

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 349**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**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: **10.05.2016 PCT/GB2016/051329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16181123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2016 E 16721917 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3250239**

54 Título: **Cápside**

30 Prioridad:

**11.05.2015 GB 201508026**

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

**03.05.2019**

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC (100.0%)  
The Network Building 97 Tottenham Court Road  
London, W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**NATHWANI, AMIT y  
DANE, ALLISON**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 711 349 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

Cápside

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a variantes de la cápside del virus adenoasociado (AAV).

10 **Antecedentes de la invención**

10 En los últimos años se han desarrollado múltiples vectores de transferencia génica recombinantes basados en diferentes virus. Los vectores de transferencia génica basados en virus adenoasociados (AAV), es decir, vectores de AAV, son preferidos debido a su capacidad para transducir diferentes tipos de células en división y no en división de diferentes tejidos y la capacidad de establecer una expresión estable del transgen a largo plazo. Si bien los vectores basados en otros virus, tales como los adenovirus y los retrovirus, pueden poseer ciertas características deseables, también se han asociado con efectos secundarios no deseados. Dichos efectos secundarios no se han detectado con vectores de transferencia génica basados en AAV (Manno et al., Nature Medicine, 12(3):342 (2006)).

20 Se han identificado, clonado, secuenciado y convertido en vectores muchos serotipos de AAV. Estos serotipos incluyen AAV8, AAV5, AAV3B y AAV-LK03 descrito más recientemente (documento WO 2013/029030). Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que muchos de los vectores usados actualmente tienen una baja tasa de transducción en seres humanos. Por ejemplo, los vectores de AAV8 tienen una transducción 20 veces menor en seres humanos que en ratones, así como la transaminitis transitoria, sensible a prednisolona, que se produjo en dos tercios de una cohorte de dosis alta. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos vectores de AAV para mejorar la potencia y la seguridad, así como para promover una aplicación clínica más amplia.

25 Con este fin, los inventores han desarrollado nuevas cápsides híbridas intercambiando empíricamente diversos dominios de 4 cápsides de AAV diferentes: (1) AAV8, (2) AAV5, (3) AAV3B, y (4) AAV-LK03. Se desarrollaron cápsides que lograron un nivel de transferencia génica hasta 5 veces más alto que los vectores utilizados actualmente.

30 **Sumario de la invención**

35 En un primer aspecto de la invención, se proporciona una proteína de cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que la nueva proteína de la cápside produce una cápside que proporciona una mayor tasa de transducción que los vectores de AAV utilizados actualmente. Además, se ha encontrado que la prevalencia de anticuerpos contra la cápside en pacientes es más baja que para algunos vectores de AAV actualmente utilizados.

40 En algunas divulgaciones, la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En divulgaciones particulares, la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 96 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En divulgaciones adicionales, la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 97 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En algunas divulgaciones, la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 98 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En otras divulgaciones, la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En divulgaciones particulares, la secuencia de aminoácidos tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 4.

50 La secuencia de aminoácidos tiene al menos un 99% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 3 y más preferiblemente al menos un 99,5% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 3. En realizaciones particulares, la secuencia de aminoácidos tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

55 En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 3. En otras divulgaciones, la secuencia de aminoácidos tiene identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 4. En las divulgaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

60 La proteína de cápside que tiene la secuencia de aminoácidos definida anteriormente es una proteína de cápside funcional que puede formar una cápside funcional, junto con otras proteínas de cápside necesarias. Una cápside funcional es aquella que puede encerrar material genético, entrar en una célula y transducir la célula con el material genético. Estaría bien dentro de las capacidades de un experto determinar si una cápside es funcional. Por ejemