAACTCC ACTAGGGT CCT
ITR2+7
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGCCACT CCTCCAGGG TTCTGGGCTC TCGCTGGCTC ACTGAGGGG GGGACCAA GGTGGCCCGA GGGCCGGGCC
 101 TTGGGGCCG GGGCCCTCA GTGAGCGAG GAGGGCGAG AACGGTGA GGGAGTGGC AACCCATCA CTAGGGTTC CT
ITR2 9nt
 1 AGGAACCCCT AGTGGATGGA GTTGGCCACT CCTCTCTCG CGGCTGGCT CGCTCACTA GGGGGGGGA CCAAGGTGG CCGAGGCCG GCCCTTTGGG
 101 CCGGGCCCT CAGTGGAGCA GCGAGCGGC AGAGGAGTGG CCAACTCCAC TAGGGTTC T
ITR2 10nt
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGCCACT CCTCCAGGG TTCTGGGCTC TCGCTGGCTC ACTGAGGGG GGGACCAA GGTGGCCCGA GGGCCGGGCC
 101 TTGGGGCCG GGGCCCTCA GTGAGCGAG GAGGGCGAG AACGGTGA GGGAGTGGC AACCCATCA CTAGGGTTC CT
ITR2 11nt
 1 AGGAACCCCT AGTGTGATG GAGTGGCCA CTCCTCAG CTCGGGCTT CCGCTGCTCA CTGAGGGGG GCGACCAAG GTGGCCCGAG CCGGCCCTT
 101 TGGGGCCGC CCTCAGTGA GCGAGCGAG GCGCAGAGT GAGGGAGTGG CCACTCCAT CACGACTAGG GGTUCCI
ITR2 15nt
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGCCACT CCTCCCGCTT GTGGGTTGG CGGCTGGCT CGCTCACTGA GGGGGGGGA CCAAGGTGG CCGAGGCCG
 101 GCCCTTTGG CCGGGCCCT CAGTGGAGCA GCGAGCGGC AGAGGGGAG TGGCCACTC CACTACTAGG GGTUCCI
ITR5 3nt
 1 TACAAAACT CCTGTCTGA GAGTGGCA CTCCTCTGCT CGCTGGCTGG GGGGGAGGG CCAAGGGC GGTCTCTGG CAGCTCTTGG
 101 AGCTGCCACC CCCCCTAAC AGCCAGGAG GAGTGGACA GATGCCACA CTCFAGCA AGGAGTTT GTA

FIG. 24 (cont.)

ITR5 6nt
 1 TACAAAACCT CCTTGTCTTAG AGTGTGGCAC TCTCCCCCTG TGGGHTTGC TCGCTGCTG GGGGGGACG GCCCAAGGG CCGTGTCTG
 101 GCAGCTCTTT GAGCTGCCAC CCCCCCAAC GAGCCAGCA GCGAGCGAAC GCGACAGGG GAGAGTGCCA CACTTAAAG AGGAGGTTT TGTA
ITR5 9bp NS
 1 TACAAAACCT CCTTGTCTTGA GAGAGTGTGG CACTCTCTCC CCCCTGTGC GTTCGCTGCT TCGCTGGG GCGACGGCC AAAGGCGCT
 101 CGTCTGGCAG CTCCTTTGAG TCGCACCCC CCAAAAGAGC CAGGAGCGA GCGAAGCGA CAGGGGGAG AGAGTCCAC ACTCTCTCA GCAAGGAGGT
 201 TTTTGTA
ITR5 21nt
 1 TACAAAACCT CCTTGTCTTGA GAGTGTGGCA CTCATAGGCT CCCCCTGTG GGTGTGGC GCTCGTGGC TGTGTGGG GGGCGAAGC CCAAGGGCC
 101 GTCGTGGC AGCTCTTGA GCTGCCCC CCCCCAACG GCGAGAGC GAGCGAAGC GACGAGGG GGTGTGGG GGTGTGGG TCGCACACTC TCAAGCAAG
 201 AGGTTTGTGA
ITR5 30nt
 1 TACAAAACCT CCTTGTCTTGA GAGTGTGGCA CTCACAGCG TAGATCTAGA CCCCCTGTG CGTGTGGCT CTGCTGGG GGTGTGGG GCGACGGCC
 101 CAAAGGGCG TCGTCTGGCA GCCTTTTGA CTCGACACC CCAAAAGAG CCAAGAGCG GCGAAGCG AGCGAAGCG ACAGGGGTC TAGATCTAAG GTGAGAGTGC
 201 CACTCTTCA AGCAAGGAGG TTTTGTA
ITR5 GAGY
 1 TACAAAACCT CCTTGTCTTGA GAGTGTGGCA CTCGCTGGC TCGTGGCT TGGCTGTGTT GGGGGGGCA GGGCCCAAAG GGGCGTGTG
 101 TGGCAGCTT TTGAGCTGC ACCCCCCCA ACGAGCCAGC GCGAGCGCA GCGAGCGAG CCACTCTC AGCAAGGAG GTTTTGTA
ITR5 No GAGY
 1 TACAAAACCT CCTTGTCTTGA GAGTGTGGCA CTCGCTGGC CTCAGATGA GCTCGTGGC TGGCTGTGTT GGGGGGGCA GGGCCCAAAG GGGCGTGTG
 101 TGGCAGCTT TTGAGCTGC ACCCCCCCA ACGAGCCAGC GCGAGCGCA CACTTACT GGGGAGTGC CCACTCTC AGCAAGGAG GTTTTGTA
ITR2 +8nt GAGY
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGCCACT CCCTCTGCT CCGTGGCG GAGCAGAG GAGTGGCCA ACTCATCAC TAGGGTTCC T
 101 TTTGGGCGG GCCCTCAGT GAGCGAGCA GCGCGAGG GAGCAGAG GAGTGGCCA ACTCATCAC TAGGGTTCC T
ITR5 SPACER RBE
 1 TACAAAACCT CCTTGTCTTGA GAGTGTGGCA CTCGCTGGC TGTGGGTTT GCTCAGCTAA GATCAGTTT GGGGGGGCA GGGCCCAAAG GGGCGTGTG
 101 TGGCAGCTT TTGAGCTGC ACCCCCCCA ACTCATCTT AGCTAGCGA ACGGACAG GGGGAGTGC CCACTCTC AGCAAGGAG GTTTTGTA
ITR2 +8-8 SPACER RBE
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGCCACT CCCTCTGCT CCGTGGCG GAGCAGAG GAGTGGCCA ACTCATCAC TAGGGTTCC T
 101 TTTGGGCGG GCCCTCAGT GAGCAGAG GAGTGGCCA ACTCATCAC TAGGGTTCC T

FIG. 24 (cont.)

ITR5 CON HORQUILLAS DE ITR2
 1 TACAAACCT CCTGCTTGA GAGTGTGGCA CTCVCCCC TGTGGTTC GTTCCTCC TGGCTGTTT GGGGGGGG GGCACCAAG GTCCGCCGAG
 101 CCGGGCCCTT TGGGCCGGC CCCCCCAA CAGCCAGCG AGCAGCGAA CGGCACGG GGCAGGTGC CACTCTCA AGCAAGGAGG TTTTGTGA
 ITR2 SIN HORQUILLAS
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGCCATC CCTCTCTGG CGCTCTCG CTACTTAG CGCCCTTTG GCGCCCTCA GTAGCCAGC GAGCGCGAG
 101 AGAGGAGTG GCCACTCCA TCACTAGGG TTCTT
 ITR2 T1
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGGTTCTG CGGGCGCTGG CTGGCTACT GAGGGGGGC GACCAAGGT CGCCCGAGC CGGCCCTTTG GCGCGGGGCC
 101 CTCATGAGC GAGCGAGGC GGCAGACC CACTCCATC ACTAGGGTT CCT
 ITR2 T2
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGACTCC CTCCTTGGC GCTGGTGC TCACTAGGG CGGGGACA AAGTGGCC GAGCCCGGCC CTTTGGGCGG
 101 GCGCCCTCAG TTAGCGAGG AGCGCGAGA GAGGGAGTCC CCACTCCAT CACTAGGGGT TCCT
 ITR2 T2 #2
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGGTTTAA CTCCTGGGC TCGCTGGTC ACTGAGGG GGCACCAA GGTCCCGA CCGCGCCCT TTGGGCGGGG
 101 CCGCTCAGT AGCGAGCGAG CGCGAGAGT TAAACCAAC TCACTACTA GAGTTTCT
 ITR2 T3
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGTCCCT CTCCTGGCT CTCCTCCA CTGAGGGG GGCACCAA GTGGCCCGT CCGGCGCCCT TTGGGCGGGC
 101 CCGCTCAGT GCGAGCGAG GCGAGAGG GCACTACT CACTACTAG GGTTCCT
 ITR2 T4
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGGTTAA CCGCTCTGG CGCTCTCG CTACTAGG GGGGCGACC AAAGTGGCC GAGCGCGCC CTTTGGGCGG
 101 GCGCCCTCA GTAGCGAG GCGCGCGAG AGGGTTTAA CCGACTCA TCACTAGGG TTCTT
 ITR5+3nt ESPAÑOL & ITR5 NS
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGCCATC CCCTCTGGT CGCTCTCG CTGGTTGG GGGGCGAG CCAAGGCG GTTCCTCTGG CAGCTCTTTG
 101 AGCTGCCACC CCCCCAAG AGCCAGCG GAGCGAGA GCGAGTGG CACTCCATCA CTAGGGTTC CT
 ITR2 pIpa8
 1 AGGAACCCCT AGTATGGAG TTGGGTTAA CCGCACTCC CTCCTGGG CCGCTGGCT CACTGAGGG GGGCGACCA AAGTGGCG AGCCCGGCC
 101 TTTGGGCGG GCGCCCTCAGT GAGCGAGA GCGCGAGAG AGGGTGGG GTTAAACCA ACTCCATCA TAGGGTTCTT

FIG. 24 (cont.)

PROTEINAS REP QUIMERICAS

REP52AA73

1 MAITFEVIVR VPFVVEHLP GISDSFVDWV TGOIWELPPE SDINLILIVEQ POLTVADRIR RVFLYEWNKF SKAPEALFFV QFEKESYFH MHVLVETIGV
 101 KSMVLGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPTLFN WFAVTKIRNG AGGENKVVDE CYLIPNLLPK TPELQWAMT NMEQYLSACL NLTERRRLVA QHLIHSVQIQE
 201 EQNKNQNPEN SDAPVTRSKT SARYMELVGN LVDKGLITSEK QMIQEQASY ISFNAASNSR SQIKAAALDNA GKIMSLITKTA PDYLVGQQPV EDISSNRIYK
 301 ILELNGYDPQ YAASVFLGWA TKKFKRRNTI MLFGPATIGK INIAEAIAHT VPFYGCNVNI NENFFNDCV DRWITWEEG KMTAKWVESA KAILGSSKVR
 401 VDQKCKSSAQ IDPTFVIVTS NINMCAVIDG NSTTFFHOOP IQDRMFKFEL TRRLDHDGK VTKQEVKDFE RWAKDHVVEV EHEFVVKKG AKRPAPSDA
 501 ISEPKRVRE VSAQBSTSDA EASINVADRY QNKCSRHVGM NMLFPCRQC ERMQNENIC FTHGQKDCLE CFPVSESQPV SVWKKAYQKL CYIHHIMGKV
 601 DACTACDLVN NVLDLDCIFE Q*

REP52AA84

1 MAITFEVIVR VPFVVEHLP GISDSFVDWV TGOIWELPPE SDINLILIVEQ POLTVADRIR RVFLYEWNKF SKQESKFFVQ FEKG ESYFH MHVLVETIGV
 101 KSMVLGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPTLFN WFAVTKIRNG AGGENKVVDE CYLIPNLLPK TPELQWAMT NMEQYLSACL NLTERRRLVA QHLIHSVQIQE
 201 EQNKNQNPEN SDAPVTRSKT SARYMELVGN LVDKGLITSEK QMIQEQASY ISFNAASNSR SQIKAAALDNA GKIMSLITKTA PDYLVGQQPV EDISSNRIYK
 301 ILELNGYDPQ YAASVFLGWA TKKFKRRNTI MLFGPATIGK INIAEAIAHT VPFYGCNVNI NENFFNDCV DRWITWEEG KMTAKWVESA KAILGSSKVR
 401 VDQKCKSSAQ IDPTFVIVTS NINMCAVIDG NSTTFFHOOP IQDRMFKFEL TRRLDHDGK VTKQEVKDFE RWAKDHVVEV EHEFVVKKG AKRPAPSDA
 501 ISEPKRVRE VSAQBSTSDA EASINVADRY QNKCSRHVGM NMLFPCRQC ERMQNENIC FTHGQKDCLE CFPVSESQPV SVWKKAYQKL CYIHHIMGKV
 601 DACTACDLVN NVLDLDCIFE Q*

REP52AA110

1 MAITFEVIVR VPFVVEHLP GISDSFVDWV TGOIWELPPE SDINLILIVEQ POLTVADRIR RVFLYEWNKF SKQESKFFVQ FEKGSYFHL HTLVETSGLS
 101 SMVLGRYVSQ IREKLIQRIY RGIPTLQFN FAVTKIRNGA GGNKVUDEC YIENYLLPKT QPELQWAMT NMEQYLSACL NLTERRRLVAQ QHLIHSVQIQE
 201 QNKNQNPENS DAPVTRSKTS ARYMELVGNL VDKGLITSEKQ WIQEQASYI SFNAASNSRS QIKAAALNAG KIMSLITKAP DYLNGQOPVE DISSNRIYKI
 301 IELNGYDPQY AASVFLGWAT KFKRRNTIWL LFGPATIGKT NIAEAIAHTV PFGCVNWIN ENFFNDCVD KMTWEEGK MIAKVVESAK AILGSSKVRV
 401 DQCKSSAQI DPTFVIVTSN TNMCAVIDGN STTFFHQOPL QDRMFKFELT RRLDHDGKV TKQEVKDFFR WAKDHVVEVE HEFVVKKGGA KRRPAPSDAD
 501 ISEPKRVRES VAQBSTSDAE ASINVADRYQ NKCSRHVGMN IMLFPCRQCE RMQNENICF THGQKDCLECF FVVSFSPVSV VVKAYQKLC YIHHIMGKVP
 601 DACTACDLVN VDLDCIFEQ *

REP52AA126

1 MAITFEVIVR VPFVVEHLP GISDSFVDWV TGOIWELPPE SDINLILIVEQ POLTVADRIR RVFLYEWNKF SKQESKFFVQ FEKGSYFHL HTLVETSGLS
 101 SMVLGRYVSQ IRAQLKVVVF QGIEPTLQFN FAVTKIRNGA GGNKVUDEC YIENYLLPKT QPELQWAMT NMEQYLSACL NLTERRRLVAQ QHLIHSVQIQE
 201 QNKNQNPENS DAPVTRSKTS ARYMELVGNL VDKGLITSEKQ WIQEQASYI SFNAASNSRS QIKAAALNAG KIMSLITKAP DYLNGQOPVE DISSNRIYKI
 301 IELNGYDPQY AASVFLGWAT KFKRRNTIWL LFGPATIGKT NIAEAIAHTV PFGCVNWIN ENFFNDCVD KMTWEEGK MIAKVVESAK AILGSSKVRV
 401 DQCKSSAQI DPTFVIVTSN TNMCAVIDGN STTFFHQOPL QDRMFKFELT RRLDHDGKV TKQEVKDFFR WAKDHVVEVE HEFVVKKGGA KRRPAPSDAD
 501 ISEPKRVRES VAQBSTSDAE ASINVADRYQ NKCSRHVGMN IMLFPCRQCE RMQNENICF THGQKDCLECF FVVSFSPVSV VVKAYQKLC YIHHIMGKVP
 601 DACTACDLVN VDLDCIFEQ *

FIG. 25

REP52AA138
 1 MAIFYEVIVR VPFVVEHLP GISDSFVDMV TGOIWELPPE SDINLILVEQ PQLIVADRIR RVFLYENKF SKQESKFFVQ FEKGEYFHL HILVETSGIS
 101 SMVLGRYVSQ IRAQLVKVVF QGLEPQINDW VAITKVKKG GNVVDFCYI FNYLIPKTOP ELQWATNME QYISACLINLT ERKRLVAQHL THVSOTQEQN
 201 KENQNPNSDA PVIRSKTAR YMELVGLVD KGITSEKQMI QEDQASYISF NAAASRSQI KAALNAGKI MSLITAPDYL LVGQOPVEDI SSNRIYKILE
 301 LINGYDQYAA SVFLGWAUKK FGRNITWLF GPATTKGKINI ABAIAHTVPP YGCVANMINP FPNDCVDRM VIMWEEGRMT AKVVESAKAI IGGSKVRVDQ
 401 KCKSSAQIDP TPVIVTNSIN MCAVIDGNST IFEHQQLQD RMFKFELTR LDHDFGKVK QEVKDFRWA KDHVVEHEHE FYVKGGAKK RPAFSDADIS
 501 EPRKRVESVA QPSTSDAEAS INVADRYQNK CSRHVGNMILM LFPQRQCEMR NQNSNICFTH GQKDCLECFP VSESQPVSVV KKAYQKLCYI HILMGKVPDA
 601 CTACDLVNVLD LDDCIFEQ*

REP52AA160
 1 MAIFYEVIVR VPFVVEHLP GISDSFVDMV TGOIWELPPE SDINLILVEQ PQLIVADRIR RVFLYENKF SKQESKFFVQ FEKGEYFHL HILVETSGIS
 101 SMVLGRYVSQ IRAQLVKVVF QGLEPQINDW VAITKVKKG ANKVVDSGYI PAYLLPKVQP ELQWATNME QYISACLINLT ERKRLVAQHL THVSOTQEQN
 201 KENQNPNSDA PVIRSKTARY MELVGLVYDK GITSEKQMIQ EDQASYISFN AASNSRSQIK AALDAGKIM SLITKAPDYL VGQOPVEDIS SNRIYKILEL
 301 NGYDQYAA SVFLGWAUKK FGRNITWLF GPATTKGKINI ABAIAHTVPP YGCVANMINP FPNDCVDRM VIMWEEGRMT AKVVESAKAIL GGSKVRVDQK
 401 KCKSSAQIDPT FVIVTNSINM CAVIDGNSTI FEHQQLQDR MFKFELTRRL DEDFGKVKQ EVKDFFRWAK DHVVEHEHEF YVKGGAKKR PAPSADISE
 501 PKRVRESVAQ PSTSDAEASI NYADRYQNK SRHVGNMILM FPCRQCEMRN QNSNICFTHG QKDCLECFPV SESQPVSVVK KAYQKLCYTH HMGKVPDAC
 601 TACDLVNVLD DDCIFEQ*

REP52AA175
 1 MAIFYEVIVR VPFVVEHLP GISDSFVDMV TGOIWELPPE SDINLILVEQ PQLIVADRIR RVFLYENKF SKQESKFFVQ FEKGEYFHL HILVETSGIS
 101 SMVLGRYVSQ IRAQLVKVVF QGLEPQINDW VAITKVKKG ANKVVDSGYI PAYLLPKVQP ELQWATNLD EYKLAACINLT ERKRLVAQHL THVSOTQEQN
 201 KENQNPNDAP VIRSKTARYM ELVGLVMDKG ITSEKQWIOE DQASYISENA ASNSRSQIKA ALDAGKIMS LITKAPDYL VGQOPVEDISS NRIYKILELN
 301 GYDQYAA SVFLGWAUKK FGRNITWLF GPATTKGKINI ABAIAHTVPP YGCVANMINP FPNDCVDRM VIMWEEGRMT AKVVESAKAIL GGSKVRVDQK
 401 KCKSSAQIDPT FVIVTNSINM CAVIDGNSTI FEHQQLQDR MFKFELTRRL DEDFGKVKQ EVKDFFRWAK DHVVEHEHEF YVKGGAKKR PAPSADISEP
 501 KRVRESVAQF STSDAEASIN YADRYQNK SRHVGNMILM FPCRQCEMRN QNSNICFTHG QKDCLECFPV SESQPVSVVK ANQKLCYTH IMGKVPDAC
 601 ACDLVNVLD DDCIFEQ*

REP52AA187
 1 MAIFYEVIVR VPFVVEHLP GISDSFVDMV TGOIWELPPE SDINLILVEQ PQLIVADRIR RVFLYENKF SKQESKFFVQ FEKGEYFHL HILVETSGIS
 101 SMVLGRYVSQ IRAQLVKVVF QGLEPQINDW VAITKVKKG ANKVVDSGYI PAYLLPKVQP ELQWATNLD EYKLAALNLE ERKRLVAQHL THVSOTQEQN
 201 EQNKENONEN SDAPVIRSKT SARVMELVGM LVDKGITSEK QWIOEDQASY ISFNAAASNR SQIKAAALDNA GKIMSLITKA PDYLVGQOPV EDISSNRIYK
 301 ILELINGYDQ YAA SVFLGWAUKK FGRNITWLF GPATTKGKINI ABAIAHTVPP YGCVANMINP FPNDCVDRM VIMWEEGRMT AKVVESAKAIL GGSKVRVDQK
 401 VDKCKSSAQ IDPTFVIVTNSINM CAVIDGNSTI FEHQQLQDR MFKFELTRRL DEDFGKVKQ EVKDFFRWAK DHVVEHEHEF YVKGGAKKR PAPSADISEP
 501 DISEPKRVRE SVAQPSISDA EASINVADRY QNKCSRHVGNMILM FPCRQCEMRN QNSNICFTHG QKDCLECFPV SESQPVSVVK ANQKLCYTH IMGKVPDAC
 601 PDACTACDLV NVLD DDCIFEQ Q*

FIG. 25 (cont.)

REP52AA207
 1 MATFYEVIVR VPFDVEHLP GISDSFVNW TGQIWELPPE SDMLNLEQ PQLTVADRIR RVFLYENKCF SKQSKFFVQ FEKGEYFHL HILVETSGLS
 101 SMLGRYVSQ IRAQLVKWF QGIEPQINDW VALTKVKKG ANKVVDSGYI IPAYLLPKVQ ELQWAWINLD EYKLAALNLE ERKRLVAQFL AESSORSQBN
 201 KENQPNSDA PVIRKSARY MELVGLVYDK GITSEKQWQ EDQASYISFN AASNSRSQIK AALDNAGKIM SLITKAPDYL VGOQFVEDIS SNRIYKILEL
 301 NGYDPQYAS VFLGWAITKF GKRNTIWLFG PAITGKINIA EAJAHIVPFY GCNVWINENF PFNDQVDRMW IWWEBGKMTA KVVESAKAIL GGSKVRVDQK
 401 CKSSAQIDPT FVIVTSNIM CAVIDGNSIT FEHQOPLQDR MFKFELTRRL DHDGFKVTKQ EVKODFFRWAK DVVVEVEHEF YVKGGAKKR PAPSADALSE
 501 PKRVRESVAQ PSTSDARASI NYADRYQNK SRHVGMNML FPCRQERMN QNSNICFTHG QKDCLECFPV SESQPVSVVK KAYQKLCYTH HTMGKVPDACC
 601 TADLWVVDL DDCIFRQ*

REP25AA73
 1 MFGFYELVIK VPSDLDGHL P GISDSFVNW AEKEMELPPD SDMLNLEQ APLITVAEKLO RDFLJEMRRV SKQSKFFVQ FEKGEYFHL HILVETSGLS
 101 SMLGRYVSQ IRAQLVKWF QGIEPQINDW VALTKVKKG ANKVVDSGYI IPAYLLPKVQ ELQWAWINLD EYKLAALNLE ERKRLVAQFL AESSORSQBN
 201 ASQREFSADP VIKSKTSQKY MALVWMLVEH GITSEKQWQ ENQESYLSFN STGNSRSQIK AALDNAGKIM SLITKAPDYL VGOQFVEDIS SNRIYKILEL
 301 NGYDPAYAGS ILYGWCORSF NKRNIVWLYG PAITGKINIA EAJAHIVPFY GCNVWINENF PFNDQVDRMW IWWEBGKMTA KVVESAKAIL GGSKVRVDQK
 401 CKSSVQIDST FVIVTSNIM CVVVDGNSIT FEHQOPLQDR MFKFELTRRL DHDGFKVTKQ EVKODFFRWAK DVVVEVEHEF YVKGGAKKR PAPSADALSE
 501 GDVINTISYK LEKRARLSF VPEIPRSSDV TVDEPAPLRPL WNSRYDCKD YHAQFDNLS NKDCECEYLN RGKNGCICHN THOQICHGIP PWKEKENSDF
 601 GDFDDANKE Q*

REP25AA77
 1 MFGFYELVIK VPSDLDGHL P GISDSFVNW AEKEMELPPD SDMLNLEQ APLITVAEKLO RDFLJEMRRV SKAPEALFFV QFEKGEYFHL HILVETSGLS
 101 SSMVGRYVS QIRAOVLKVV FQIEPQIND WVALTKVKKG GANKVVDSGY IPAYLLPKVQ PELQWAWINL DEYKLAALNLE ERKRLVAQFL AESSORSQBN
 201 AASQREFSAD PVIKSKTSQK YMALVWMLVE HGITSEKQWQ ENQESYLSFN STGNSRSQIK AALDNAGKIM SLITKAPDYL VGOQFVEDIS SNRIYKILEL
 301 MNGYDPAYAG SILEYWCORS FNKRNTIWLFL GPATIGKINI AEAIAHIVPF YGCNVWINEN FPFNDQVDRMW LIWWEBGKMTA KVVESAKAIL GGSKVRVDQ
 401 KCKSSVQIDS TPVIVTSNIN MCVVVDGNSIT TFEHQOPLQDR RMFKFELTRR LPPDFGKLIK QEVKODFFAWA KANQVPTHE PKVPRELAGT KGAEKSLKRP
 501 LGDVINTISYK SLEKRARLSF VPEIPRSSDV TVDEPAPLRPL WNSRYDCKC DYHAQFDNLS NKDCECEYLN RGKNGCICHN VTHOQICHGIP PWKEKENSDF
 601 FGDFDDANKE Q*

REP25AA97
 1 MFGFYELVIK VPSDLDGHL P GISDSFVNW AEKEMELPPD SDMLNLEQ APLITVAEKLO RDFLJEMRRV SKAPEALFFV QFEKGEYFHL HILVETSGLS
 101 SSMVGRYVS QIRAOVLKVV FQIEPQIND WVALTKVKKG GANKVVDSGY IPAYLLPKVQ PELQWAWINL DEYKLAALNLE ERKRLVAQFL AESSORSQBN
 201 AASQREFSAD PVIKSKTSQK YMALVWMLVE HGITSEKQWQ ENQESYLSFN STGNSRSQIK AALDNAGKIM SLITKAPDYL VGOQFVEDIS SNRIYKILEL
 301 MNGYDPAYAG SILEYWCORS FNKRNTIWLFL GPATIGKINI AEAIAHIVPF YGCNVWINEN FPFNDQVDRMW LIWWEBGKMTA KVVESAKAIL GGSKVRVDQ
 401 KCKSSVQIDS TPVIVTSNIN MCVVVDGNSIT TFEHQOPLQDR RMFKFELTRR LPPDFGKLIK QEVKODFFAWA KANQVPTHE PKVPRELAGT KGAEKSLKRP
 501 LGDVINTISYK SLEKRARLSF VPEIPRSSDV TVDEPAPLRPL WNSRYDCKC DYHAQFDNLS NKDCECEYLN RGKNGCICHN VTHOQICHGIP PWKEKENSDF
 601 FGDFDDANKE Q*

FIG. 25 (cont.)

REP25AA116
 1 MFGFYEIVIK VPSDLDGHL P GISDSFVNWV AEKWEELPPD SIMDNLNIEQ APLIVAELQ RDFLTEMRRV SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVEITGV
 101 KSMVLGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPQIND WVALTKVKG GANKVDSGY IPAYLLPKVQ PELQAWINL DEYKLAALN EERKRLVAQF LAESSQRSQE
 201 AASQREFSAD PVIKSKTSQK YMALVNLWLV EHGITSEKQI WQENQESYL SFNSTGNSRSQI KAALDNATKI MSLITSAVDY LVGSSVPEDI SKNRIWQIFE
 301 MNGYDPAYAG SIIYGWQORS FNRNRTVWLY GPATIGKINI AEATAHTVPP YGCNVNWIN ENFPNDCVDK LIWBEKMT NKVVESAKAI LGGSKVRVDQ
 401 KCKSSVQIDS TPIVIVTNSIN MCVVVDGNSI TFEHQOPLER RMFKFELTKR LPPDFGKIUK QEVKDFAWA KVNQVFTHE FKVPRELAGI KGAEKSLKRP
 501 LGEVINTSYK SLEKRRLSE VPEIPTSDDV TVDEPAPLRL NNSRYDCKC DYHAQFDNIS NKDECEYLN RGNCGICHN VTHOQICHGI PFWEKENLSD
 601 FGDFFDANKE Q*

REP25AA125
 1 MFGFYEIVIK VPSDLDGHL P GISDSFVNWV AEKWEELPPD SIMDNLNIEQ APLIVAELQ RDFLTEMRRV SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVEITGV
 101 KSMVLGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPQIND WVALTKVKG GANKVDSGY IPAYLLPKVQ PELQAWINL DEYKLAALN EERKRLVAQF LAESSQRSQE
 201 AASQREFSAD PVIKSKTSQK YMALVNLWLV EHGITSEKQI WQENQESYL SFNSTGNSRSQI KAALDNATKI MSLITSAVDY LVGSSVPEDI SKNRIWQIFE
 301 MNGYDPAYAG SIIYGWQORS FNRNRTVWLY GPATIGKINI AEATAHTVPP YGCNVNWIN ENFPNDCVDK LIWBEKMT NKVVESAKAI LGGSKVRVDQ
 401 KCKSSVQIDS TPIVIVTNSIN MCVVVDGNSI TFEHQOPLER RMFKFELTKR LPPDFGKIUK QEVKDFAWA KVNQVFTHE FKVPRELAGI KGAEKSLKRP
 501 LGEVINTSYK SLEKRRLSE VPEIPTSDDV TVDEPAPLRL NNSRYDCKC DYHAQFDNIS NKDECEYLN RGNCGICHN VTHOQICHGI PFWEKENLSD
 601 FGDFFDANKE Q*

REP25AA141
 1 MFGFYEIVIK VPSDLDGHL P GISDSFVNWV AEKWEELPPD SIMDNLNIEQ APLIVAELQ RDFLTEMRRV SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVEITGV
 101 KSMVLGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPQIND WVALTKVKG GANKVDSGY IPAYLLPKVQ PELQAWINL DEYKLAALN EERKRLVA QFLAESSQRS
 201 QEASQREFSAD PVIKSKTSQK YMALVNLWLV EHGITSEKQI WQENQESYL SFNSTGNSRS QIKAALDNAT KIMSLITSAV DYLVGSSVPE DISKRIWQI
 301 FENGYDPAY AGSIIYGWQ RSNRRTVW LYGPATIGKINI AEATAHTVPP YGCNVNWIN ENFPNDCVD KMLIMWEEK MINKVVESAK AILGGSKVRV
 401 DQCKSSVQI DSTIPIVITNSIN MCVVVDGNSI TFEHQOPLER RMFKFELTKR LPPDFGKI KDIYHAQFDN ISNKDCEY LN RGNCGIC HNVIHQICH GIPPEKENL
 501 RPLGEDVINTS YKSLKRRARL SFVPEIPTSDDV TVDEPAPLRL NNSRYDCKC DYHAQFDNIS NKDECEYLN RGNCGIC HNVIHQICH GIPPEKENL
 601 SDFGDFDANKE QO*

REP25AA149
 1 MFGFYEIVIK VPSDLDGHL P GISDSFVNWV AEKWEELPPD SIMDNLNIEQ APLIVAELQ RDFLTEMRRV SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVEITGV
 101 KSMVLGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPQIND WVALTKVKG GANKVDSGY IPAYLLPKVQ PELQAWINL DEYKLAALN EERKRLVA QFLAESSQRS
 201 QEASQREFSAD PVIKSKTSQK YMALVNLWLV EHGITSEKQI WQENQESYL SFNSTGNSRS QIKAALDNAT KIMSLITSAV DYLVGSSVPE DISKRIWQI
 301 FENGYDPAY AGSIIYGWQ RSNRRTVW LYGPATIGKINI AEATAHTVPP YGCNVNWIN ENFPNDCVD KMLIMWEEK MINKVVESAK AILGGSKVRV
 401 DQCKSSVQI DSTIPIVITNSIN MCVVVDGNSI TFEHQOPLER RMFKFELTKR LPPDFGKI KDIYHAQFDN ISNKDCEY LN RGNCGIC HNVIHQICH GIPPEKENL
 501 RPLGEDVINTS YKSLKRRARL SFVPEIPTSDDV TVDEPAPLRL NNSRYDCKC DYHAQFDNIS NKDECEYLN RGNCGIC HNVIHQICH GIPPEKENL
 601 SDFGDFDANKE QO*

FIG. 25 (cont.)

REP25AA166
 1 MEGFYELVIK VPSDLIDGHL P GISDSFVNW AEKEWELPPD SDMDLNLIEQ APLIYAEKIQ RDFLITWRRV SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVEITGV
 101 KSMVIGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPTLEN WFAVITKIRNG AGGKNKVVDE CYIENLILPK TQPELQWAWI NLEEKRLVA QFLAESSQRS
 201 QEAASQREFS ADPVIKSKTS QKYMALVNWL VEHGIISEKQ WIQENQESYL SENSTGNRS QIKAAALDNAT KIMSLIKSAV DYLVGSSVPE DLSKNRIWQI
 301 FEMNGYDPA YAGSILYGWC RSEFKRNTV LYGPATIGKT NIAPALAHIV PFYGCNVNIN ENFPNDQVD KMLLWEEBK MINKVVESAK AILGGSKVR
 401 DQCKSSVQI DSTPVIIVTS TMMCVVDGN STIFEHQOPL EDRMFKFELT KRLLPDPFGKI TKQEVKDFFA WAKVNOQPVV HEFKVPRELA GTKGAEKSLK
 501 RPLGDVINTS YKSLEKRRL SFVPEIPRSS DVTVDPAPIR PLMNNSRYDC KCDYHAQFDN ISNKDCEY INRGKNGCIC HNVTHQOICH GIPPPWEKENL
 601 SDFGDFDDAN KEQ*
REP25AA187
 1 MEGFYELVIK VPSDLIDGHL P GISDSFVNW AEKEWELPPD SDMDLNLIEQ APLIYAEKIQ RDFLITWRRV SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVEITGV
 101 KSMVIGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPTLEN WFAVITKIRNG AGGKNKVVDE CYIENLILPK TQPELQWAWI NMEQVLSACL NLITERKRLVA QFLAESSQRS
 201 QEAASQREFS ADPVIKSKTS QKYMALVNWL VEHGIISEKQ WIQENQESYL SENSTGNRS QIKAAALDNAT KIMSLIKSAV DYLVGSSVPE DLSKNRIWQI
 301 FEMNGYDPA YAGSILYGWC RSEFKRNTV LYGPATIGKT NIAPALAHIV PFYGCNVNIN ENFPNDQVD KMLLWEEBK MINKVVESAK AILGGSKVR
 401 DQCKSSVQI DSTPVIIVTS TMMCVVDGN STIFEHQOPL EDRMFKFELT KRLLPDPFGKI TKQEVKDFFA WAKVNOQPVV HEFKVPRELA GTKGAEKSLK
 501 RPLGDVINTS YKSLEKRRL SFVPEIPRSS DVTVDPAPIR PLMNNSRYDC KCDYHAQFDN ISNKDCEY INRGKNGCIC HNVTHQOICH GIPPPWEKENL
 601 SDFGDFDDAN KEQ*
REP25AA216
 1 MEGFYELVIK VPSDLIDGHL P GISDSFVNW AEKEWELPPD SDMDLNLIEQ APLIYAEKIQ RDFLITWRRV SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVEITGV
 101 KSMVIGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPTLEN WFAVITKIRNG AGGKNKVVDE CYIENLILPK TQPELQWAWI NMEQVLSACL NLITERKRLVA QHLTHVSQIQ
 201 EQNKENQEN SDAPVIKSKT SQKYMALVNW LYEHGIISEK WIQENQESY LSFNSTGNRS SQAALDNA TKIMSLIKSA VDYLVGSSVP EDLSKNRIWQ
 301 IFEMNGYDPA YAGSILYGWC RSEFKRNTV WLYGPATIGK NIAPALAHIV PFYGCNVNIN ENFPNDQVD KMLLWEEBK MINKVVESAK AILGGSKVR
 401 VDQCKSSVQ IDSTPVIIVTS NINMCVVVDG NSITFEHQOPL LEDRMFKFELT TKRLPDPFGK IITKQEVKDFFA WAKVNOQPVV THEFKVPREL AGTKGAEKSL
 501 KRPLGDVINT SYKSLEKRRL SFVPEIPRSS SDVTVDPAPIR PLMNNSRYDC KCDYHAQFDN NLSNKDCEY YINRGRNGCI CHNVTHQOICH HGLPPWEKEN
 601 LSDFGDFDDA NKEQ*
REP25AA110-148
 1 MATFYEVIVR VPFDVEEHLP GISDSFVDW TQOIWELPPE SDMLNLIEQ POLIVADRIR RVFLYEWKVF SKQESKFFVQ FEKGEYFHL HTLVETSGLS
 101 SMVIGRYVSQ IREKLIQRI YRGIEPTLEN WFAVITKIRNG AGGKNKVVDE CYIENLILPK TQPELQWAWI NLEEKRLVA QFLAESSQRS
 201 EASQREFSA DVPVIKSKTS KMALVNWLY EHGIISEKQ WIQENQESYL SENSTGNRS QIKAAALDNAT KIMSLIKSAV DYLVGSSVPE DLSKNRIWQI
 301 EMMGYDPA YAGSILYGWC RSEFKRNTV LYGPATIGKT NIAPALAHIV PFYGCNVNIN ENFPNDQVD KMLLWEEBK MINKVVESAK AILGGSKVR
 401 QCKSSVQID STPVIIVTS NINMCVVVDG NSITFEHQOPL EDRMFKFELT KRLLPDPFGKIT KOFVKOFFFA AKVNOQPVV THEFKVPREL AGTKGAEKSLR
 501 ELGDVINTSY KSLKRRRLS FVPEIPRSS VITVDPAPIR PLMNNSRYDC KCDYHAQFDN ISNKDCEY INRGKNGCIC HNVTHQOICH GIPPPWEKENL
 601 DFGDFDDANK EQ*

FIG. 25 (cont.)

REP525AA146-187
 1 MATFYEVIVR VPFDVEEHL P GISDSFVDMW TGQIWELPPE SDLNLILVEQ PQLIVADRIR RVFLYEWKVF SKQESKFFVQ FEKGESEFHL HILVETSIGIS
 101 SMVLGRYVSQ IRAQLVKVVF QGIEFQINDW VAITVKKGG ANKVVDCEYI ENYLLEPKTQP ELQWAWINME QYLSACINLT ERKRLVAQFL AESSORSQEA
 201 ASQREPSADP VIKSKISQKY MALANWLVH GIUSEQWIQ ENQESYLSFN STGNSRSQIK AALDNATKIM SLITKSAVDYL VGSSVPEDIS KNRIWOLFEM
 301 NGYDFAYAGS ILYGWQORSF NKRNTVWLYG PATTCKINIA EALAHVPFY GCVANINENF PFNDCCVDKML IMWEBGKWTN KWVESAKAIL G3SKVRVDQK
 401 CKSSVQIDST PVIIVTSINM CVVVDGNSIT FEHQPLEDR MFKFELTKRL PPDFGKITKQ EVKDFFAWAK VNQVPVTHEF KVPRELAGTK GAEKSLKRPL
 501 GDVINSIYSK LEKRARLSFV PETERSSDVT VDPAPLRPIN WNSRYDCKD YHAQFNISN KDECEVINR GKNGCICHNV THOQICHGIP PWEKENLSDF
 601 GDFDANKEQ *

REP525AA110-187
 1 MATFYEVIVR VPFDVEEHL P GISDSFVDMW TGQIWELPPE SDLNLILVEQ PQLIVADRIR RVFLYEWKVF SKQESKFFVQ FEKGESEFHL HILVETSIGIS
 101 SMVLGRYVSQ IREKLIQRYI RGIPTLPLNW FAVIKTRNGA GGNKVWDEC YIPNYLLPKT QPELQWAWIN MEQYLSACINL LTERKRLVAQ FLAESSORSQ
 201 EAASQREFSA DPVIKSKTSQ KYMALVNWLV EHGITSEKQW IQENQESYLS FNSTGNSRSQ IKAALDNATK IMSLITKSAVD YLVGSSVPED LSKNRIWQIF
 301 EWNGYDPAYA GSILYGWQOR SFNKRNTVWL YGPAITTKIN IAEALAHVVP FYGCVANINE NFPFNDCCVDK MLIMWEBGKM TNKVESAKA ILGGSKVRVD
 401 QKCKSSVQID STPVIIVTSINT NMCVVVDGNS TTFEHQPLE DRMFKFLTK RLPPDFGKIT KQEVKDFFAW AKVNQVPVTH EFKVPRELAG TKGAEKSLKR
 501 PLGDVINTSY KSLERARLS FVPETERSSD VIVDPAPLRP INWNSRYDCK CDYHAQFDNI SNKDCCEYL NRGKNGCICH NVTHQQLCHG IPPWEKENLS
 601 DFGDFDANK EQ*

REP252AA97-146
 1 MPGFYEIVIK VPSDLDGHL P GISDSFVDMW AEKEWELPPD SDMDLNLEQ APLIVAEKIQ RDFLITWRVR SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVETSIGI
 101 SSMVLGRYVS QIRAOVLKVV FOGIEFQIND WVAITVKKGG GANKVWDECY IPNYLLPKTQ PELQWAWIN BQYLSACINL TERKRLVAQH LTHVSQIQEQ
 201 NKENQNPNSD APVIRSKTSA RYMELVWLV DKGITSEKQW IQEQQASYLS FNAASNSRSQ IKAALDNAGK IMSLITKAPD YLVGQQFVED ISSNRIYKIL
 301 ELANGYDQYA ASVFLGWATK KFGKRNITWL FGPATTKIN IAEALAHVVP FYGCVANINE NFPFNDCCVDK MVIWWEBGKM TAKVESAKA ILGGSKVRVD
 401 QKCKSSAQID PTPVIIVTSINT NMCVIDGNS TTFEHQQLQ DRMFKFLTR RLDHDFGKVT KQEVKDFFRW AKDHVVVEH EYVYKGGAK KRPAPSDADI
 501 SEPKRVRESV AOPSTSDAEA SINADRYON KCSRHVGNL MLFPCQCEP MNQNSNICFT HGQKOCLECF PVSESQPVSV VKKAYQKLCY IHHIMGKVPD
 601 ACTACDLNV DLDCCIFEQ*

REP252AA149-187
 1 MPGFYEIVIK VPSDLDGHL P GISDSFVDMW AEKEWELPPD SDMDLNLEQ APLIVAEKIQ RDFLITWRVR SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVETIGV
 101 KSMVLGRFLS QIREKLIQRI YRGIEPTLEN WFAVTKIRNG AGGNKVWDS GYIPAVILLPK VQPELQWAWI NLDYKLAAL NLEERKRRR LVAQHLTHVS
 201 QTOEQNKENQ NPNSDAPVIR SKTSARYMEL VGNLVDKGIT SEKWIQEQD ASYISFNAAS NSRSQIKAAAL DNAGKIMSIT KTAFDYLVGQ QFVEDISSNR
 301 IYKILLENGY DPQYASVFL GWATKFGKR NITWLFGPAT TCKINIAEAL AHVVPFGCV NMINENEPFN DCVDMVIMW BEGKMITAKVV ESSAKAILGGS
 401 KURVDQCKS SAQIDTPVI VTSINMCAV IDGNSITFEH QQPLQDRMFK FELTRRLDHD FKVTKQEVK DFFRWADHV VEVEHEFVK KGGAKRPPAP
 501 SDADISEPKR VRESVAQFST SDAEASINYA DRYONKCSRH VGNMLFPC RQERMNQNS NICFTHGQD CLECFPVSES QFVSVVKKAY QKLCYIHHIM
 601 GKVPDACTAC DLNVLDLDC IFEQ*

FIG. 25 (cont.)

REP252AA97-187

1 MPGFYEVIVK VPSDLDGHLF GISDSFVNWV AEKWELEPPD SDMDLNLLEBQ APLTVAEKLQ RDFLTEMRRV SKAPEALFFV QFEKGESYFH MHVLVETSGL
 101 SSMVLGRYVS QIRAOVLKVV FQLEFQIND WVAITKVKKG GANKVDSGY IPAYILPKVQ PELQWAWINL DEYKLAALNL EERKRRKRLV AQHLIHVSQT
 201 QEQNKENQNP NSDAPVIRSK TSARYMELVG WLVMDKGTISE KQWIQEQAS YTSFNAASNS RSQIKAAALDN AGKIMSLJKT APDYLVGQOP VEDISSNRLY
 301 KILLELNGYDP QYAASVFLGW AITKFKGRNT IWLFEPATIG KINLAERLAH IVPFYGVNVM TNENFFPNDV VDKMVIWNEE GERMPAKVVES AKAILGGSKV
 401 RVDQKCKSSA QIDPFPVIVT SNINMCAVID GNSITFEHQQ PLQDRMFKFE LTRRLDHDHG KVTQKQEVKDF FRWAKDHVVE VEHEFYVKKG GAKRRPAPSD
 501 ADISEPKRVR ESVAQFSTSD AEAASINYADR YQNKCSRHVQ MNMLFPCRQ CERNNQNSNI CFTHGQKQCL ECFPVSSESQP VSVVKKAYQK LCIYIHLIMEK
 601 VPDACTACDL VNVDDLDCIF EQ*

FIG. 25 (cont.)

REP52AA146

1 ATGGCTACCT TCTPATGAAGT CATFTGTTCG GTCCCAITTG AGTGEGGGA ACATCTGCC T GGAATTTCTG ACAGCTTTGT GGACTGGGTA ACTGFTCAA
 101 TTTGGGAGCT GCCTCCAGAG TCAGATTFAA ATTTGACTCT GGTGAACAG CCTCAGTGA CGTGGCTGA TAGAATTCGC OGGTGTTCO TGTACGAGTG
 201 GAACAAATTT TCCAAGCAGG AGTCCAAAT CTTGTGTCAG TTTGAAAGG GATCTGAATA TTTTCATCTG CACACGGCTTG TGGAGACCIC OGGCAFTCT
 301 TCCAUGTTC TCGGCGGCTA CGTAGTCAG ATTGGCGCC AGTGGTCTC CAGGGAATG AACCCAGAT CAACGACTGG GTCGCCATCA GTCGCCATCA
 401 CCAAGTAAA GAAGGGCGA GCCAATAAG TGGTGAAGA GTCTACTAT CCCAATVACT TGTCTCCAA AACCCAGCT GAGTCCAGT GGGGFTGGAC
 501 TAATATGGAA CAGTATTTAA GCGCTGTTI GAATCTAAG GAGGFTPAAC GHTTGTGGC GCAGCAITG ACCCAGCTT GCCAGACGCA GGAGCAGAAC
 601 AAGAGAAATC AGAATCCAA ITCTGATGCG CCGTGTGATC GATCAAPAA TCCAGCCAGG TACATGGAG TGGTGGGJG GCTCGTGGAC AAGGGANTTA
 701 CCTGGAGAA GCAGTGAATC CAGGAGACC AGGCCITATA CATCTCTTC AATGGGCC TCCAACTGG GTCCCAATC AAGCTTGGCT TGGACAATGC
 801 GGGAAAGANT ATGAGCCTGA CTAAAACCG CCCCAGTAC CTTGTGGCC TACGGTGGC GAGGACANT TCCAGCRATC TCCAGCRATC GEAATTAATA AATTTTGGAA
 901 CTAAACGGGT AGCATCCCA ATATGGGGI TCOGCTTTC TGGGATGGC CAGAAAAG TTGGGTAAGA GGAACACCAT CTGGCTGTTT GGGCCTCGAA
 1001 CTACCCGGAA GACCAACATC GCGGAGGCA TAGCCACAC TGTGCCCTIC TACGGTGGC TAACTGGAC GAGGACANT TCCAGCRATC TCCAGCRATC AOCACITGT
 1101 CGACVAGATG GTGATCTGGT GGGAGCAGG GAAATGACC GCAACCAAC TGTGACCG CAACACCAAC AITGIGCCG TGAITGACGG GAATCAACG ACCTTGGAC
 1201 AAATGCAAGT CCTGGGCCA GATAGACCCG ACTCCGTA TGTGACCTC GCAACCAAC TGTGACCG CAACACCAAC AITGIGCCG TGAITGACGG GAATCAACG ACCTTGGAC
 1301 ACCVAGACC GTTGCVAGC OGGATGTTCA AATTTGAAT CACCCCGCT TCTTAGCTA AAAAGGCTGG AGCCAGAAA AGACCCGCC CCAFTGACG AGATAAAGT
 1401 CCGTGGGCA AAGGATCAC TGGTTCAGT GGAGCATGAA TTTTAGCTA AAAAGGCTGG AGCCAGAAA AGACCCGCC CCAFTGACG AGATAAAGT
 1501 GAGCCCAAAC GGGTGGCGA GTCAGTTGG GTCAGTTGG CAGCCATCGA CFTCAGACG CFTCAGACG AATCAGAAIT CAATCAITAG CCAAAACAAA TGTTCCTGTC
 1601 ACGTGGGCAAT GAATCTGATG CTGTTTCCCT GCAGACAAIT CGAGAGATG AATCAGAAIT CAATCAITAG CCAAAACAAA TGTTCCTGTC
 1701 GTGCTTCCC GTGTCAGAT CTCAAACCGT TTTGTGTC AAAAAGGCT AITCAGAACT GTGCTACAT CATCATATA TGGGAAAGGT GCCAGAGCT
 1801 TGCACITGCT GCGATCTGGT CAATGTTGAT TTGGATGACT GCATCTTGA ACAATAA

1 MATFYEVIVR VPFVVEHLF GISDSFVDWV TQIWELEPPE SDLNLILVBQ PQLTVADRIR RVFLYEVNKF SKQESKFFVQ FEKGEYFHL HILVETSGIS
 101 SMMVGRVVSQ IRAQLKVVV FQIEFQINDW VAITKVKKG ANKVVDECYI FNYLLPKTQP ELQWAWINME QYLSACLNLTK ERKRLVAQHL THVSQTQEQN
 201 KENQENSDA FVIRKTSAR YMELVGLMD KGITSEKQWI QEQASYISF NAASNSRQI KAALDNBAGKI MSLLIKTAPDY LVGQQPVEDI SSNRIYKLE
 301 LINGDPOVAA SVFLGWAATK FGKRNLIWLF GPATJGKINI AEAIAHWPF YGCVMWINEN FPFNDCVDMK VLVWEEERMT AKVWESAKAI LGGSKVRVDO
 401 KCKSSAQIDP TPFVIVTSNIN MCAVIDGNST TFEHQQLQD RMTFKELLFR LDHDPKVTIK QEVKDFEWA KDHVVEVEHE FYVKKGEAKK RPAPSDADIS
 501 EFKRVRESVA QPSTSDAES INYADRYQNK CSRHVGNML LFPCRQERM NONENICFTH GQKDCLECFP VSESQPSVW KKAYQKLCYI HHIMGKVPDA
 601 CTACDLVND IDDCIFEQ*

FIG. 26

REP52AA147

1 ATGECIACCT TCTATGAAGT CATGHTGCG GTCCANTTG AAGTGGAGGA ACATCTGGCT GGAATTCTCG ACAGCTTGTG GCACIAGGTA ACTGGTCAA
 101 TTITGGAGCT GCTTCAGAG TCCAGATTAA ATTGACICTI GGTGAAACAG CCTCAGTGA CGGTGGCTGA TAGAATTCG TAGAATTCG CCGTGTTC TGTACAGTGG
 201 GAACAAATTT TCCPAGCAG AGTCCAAATTT CTTTGTGCG AGTCCAAATTT TTTTCAATCG CACAGCTTG CACAGCTTG TGGAGACTC CGCAATCTCT
 301 TCCATGGTCC TCGGCGGCTA CGTCAATCAG ATTCCGGCC AGTGGTGA AHTGGTCTCA CAGGANTTG AACCCAGAT CAACGACTGG GTCCCATCA
 401 CCPAGTAA GAAGGGGGA GCCAATAAG TGGTGGATC TGGTCAATC CCCAATFACT TCGTCCCAA AACCCAGACT GAGTCCAGT GGGGTGGAC
 501 TANTATCGAA CAGTATTAA GCGCTGTIT GAATCTAAG GAGGTAAAC GGTGTGGC GCAGCATCTG ACAGCTGTG CCGAAGCA GAGCAGAAC
 601 AAGAGAAATC AHAATCCAA TTCTGATGG CCGGTGATCA GATCAAAAAC TTCAGCCAGG TACATGGAGC TGGTGGGTG GCTGTGGAC AAGGGGATTA
 701 CCTCGAGAA GCAGTGAATC CAGGAGAAC AGGCTCATTA CATCTCCTTC AATGGGCTT CCAACTGGG GTCCCAATC AAGCTGGCT TGGACAATGC
 801 GGGPAGANT ATGAGCCTGA CTAACAACCG CCCCAGTAC CTGGTGGCC AGCAGCCGT GAGGACATTT TCCAGCAATC GGAATTATA AATTTTGGAA
 901 CTAACCGGT ACGATCCCA ATATGCGGCT TCCGCTTTC TGGATGGCC CACGAAAAG TTCCGCAAGA GGAACCAAT CTGGCTGTTT GGGCTGCAA
 1001 CTACCGGAA GACCAACATC GCGGAGGCCA TAGCCACAC TGTGCCCTTC CCAAGGTGG TAAACITGGC CAATGAGAAC TITCCCTTCA ACGACTGTGT
 1101 CCACAGATG GTGATCTGGT GGGAGGAGG GAGATGACC GCAAGGTGG TGGAGTGGC CAAACCAAC AHTGGCCG TGAITGACGG GAATCAAG ACTTGGAC
 1201 AATGCAAGT CCTGGGCCA GATAGACCG ACTCCGTTGA TGTCACTC CAAACCAAC AHTGGCCG TGAITGACGG GAATCAAG ACTTGGAC
 1301 ACCAGCAGC GTTGCAGAC CCGATGTTCA AATTTGAACT CACCCGCGT CTGCAATCAG ACTTTGGAA GGTCAACAAG CAGGAAGTCA AAGACTTTTT
 1401 CCGTGGGCA AAGGATCAG TGGTGTAGGT GGAGCATGAA TTCTACGTTA AAAAGGTGG AGCCPAGAAA AGACCCGCC CCAGTCAAGC AGATAATAGT
 1501 GAGCCAAAC GGGTGGCCA GTCAAGTGG GTCAAGTGG GGAAGCTTCC ATCAACTAGC CAGACAGGTA CCAAAACAAA TGTTCITGTC
 1601 ACGTGGGCT GAATCTGATG CTGHTTCCCT GCAGCAATG CAGAGCAATG AATCAGAAAT CAAATATCTG CTTCACTCAC GACAGAAAAG ACTGTTTAGA
 1701 GTGCTTCC GTGTCAGAA CTCAACCCGT TTTGTTGTC AAAAAGCGT ATCAGAAAAT GTGCTACATTT CATCAATATCA TGGGAAAAGT GCCAGAAGCT
 1801 TGCACTGGCT GCGATCTGGT CAATGTGGAT TTGGATGACT GCATCTTTGA ACAATAA

 1 MATFYEVIVR VPPDVEEHL P GIDSFVDWV TQJWELPPE SDLNLTLYEQ PQLTVADRIR RVFLYEMNKF SKQESKFFVQ FEKGSYFHL HTLVETSGLS
 101 SWLGRYSQ IRAQLKVVV F QGIEPQINDW VALTVKKG ANKVDSCYI ENVLLPKIQP ELQWANTNME QYLSACLINLT ERKRLVAQHL THVSQIQEQN
 201 KENQNFNSDA FVIRSKTSEAR YMELVGLWLD KGITSEKQWI QEDQASYLSF NRAASNSRSQI KAAALINAGKI MSLTKTAPDY LMGQQPVEDI SSNRIYKILE
 301 LINGYDPQYAA SVFLGWAITKK FGRKNTIWL F GPATITGKINI AEAIAHTVPP YGCVMNINEN FPFNDQVDMK VITWBERKMT AKVVESAKAI LGGSKVRVDQ
 401 KCKSSAQIDP TPFVIVTSNIN MCAVIDGNST TFEHQPLQD RNFKFEIIRR LDHDFGKVTK QEVKDIFFRWA KDHVVEVEHE FVVKGGGAKK RPAPSDADLS
 501 EFKRVRESVA QBSTSDAEAS INVADRYQNK CSRHVGNINM LFPFCQERM NQNSNICFTH GQKDCLECFP VSESQPVSVV KKAYQKLCYI HHTMGKVPDA
 601 CTACDLWNVD LDDCLIFEQ*

FIG. 27

REP 52AAL51

1 ATGGCTACCT TCATATGAGT CATTGHTGG GTCCANTTG ACGTCGAGGA ACATCTGCC T GGAATLTCIG ACAGCTTGT GEACTGGGTA ACTGTCMAA
 101 TTTGGGAGCT GCCTCCAGAG TCAGATTTAA ATTGACTCT GGTGAAACAG CCTCAGTGA TAGAATTOGC CGCGTGTCC TGTACGAGTG
 201 GAACAAATTT TCCAGCAGG AGTCCAAAT CTTTGTGCG TTTGAAAAG GATCTGATA TTTTCACTG CACAGCTTG TGGAGACTC CGGCATCTCT
 301 TCCATGTTCC TGGCGGCTA CGTGGTCAG AITCGGCCC AGTGGTGA AGTGGTCTC CAGGGAATG AACCCAGAT CAACGACTGG GTGCGCATCA
 401 CCAAGGTAAA GAAGGCGGA GCCAATPAGG TGGTGAATC TGGGTATAT CCAATTAAT TGCCTCCAA AACCCAGCCT GAGCTCCAGT GGGCGTGGAC
 501 TAATATGGA CAGTATTAA GCGCTGTTT GAATCTCAG GAGGTAAAC GGTGTGGC CAGCANCTG ACGCAGTGT CGCAGAOGCA GAGCAGAAC
 601 AAAGAAATC AGAATCCCA TTTGTGATGG CCGGTATCA GATCAAAAAC TTAGCCAGG TACATGGAG GCTGCTGGTG GCTGCTGGAC AAGGGATTA
 701 CCTCGGAGAA GCATGGATC CAGGAGACC AGGCTCATTA CATCTCCTC AATGGGCC TCAACTGGG GTGCCAAATC AAGGCTGCC TGGACAATG
 801 GCGAAAGAT ATGAGCCIGA CTAAAAACGC CCCCAGTAC CTGTGGGC AGCAGCCGT GAGGACAT TCCAGCAATC GGAITATATA AATTTTGGAA
 901 CTAACAGGGT ACGATCCCA ATATGGGCT TCCGCTTTC TGGGATGGC CACGAAAAG TTGGGTAAG GATACCAT CTGGCTGTT GGGCCTGCAA
 1001 CTACCGGGA GACCAACAT CCGGAGGCCA TAGCCACAC TGTGCCCTC TACGGTGG TAACTGGAC CAATGAGAAC TTTCCCTTCA ACGACTGTGT
 1101 CGACAAGATG GTGATCTGGT GGGAGGAGG GAGATGACC GCCAGTGG TGGAGTGG CAACCAAC ATGTGGCGG GAACCTCAAG ACCITTOGAC
 1201 AATGCTAGT CCTCGGCCA GATAGACCG GATGACCTC TGTCACTC CACCACTAC CTGATCATG ACTTTGGGA GGTCACTAG CAGGAAGTCA AAGACTTTT
 1301 ACCAGCAGC GTTGCAGAC CCGAATGCA AATTTGACT CACCGCCGT CTGATCATG ACTTTGGGA GGTCACTAG CAGGAAGTCA AAGACTTTT
 1401 CCGTGGGCA AAGATCAG TGGTGGGT GAGCATGAA TTTAGTCA AAAGGTGG AGCCAGAAA AGACCGCC CAGTGAAGC AGAATAAGT
 1501 GAGCCAAAC GGGTGGGGA GTCAAGTGG CAGCCATGGA GTCAAGTGG GAGCTTGG ATCAACTAG CAGACAGGTA CCAAAAACAAA TGTCTCTGTC
 1601 ACGTGGGAT GAATCTGAT CTGTTTCCCT GCAGCAATG CGAGAAATG AATCAGAAIT CAAATATCTG CTTCACTCAC GGCACAGAAAG ACTGTTTAGA
 1701 GTGCTTCCC GTGCAGAA CTCAACCCGT TTTCTGTGIC AAAAGGCGT ATCAGAAACT GTGCTACAT CATCATATCA TGGGAAAAGT GCCAGAAGCT
 1801 TGCACTGCC TGGATCTGGT CAATGTGGAT TTGGATGACT GCACTTTTGA ACAATAA

 1 MATFVEVIVR VPFVVEHLP GLDSFVDWV TQJWELPPE SDLNLTIVEQ PQLHVADRIR RVFLYEMNKF SKQESKFFVQ FEKGSVFHL HILVETSGIS
 101 SMVLGRVVSQ IRAQLVKVWF QGIEPQINDW VAITKVRKGG ANKVVDSGYI FNYLLPKTOP ELOWAWINME OYLSACLNLT ERKRLVAQHL THVSQTQEQN
 201 KENQNPNSDA FVTRSKTSAR YMELVGNLVD KGLTSEKQWI QEDQASYISF NAASNSRSQI KAALDNAGKI MSLTKTAPDY LVGQPFVEDI SSNRYKLE
 301 LMGYDFQYAA SVFLGWATKK FKRNTIWL F GPATTKKINI AEAIAHIVPF YGCNVNINEN PFFNDCVDRM VTWEEGKMT AKVVESAKAI LGGSKVRVDQ
 401 KCKSSAQIDP TPVIVTSNIN MCAVIDGNST TFEHQQLQD RMEKFEIIRR LDHDFGKVIK QEVKDFRWA KDHVVEVEHE FVVKGGGAKK RPAPSDADIS
 501 EPKRVRESVA QPSTSDAEAS INYADRYQNK CSRHVGMNLM LFPQRQERM NQNSNICFTH GOKDCECFP VSESPFVSU KKAYQKLCYI HHIMGRVPDA
 601 CTACDLVNVV LDDCLFEQ*

FIG. 28

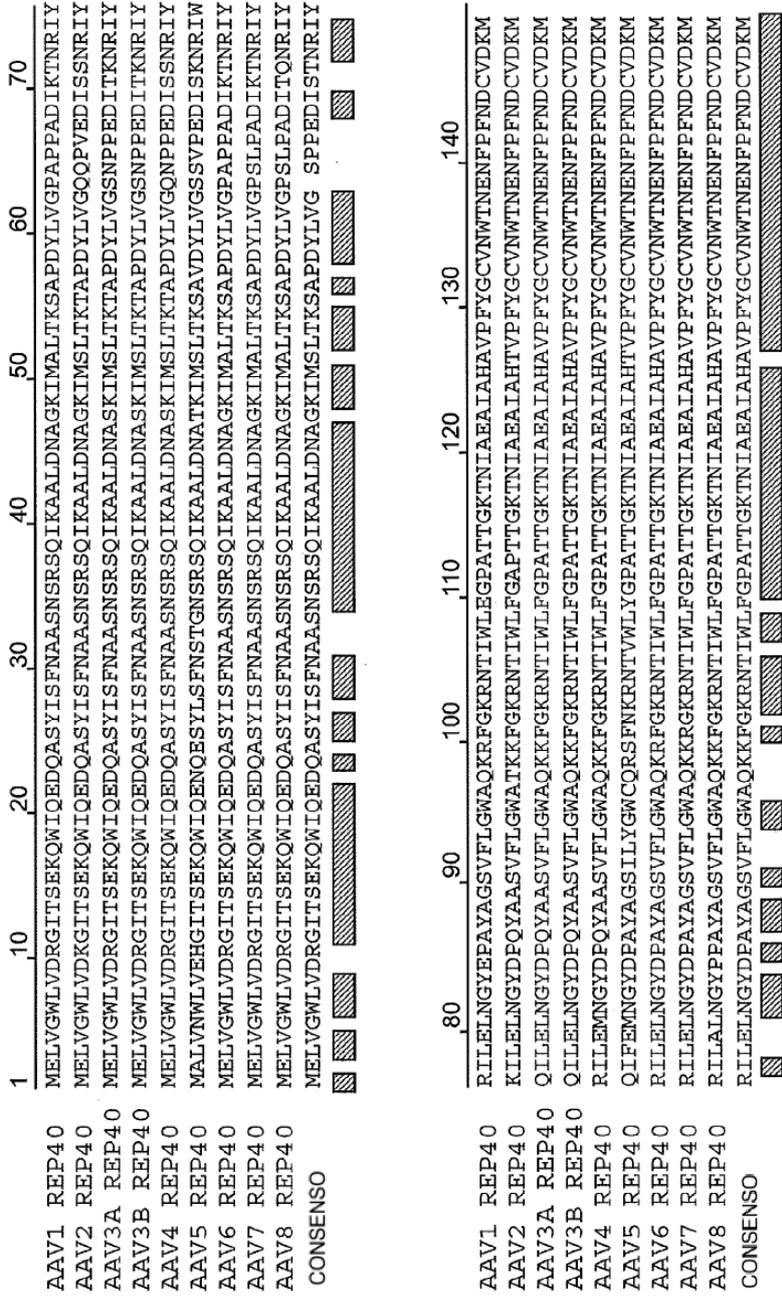


FIG. 29

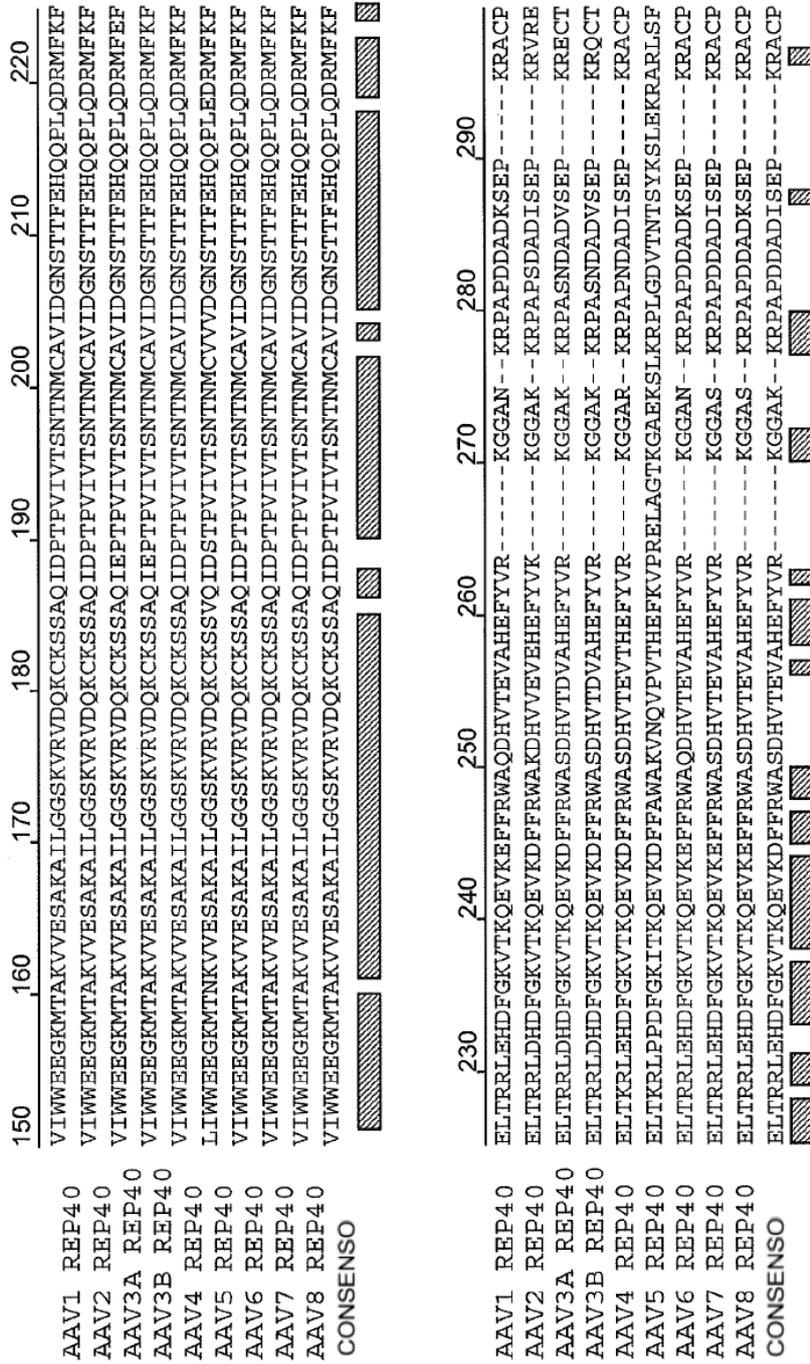


FIG. 29 (cont.)



FIG. 29 (cont.)

FIG. 30

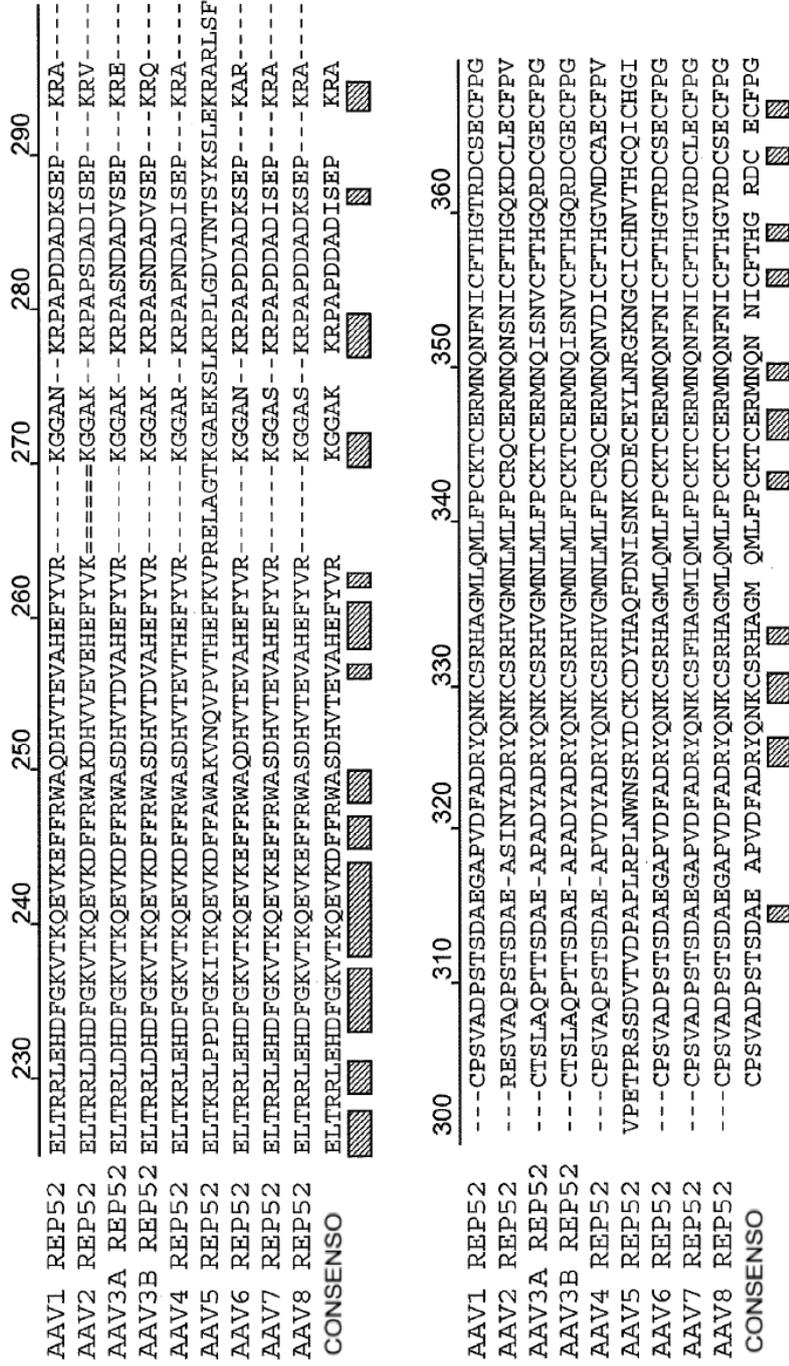


FIG. 30 (cont.)

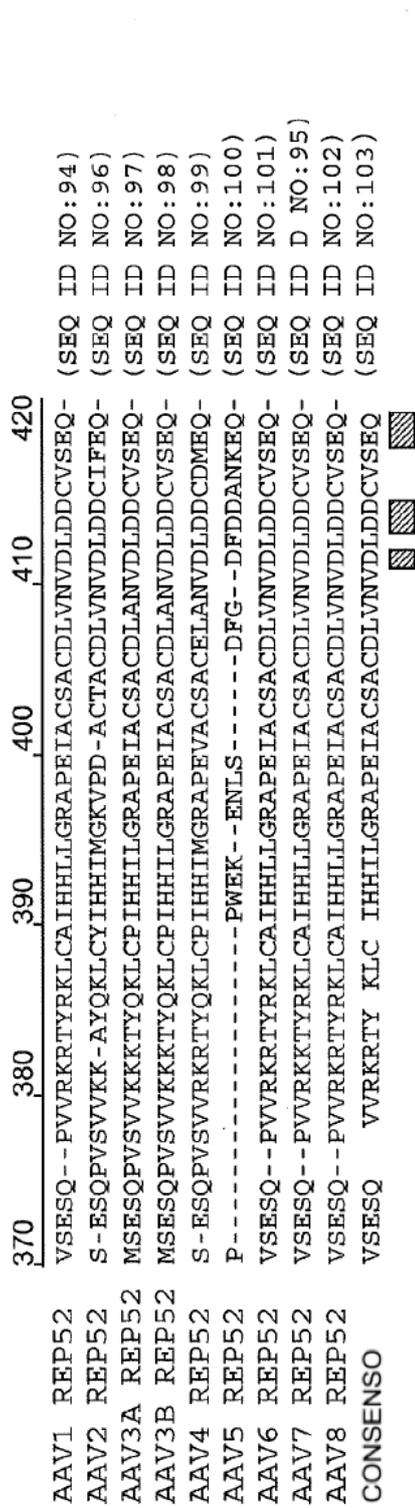


FIG. 30 (cont.)

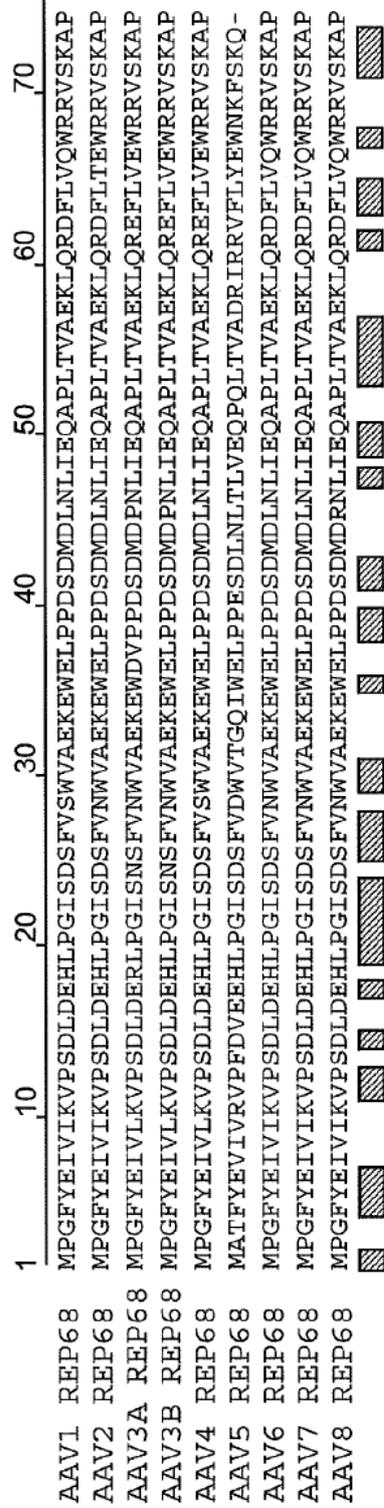


FIG. 31

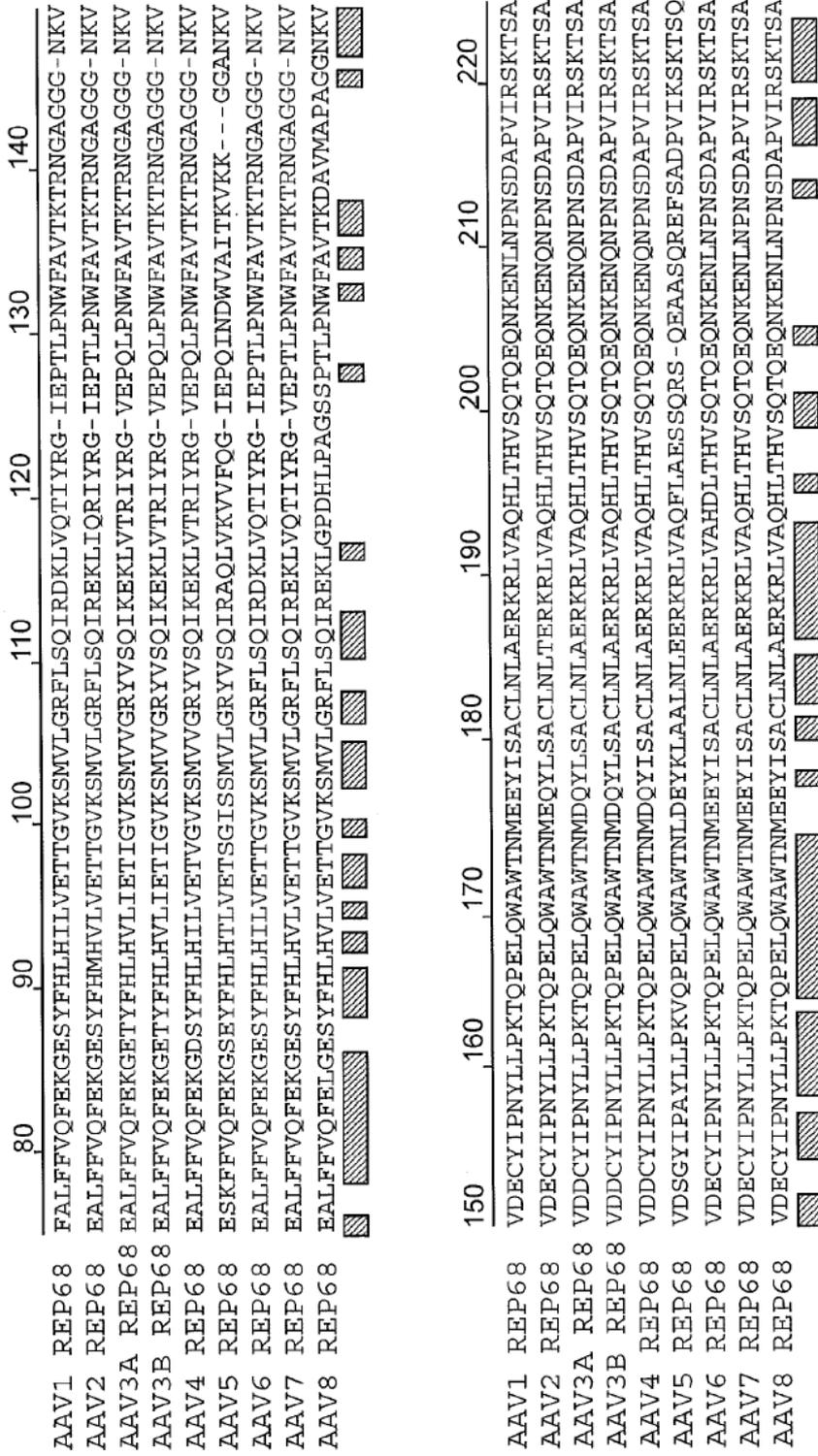


FIG. 31 (cont.)

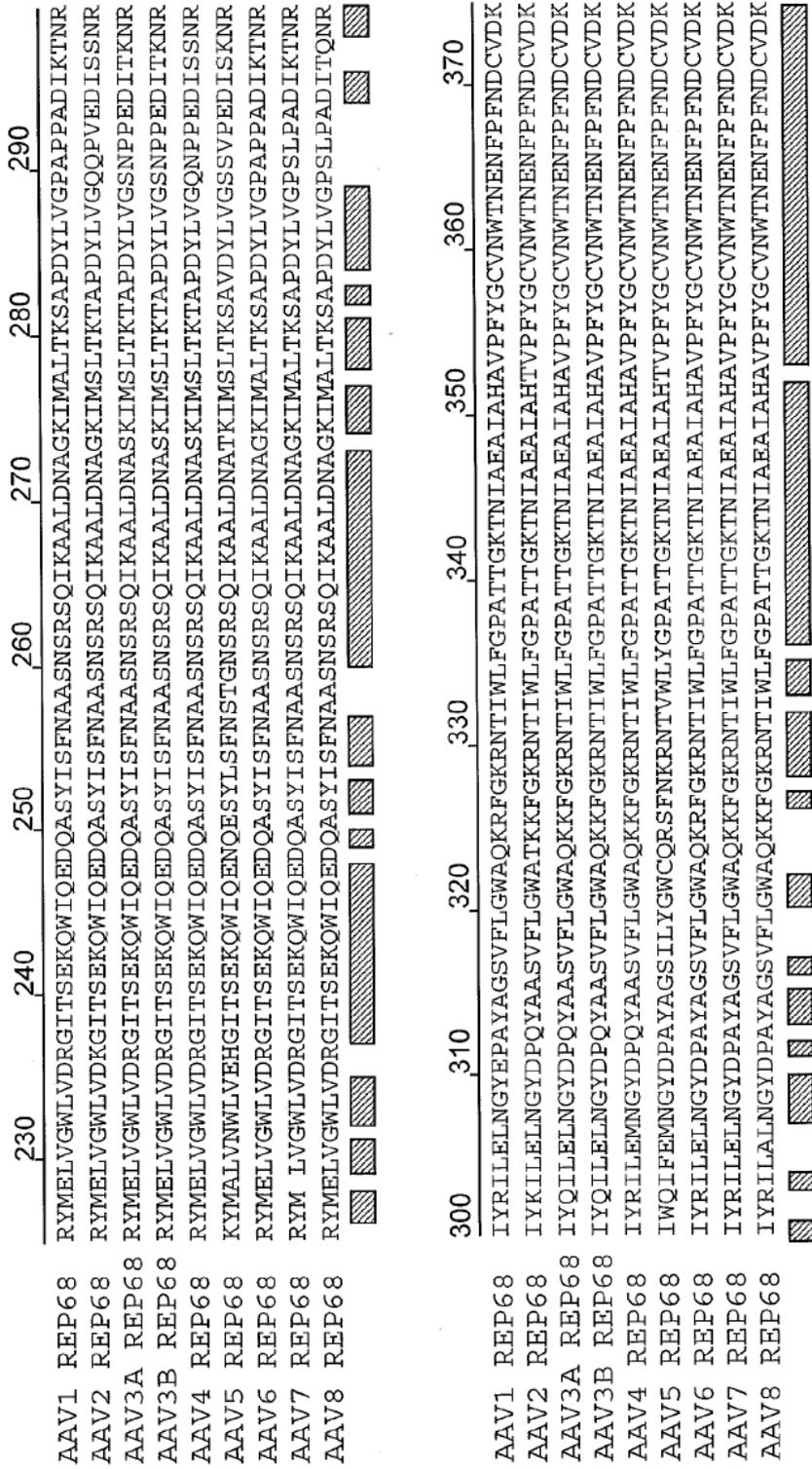


FIG. 31 (cont.)

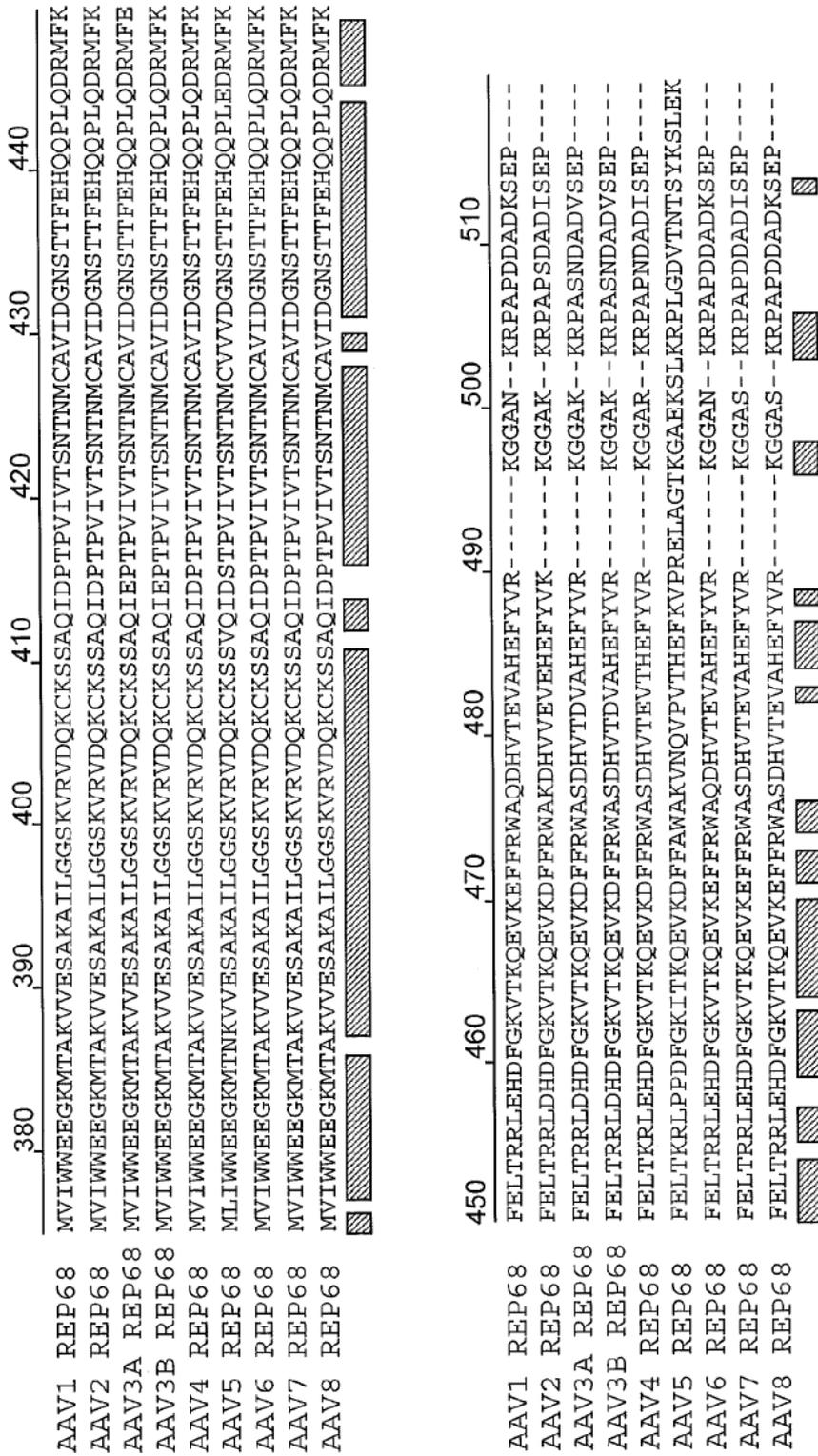


FIG. 31 (cont.)

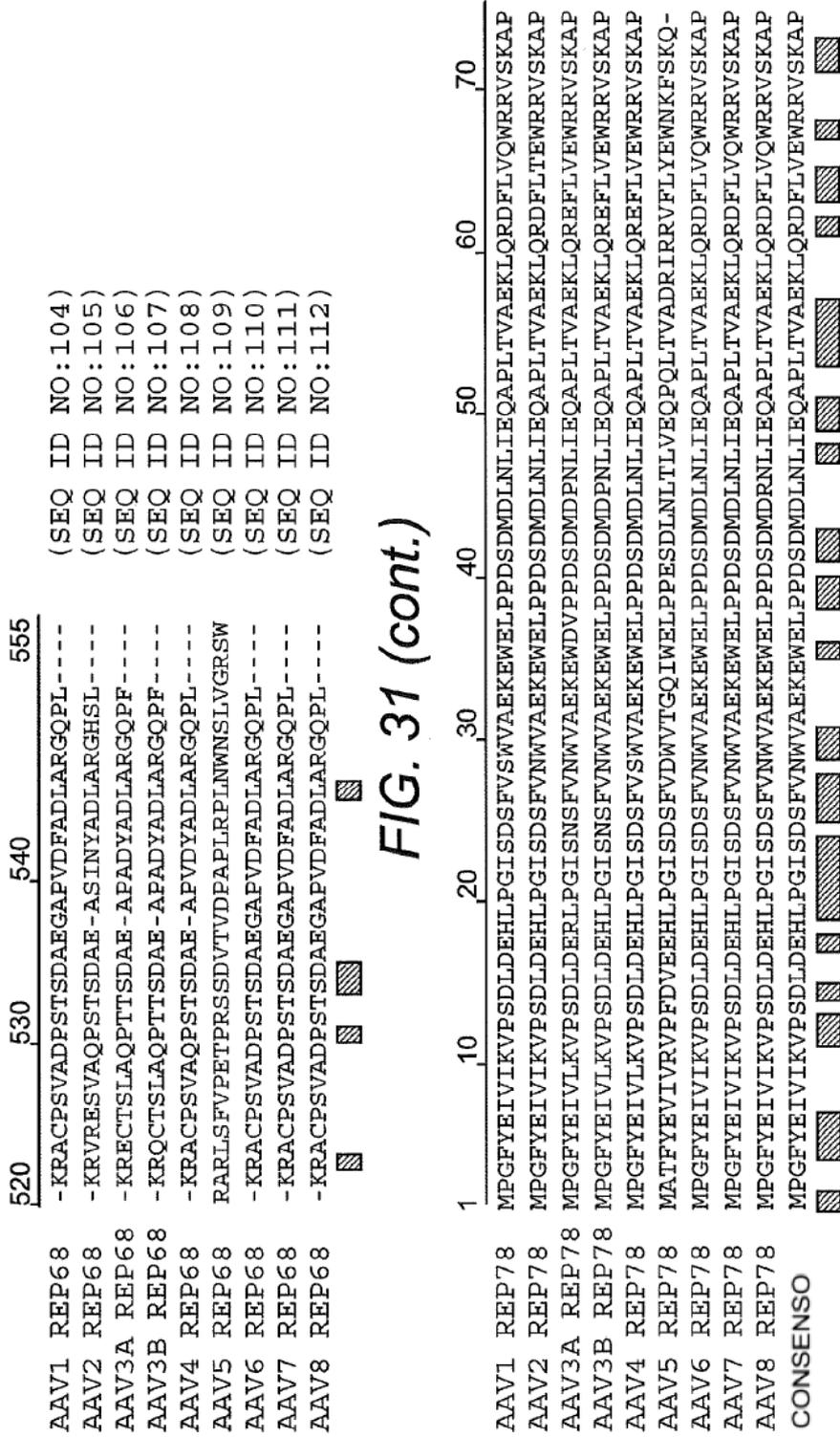


FIG. 31 (cont.)

FIG. 32

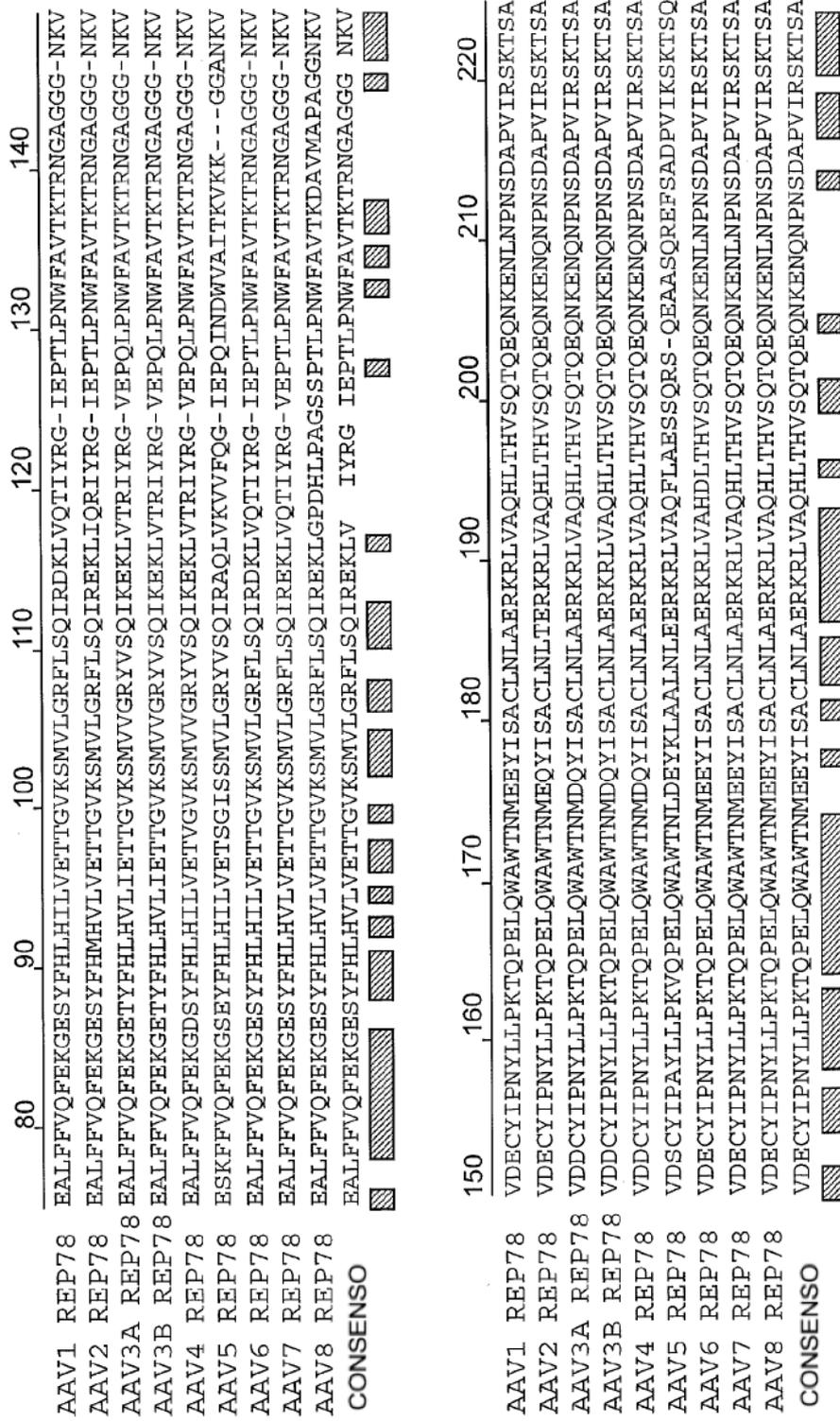


FIG. 32 (cont.)

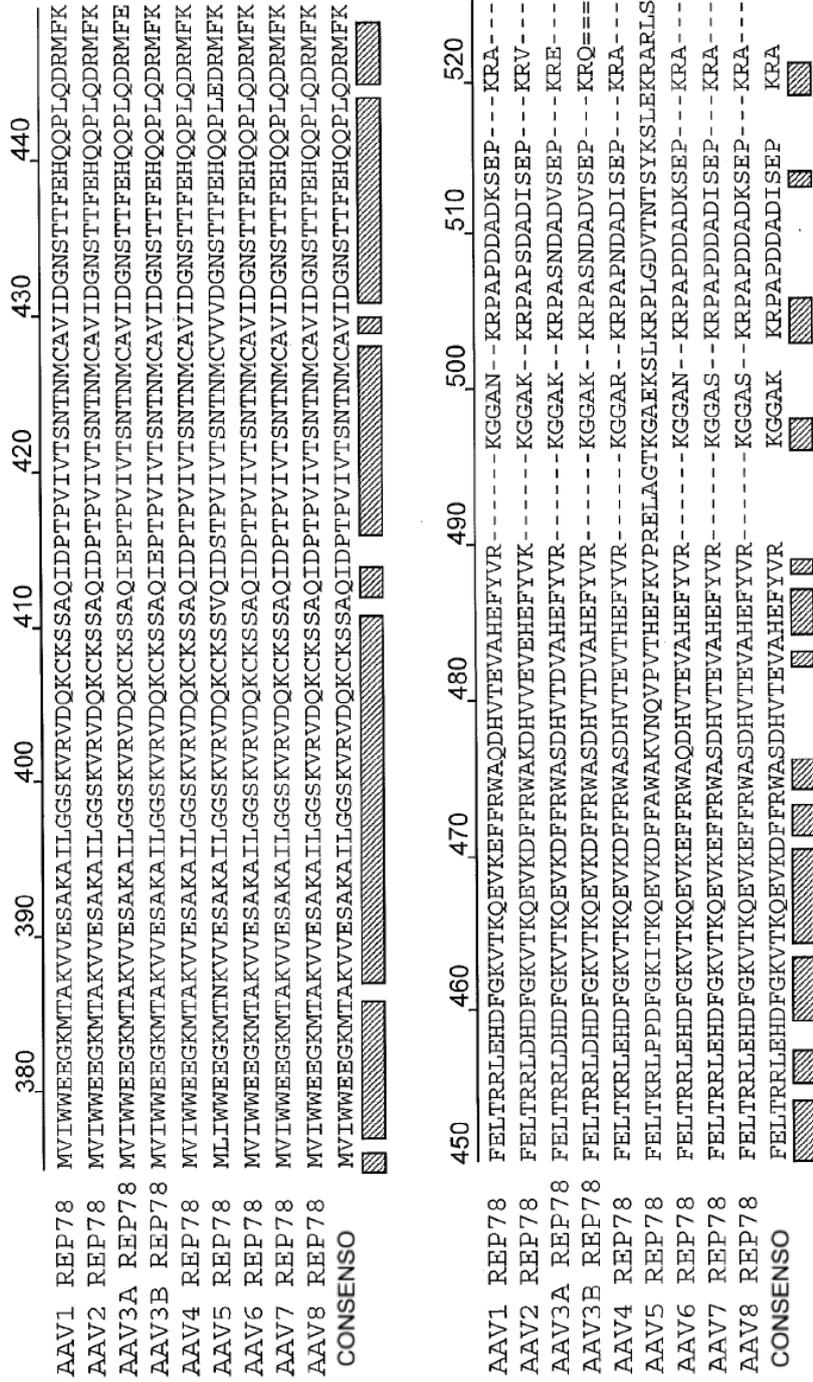


FIG. 32 (cont.)

	530	540	550	560	570	580	590
AAV1 REP78	----	CPSVADPSTSDAEGAPVDFADRYQNKCSRHAGMLQMLFPCKTCERMNQNFNICFTHGTRDCSECFPPGVSES					
AAV2 REP78	----	RESVAQPSTSDAE-ASINYADRYQNKSRHVGMNLMFLPCRQCERMNQNSNICFTHGQKDCLECFPVS-ES					
AAV3A REP78	----	CTSLAQPTSDAE-APADYADRYQNKSRHVGMNLMFLPCKTCERMNQISNVCFTHGQDCGECFPPGMSES					
AAV3B REP78	----	CTSLAQPTSDAE-APADYADRYQNKSRHVGMNLMFLPCKTCERMNQISNVCFTHGQDCGECFPPGMSES					
AAV4 REP78	----	CPSVAQPSTSDAE-APVDYADRYQNKSRHVGMNLMFLPCRQCERMNQVDFICFTHGVMDCAECFPVS-ES					
AAV5 REP78	FVPE	TPRSSDVTVDPAPLRPLNWNRYDCKDYHAQFDNISNKDECEYLNRGKNGCICHNVTHCQICHGIPWE					
AAV6 REP78	----	CPSVADPSTSDAEGAPVDFADRYQNKCSRHAGMLQMLFPCKTCERMNQNFNICFTHGTRDCSECFPPGVSES					
AAV7 REP78	----	CPSVADPSTSDAEGAPVDFADRYQNKCSRHAGMLQMLFPCKTCERMNQNFNICFTHGTRDCSECFPPGVSES					
AAV8 REP78	----	CPSVADPSTSDAEGAPVDFADRYQNKCSRHAGMLQMLFPCKTCERMNQNFNICFTHGTRDCSECFPPGVSES					
CONSENSO		CPSVADPSTSDAE APVDFADRYQNKCSRHAGM QMLFPCKTCERMNQNFNICFTHGTRDCSECFPPGVSES					
	600	610	620	630	646		
AAV1 REP78	Q--	PVVRKRTYRKLCAIHHLLGRAPEIACSAIDLNVVDLDDCVSEQ-				(SEQ ID NO: 113)	
AAV2 REP78	QPVSVVKK-	AYQKLCYIHHIMKVPD-ACTACDLNVVDLDDCVSEQ-				(SEQ ID NO: 114)	
AAV3A REP78	QPVSVVKKTYQKLCPI	HHILGRAPEIACSAIDLNVVDLDDCVSEQ-				(SEQ ID NO: 115)	
AAV3B REP78	QPVSVVKKTYQKLCPI	HHILGRAPEIACSAIDLNVVDLDDCVSEQ-				(SEQ ID NO: 116)	
AAV4 REP78	QPVSVVRKRTYQKLCPI	HHIMGRAPEIACSAIDLNVVDLDDCVSEQ-				(SEQ ID NO: 117)	
AAV5 REP78	K-----	-----E--NLSD---FGDFDDANKEQ-				(SEQ ID NO: 118)	
AAV6 REP78	Q--	PVVRKRTYRKLCAIHHLLGRAPEIACSAIDLNVVDLDDCVSEQ-				(SEQ ID NO: 119)	
AAV7 REP78	Q--	PVVRKRTYRKLCAIHHLLGRAPEIACSAIDLNVVDLDDCVSEQ-				(SEQ ID NO: 120)	
AAV8 REP78	Q--	PVVRKRTYRKLCAIHHLLGRAPEIACSAIDLNVVDLDDCVSEQ-				(SEQ ID NO: 121)	
CONSENSO	Q	VVRKRTY KLC IHHILGRAPEIACSAIDLNVVDLDDCVSEQ				(SEQ ID NO: 122)	

FIG. 32 (cont.)

ITR DE SERPIENTE
 1 CGCCCAACC CTAGTATCG CGGGGCTCT CTCITGGGGC CTEAGGGCG AAGCCCGTCA GCTGCCGAGC TTGCTGGC AGGCCCAAG
 91 AGAGAGCGG CGCATCACT AGGGTGGG CG

FIG. 33

PLÁSMIDO VECTOR DE EGFP DE ITR DE SERPIENTE (pSnITR-eGFP)

GTGGCAGCTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAACCCCTATTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTC
ATGAGACAAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATGAAAAAGGAAGATATGAGTATCAACATTTCCGCTGTC
CCTTATTTCCCTTTTGGGCAATTTGGCTTCCGTGTTTTGCTCAACCCAGAAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTG
AAGATCAGTTGGGTGCAAGAGTGGGTACACTGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGATTTTCGCCCC
GAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGGCGGTATTTATCCGGIATIGACGCGCGGCA
AGAGCAACTCGGTGCGCGATACACTATTTCTCAGAACTGACTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTA
CGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAATGCAATGCTGCCATAACCAATGAGTATGATAACACITGGCCCAACTTACTTTCTG
ACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAACATGGGGATCAATGTAACITGGCTTGTATGCTG
GGAACCGGAGCTTGAATGAAGCCATACCAAAACGACGAGCGTACACCAAGTGCCTGTAGCAATGGCAACAACCTTGC
GCAACTATTAACCTGGCACTACTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGGCGGATAAAGTT
GCAGACCACTTCTGGCTGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATGCTGATAAATCTGGAGCGGTGAGCGTGGGTC
TCCGGTATCATTTGACGACITGGGGCAGATGGTAAAGCTTCCCGTATCTAGTATATCTACAGCGGGGAGTCCAG
CAACTTGGATGAAAGAAATAGACAGATGCTGAGATAGGTGCTCAGTATTAAGCATTTGTTACTGTCCAGACCA
GTTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCAATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAAGATCTTTTGA
TAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAAGGAT
CTTCTTGGATCCTTTTTTCTGGCGTAACTCTGCTGCTTGCATAAATAAATAAACCACCGCTACCAGCGTGGTTTTGT
TTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGAGATACCAAAATACTTCTCT
TCTAGTGTAGCGTATGTTAGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTTACATACTCGCTTCTGCTTAACTGAT
TACCAGTGGCTCTGCGCAGTGGCGATTAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGATCAAGAGCAGATGTTACCGGATTAAGCGG
CAGCGGTCCGGCTGAAACGGGGTTCTGTGCAACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATCTTCC
ACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTTACCGGTAAGCGCGAGGTTCC
GACAGGAGCGCAAGAGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTTGGTATCTTTATAGTCTCTGTGGTTTTCCGCACTC
TGACTTGAAGCTTCAATTTTTGTTGATGCTGTGTTACGGGGGCGGAGCTTATGGAAAACCGCCAGCAAGCGGCTTTTT
ACGTTTCCGCGCTTTGCTGGCCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCGCGTATCCCTGATTTCTGTGGTAAACGCTA
TTACCGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTTCCCGCAGCGCAAGCAAGCGGCGAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG
GAAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTTCCCGCGCGTGGCGGATCTTAATGACAGCTGGCGAGCGGTTCC
CGACTGAAAAGCGGGCAGTGAAGCCAAAGCAATTAATGTTGAGTTAGCTCTACTCTATTAGGCAACCCAGGCTTTTCACT
TTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTTGGAATTTGAGCGGATAACAATTTCAACAGGAAACAGCTATGACCATGAT
TAAGCCAGCGCAATTAACCTCACTAAAGGAAACAATAAGCTGGGTACCGGCGCCCTTCCGAGTCAAGGAT
CTTAAAGCTTGTATGCGCCACCCCTAGTATGCTCGCGCTCTCTCTTGGGGCTGAGCGGCGAGGCGGTCAAGCTG
CCGATCTTCCGCTGGCGAGGCCCAAGAGAGAGCGCGCGATCACTAGGGGTGGCGGAGTGGCTTCCAGCGGT
TTTTTGGTGGCGGAGCAATGACGCTCAGCGGACATGCTTGGACATGCTTTTGAACAAGTCCATAAAGGAGTTCCG
AGGATGCAAAATGACCAATCGCGCAAAAGCATTTTTGGGTAGTCCACATGATAAATAAAGGACAGCAAGAAAGTGAAG
CCCCATAATTTTTAATAGGAATTTTTAACCATGTTCTTTCCCTGCTTATCCCTGATTTCTGTGATTAACCTTATTAACG
CCTTTGATGAGCTGATACCGCTCGCGCAGCGCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGGAAAGGAGG
GGCCCAATACGCAAAACCGCTTCTCCCGCGGTGGCTGATTTCAATTAATGACAGTGGCAACAGGTTTTCCGACITG
GAAAGCGGCAAGTGAAGCGCAACCGCAATTAATGTTGAGTTAGCTTCACTCAITTAGGCAACCGAGGCTTTTACACTT
TTCGCGCTCGTATGTTGTTGGAATTTGAGCGGATAACAATTTCAACAGGAAACAGCTATGACCAATGATACGAA
TGTGTTGTTTAACTTGTTTATTTGACGCTTTAATGTTTACAATAAAGCAATAGCATCAAAAATTTCAAAAATAA
GCAATTTTTTACGCTTCTGATGTTGTTGTTCCAACTCATCAATGATCTTTATCATGCTGGATCCCGCGGCG
CGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCGGAGTATCCCGGGCGGCTCAGCAACTCCAGCAGCAAGTATGATCG
CGCTTCTCGTTGGGCTTTTGTCTCAGGGGAGCTGGGTTCTCAGGTTAGTGGTTGTGGGCGAGCAACGGGCGGCT
CGGATGGGCGGTTCTGCTGGTGGTGGTGGCGAGCTGCAAGCTCGCGTCCCTGATGTTGTTGGCGAGATCTTGAAGT
TCACTTGTATGCGGCTTCTTCTGCTTGTGGCGCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTGATTTGTAATCCAGCTT
CCAGGATGTTGGCGCTCCTCTTGAAGTGGATGCGCTTTCAGCTTGGATGCGGTTCCACAGGGTGTGCTCCCTTCAACT
CCTTCCGCGCGGTTCTGTAGTTGGCGCTTCTTGAAGAAGATGTTGGCTTCCGAGCTGAGCTTCCGCTAGGCTATGG
CGGATTTGAGAAAGTCTGTTGCTTCACTTGGTGGCGACCGGTTGATCCCGGGCGCGGTTACAATTTCCGAGCTT
TTAGAGCAGAAATTAACACTTCCGTTACAGGCTTGAAGTAAAGGCAACATCCACTGAGGAGCAGTTCTTTGATTTGCA
CCACACCGGATCCGGGACTGAAATAAAGGACAAAAGACTAAACTTACCAGTTAACTTTCTGTTTTCAGTTCC
TGGATACCGGATCTCTAGAGTCCGAGGCTTGGATCGTTCCCGTGTCTTCTATGAGGTTCAAACAGCGGTTG
GGCTTCCAGCGGATCTGACGGTTTCAAGGCTTAAAGGAGCTTCTGCTTATAATGAGACTCCCAAGTACAGCGGCA
TTTGGCTCAATGGGGCGGAGTTGTTACGACATTTTGGAAAGTCCCGTTGATTTTGGTGGCAAAACCAACTCCCATG
ACCTCAATGGGGTGGAGACTTGGAAATCCCGTGGATCAAACCGCTATCCAGCCCAATGATGTTAGTACGCAAAACG
CATCAACTGGTAAATAGGATGACTAATAAGTATGTTACTGCCAAGTAAAGTCCCAATAAGGTTACTGTTACTGGG
CATATGCTCAGGCGGGCCATTTACCGTTAATACTTCCACCCATTTGACGTTCAATGGAAAGTCCCTTATGGCGTTACTTATGAGT
GCAATGGGCGGGGTCTGTTGGCGGTCAAGCGGGCGGCAATTTACCGTAAAGTTATGTAACGGGTACCGGGGATCCT
CTAGAGTCCAGCTGAGTAAACAGAAACAAITGAAGACGAAAATACAGGGTACCAATAAATTTGGTAAATGTTAGAAATA
ACATTTGTTGCTATCAATCAACAAAGGAAAGCAAAATCCAACAACAGGTAGTACATCTCAATTTGAGCAATGCCA
GGTATGGTGGTCTAATAGAGACATTTACTTTACAGGGGCTTATTTGGGCTAAAATTTCAAATAAGATGACATTT
TCATCTCTTCCAGAAATGGTGGTTTTTGGATTAACAACATCTCCCGCTATGATTTCTGATCAAAAATAACCGAGTTCT
CTGCTGATCTCCCAACTACCTTCAATCCAAATGCCACAGACTAGTTTCAITACTGAATACAGTACAGCAAGTAACT
GTTGAAATGTTGTTGGGAGGTACAGAAAAGAACTCCCAAAAGATGGAATCCAGAAAGTACAGTTTACTTCCAAITTTGG
AACITCAGTCCAGCTGTTGATGGAATACCGTTTGGAAATTAATAATTTGGGTTACTTATGTTGAAATCAGCAATTTG
GAACCTGTTATATTTCTAAACACTTGTAAATTAATAAAATTTGCAAAATTTGCACTAAGAAATTTGTTGCTACGTTGGT
TTTTACTGCTTGTCTAAAACACCGCCCAAAAACCGGTTGAGCAGGGCACTCGCCCAACCCCTAGTGTATGCGCGC
CGTCTCTCTTGGGCTTCCGAGCAAGCTCTGGCAGCTGACCGGCTTCCGCGCTTCCGCGCCCAAGAGGAGCGCGG
CGATCACTAGGGGTGGGCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGCGCGCCAGCGCGGTTGGAGCTCCAAITTTGCCCTA
TAGTGAAGTCTTACCGGCTCACTGGCGGTGTTTTACAAGCTGCTGACTGGGAAACCTTGGCTTACCCAAC
TTAATGCCCTTCCAGCACATCCCGCTTTCGCGAGCTGGGTTAATAGCGAAGAGGCCCGCAACCGATCCGCTTCCCA
CAGTTGGCGAGCTGAATGGCGAATGGAGCGGCTTGGAGCGGCTTAAAGCGCGGGGTTGGTGGTTAGCGG
CAGGCTGACCGCTACACTTGGCAGCGGCTTGGCGCGGCTCTTTTGGCTTCTTCCCTTCTTCCGCGCACTTCC
CCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCCGGGCTCCCTTTAGGGTTCGAAATTTAGTGTCTTTAGCGCACTCCG
AAAAAATTTGATTTAGGGTGGTGGTTACAGTGGTGGGCTTCCGCTGATAGACCGGTTTTTCCGCTTTGACGTTGGA
GTCCAGGTTCTTTAATAGTGGACTTGTGTTCCAAACTGGAAACAACACTCAACCTTATCTCGGCTTATCTTTGAT
TATAAGGATTTTGGCGATTTCCGCTTATGGTTAAAATAAGGCTGATTTAACAATAAATTTAAACCGCAATTTAAG
AAAAATTTAAGCTTACAATTTAG

FIG. 34

PLÁSMIDO REPCAP2 DE SERPIENTE (PSNREPCAP2)

TCCGCGCTTTCGGTIGATGACCGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTTCACAGCTTGTCTGTAAGCG
GATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGCTGGCTTAACTATGCGGC
ATCAGAGCAGATITGACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAATAACCGCACAGATGCGTAAAGGAGAAAATACCGCA
TCAGGAAATTTAAACGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAACCAAT
AGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTTAATAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCAGCTTTGGCAAC
AAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACG
TGAACCATCACCTAATCAAGTTTTCGGGGTGGAGTGCCTTAAAGCACTAANTCGAACCCCTAAAGGGAGCCCC
GATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCGCGCAACGTGGCGAGGAAGGAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAGCGGGCGCTAGG
GCGCTGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAAACCAACACCCCGCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGGCTC
GCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCCTTCGCTATTACGCCAGCTGG
CGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCGCCAGTCAAGCGTGTGTAACCGAGC
GCCAGTAATTAACAGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTTCGACCGGACATGTCGGACATGTCCTTGGAGCA
AGTCCATATAAGGAGTTCCGCCGATATGCAAAATGAGCAATCGCGCAAAGCATTTTGGGTAGTACCAATGAATAAAA
AGGACAGCAAGAAAGATGACGCCCATTAATTTAATAGGAAITTTAAACCATGGCGTTCACAGAGTGTGTTCGTT
TGCCAAAGAGCAATAACAACCTTGTGGATGAAGATAGATATCAGCCAGAGTTGAAAGAAGAAGATGACTGGCCITGAG
GAATATTTAACAGTGAAGATGCCAGCTTTATCGACTAGCGTATGCTGTGCTAAGTGAATAATCGGAGATTCCTTGG
AAAGGAAGTACAAATGGTTTCCCAGGTTGAATGGTGTCTACTGCTGTTTACCACATGCATGTTTGTGTAACCATC
CTAAGCTGAGTAAACAGACTTATGGAAGAAAGTCAATGAACCTGGCTTTCGCCATAGTTCGATACCTTTGGCCATAAT
AATCCAGAAGAAGTCACTAGTACCCATTTATGTTAAAGCAACTATGGACATAAAAAGGTGAGAGTCAITCACCTAGA
GCTTTATTTGAAGAACTACTTTTTCAGAAAGACTTTAGCTCCTCCCAATTTATACCGGAGGAGACTATAAAGAG
AGGAAGAGTTCGTGCTGTGGGCAATTTACGAATATCGTGTGGAAGCCATTCGTGCGGAATTCATCAAGAGATCG
GAGCTAGCGACTGTTCCTAAGCAACAGAGAAATCCGGCGGGAGACGGACCGGCACCTCGAGTACTGCAGGAAACCG
CAATTTATGGAACCACTCGACTGGTGTGGTGAACATGGAATTAATAAGAACTACTACAGAAAGGAAATTCGCAACCG
CTTTGTACCTGTCTATGCTGGCTTCTACTTCCGGTGTGGGCGAGTTAAAAGAGCGCTGGACCAGGCGAAACACATG
ATGACCAGCACCATGTGAGCAGAGGATTAACCTGACAAAGAGAGGATGTGATCGAACCCACTACTGAAAATAGAAT
CTACAAGATTAGAACTGAATCGCTATGATCCAGAAGTAGCAGCTGCTCTCTCTACGGCTGGACCTGCAAGAACT
TTGGCAGAGAAACCACTCTGCTGTATGGTCCAGCTACTACCGGCAAAACCATCATCGCTATGCTATTCAGCAT
GCTGTTAAACTGTTTGTGGTGTAAATGGACTAATGAAAACCTTCCCTTCTGTAACCTGTCAGGAAACTGCTTAT
CTGGTGGGAGGAGGGCAGATGACAAACAAATGGTGGAGACCGCTAATGTATACTGGGGGATCTGCTGTACTCG
TAGACATCAAAGGCAACCCCGCTGAAATGTGTCTCAAACCCCTGTATTTATTAAGCAATACTAACATGTGTCAA
GATATGATGGTAATAGTTCTAGCTTTGAGCAACAGAACCCCTAGAGGAAACCGCATGTTATATGTTTACAGCTTAATAC
TAAACTGCCATCGACTTTGGCAAGATCACAGAAGAGGAAGTCAAACAGTTTATTAACCTGGGGGAGGAGCTTAAAGG
TTCAAGTTCACATCAGTTTCAAGTGTCTTACCACAGGATATAAAGGCCAGCCCGAGCCCGAGGGGAGGAGCTCATTTCT
TCGGATGAGCCGCAAAAGAGAAGGTCCGCGTATTTGATGACTCTCTAACAGGTATGTTAACAAATTTGATGACTC
AGCTACCAGTAGAGAAATGTTTCTAGAGATTTGCTAATACTAATCAATGATGTTGCAITCATGCTTTTCTGTACCG
AATGTTATCTGAAATGCTTGTATGACATGGACAAGGAACAATAAACCCTACTGATAACAGATATGGCTGCGGATGGT
ATCTTCCAGATTTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAGGCTCAAACCTGGCCACCACCA
CCAAAGCCCGCAGACCGCATAAGGACGACAGCGGGTCTTTGTGCTTCCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCTTCGAA
CGGACTCGACAAGGGAGAGCCGCTCAACGAGGCAGACGCGCGCCCTCGAGCAGCAAAAGCCTACGACCGGCAGC
TCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCCGCGAGCGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGAAAGATACG
TCTTTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAGAGGGTCTTTGAACCTCTGGGCCITGGTTGAGGA
ACCTGTTAAGACCGCTCCGGGAAAAAAGAGGCGGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGACTCTCTCGGGAAACCG
GAAAGGCGGGCCAGCAGCTTGCAGAAAAGATGAAATTTGGTCAAGTGGAGACGCAAGTCAAGTACCTGACCCC
CAGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCTCTGGTCTGGGAACTAATACGATGGCTACAGGCAAGTGGCGACCAAT
GGCAGACAATAACGAGGGCGCGGACGAGTGGTAAITTCCTCGGAAAIITGGCAITTCGATTTCCACATGGATGGCG
ACAGAGTCACTACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCCCACTACAACAACCCACTCTACAAACAATTTCCAGC
CAATCAGGAGCTCGAACGACAATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGTATTTTGTACTTCAACAGATTTCCA
CTGCCACTTTTACCACGTTGACTGGCAAGACTCATCAACAACAACCTGGGATTCGACCCAAAGAGACTCAACTTCA
AGCTCTTTAACAATCAAGTCAAAGAGTCAAGCAGAAATGACGTTACGACGACGATTTGCAATAAACCCTTACCAGCAG
GTTCAAGTGTACTGACTGGAGTACAGCTCCCGTACGTCCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCTCCCGCGT
CCCAGCAGAGCTCTCATGTTGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAAACAACCGGAGTCAAGCAGTAGGACGCTCT
CATTTTACTGCTGGAGTACTTTCTCTCAGATGCTGCGTACCGGAAACAACCTTTACCTTACGCTACACTTTTGGAG
GACGTTCTTTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCTCTCATTCGACAGTACCT
GTATTACTTGAGCAGAACAAACACTCCAAGTGGAAACCACCAGCAGTCAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCGGAGCGA
GTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAACCTGGCTTCTGGGACCTGTTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGG
GGCCCGGCCATGGCAAGCCCAAGGACGATGAAGAAGTTTTCTCAGAGCGGGTCTCATCTTTGGGAAGC
AAGGCTCAGAGAAAACAATGTGGACATGAAAAGGTCATGATTAACAGACGAGAGGAAATCAGGACACCAATCCC
GTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGCTACCGCAGATTTCAA
CACACAAGCGTTCCTCCAGGATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTGTACTTTCAGGGGCCACTGGGGCAAGATTC
CACACACGACGGACATTTTACCCCTCTCCCTCATGGTGGATTCGGACTTAAACACCCCTCTCCACAGATTCCTC

FIG. 35

ATCAAGAACACCCCGGTACCTGCGAATCCTTGGACCCTTCAGTGGCGCAAAGTTTGGCTTCCTTCATCACACAGTA
 CTCCACGGGACAGGTGAGCTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAAAACAGCAAAACGCTGGAAATCCCGAAAATTC
 AGTACACATTCACACTACAAACAGTCTGTAAATGTGGACTTTACTGTGGACACTAATGGCGTGTATTCAGAGCCTCGC
 CCCATTTGGCACCAGATACTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTAAATCAATAAAACCGTTTAAATTCGTTTCAGTTGA
 ACTTTGGTGTTCGCGGCGCTCGATAAGCTTTTGTTCCTTTAGTGGGGTTAAATTCGAGCTTGGCGTAAATCATGGT
 CATAGCTGTTCCTGTGTGAAAATIGTTPATTCGCTCACAATTTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAA
 GCCTTGGGGTGGCTTAAATGAGTGGCTAACTCATTAAATTTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTTCGGGAAACCT
 GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGGTATTGGGCGCTCTTCGCTTCCT
 CGCTCACTGACTCGCTGGCTCGGTTCGCTCGGCTCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTA
 TCCACAGAAATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGCCAGCAAAAGGCAGGAACCGTAAAAAGGC
 CGGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCGGCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC
 GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTCGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCGACCCCTG
 CGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCT
 CAGTTCCGTTGTTAGGTGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTTCAGCCGACCGCTGGCCTTAT
 CCGTTAATCATGCTTGTAGTCCAACCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATT
 AGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTTAACCTACGGCTACACTAGAAGACAGT
 ATTTGGTATCTGGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTGTATCCGGCAAAACAAACA
 CCGCTGGTAGCGGTGGTTTGTGTGCAAGCAGCAGATTACCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG
 ATCTTTTCTACGGGCTCTGACCGCTCAGTGGAAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCAITGAGATTATCAAAA
 GATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTG
 ACAGTTACCAATGCTTAAATCAGTGGGACCTTATCTCAGCGATCTGTCTAATTCGTTTCAITCCATAGTTTGGCTGACTC
 CCCGTGTTGATAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCGAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAG
 CTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTCTGCAACTTTAT
 CCGCTCCATCCAGTCTAATTAATTTGTTGCCGGGAGCTAGAGTAAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTT
 GTTGGCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTTCGTTTGGTATGGCTTCAITCAGCTCCGGTTCCCAACGATC
 AAGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTA
 AGTTGGCCCGCAGTGTATCACTCATGGTATGGCAGCACGCAATAATTCCTTACITGTCATGCCATCCGTAAAGTGC
 TTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCAITCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCCGC
 GTCAATAAGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCCTCATCAITGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAA
 AACTCTCAAGGATCTTACCCTGTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACIGATCTTCAGCATCT
 TTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAG
 GAAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGAT
 ACATATTTGAATGTATTTAGAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGT
 TAAGAAACCAATTAATATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTC

FIG. 35 (cont.)

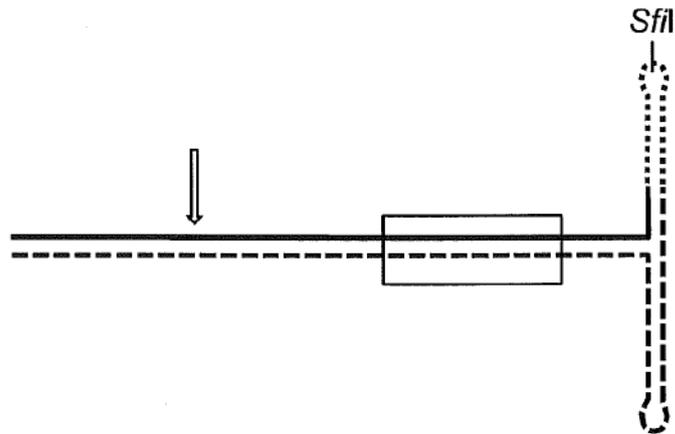


FIG. 36A



FIG. 36B

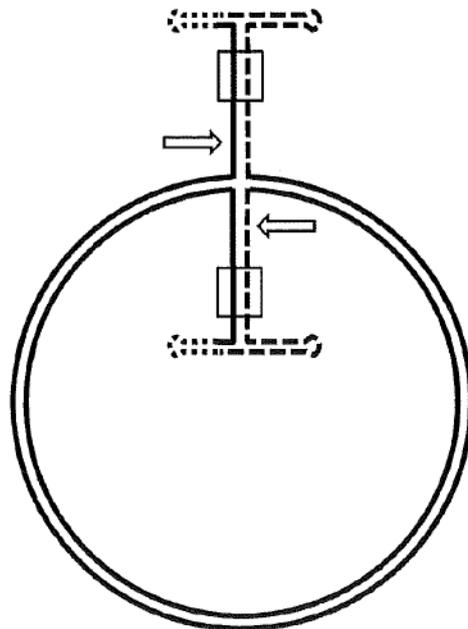


FIG. 36C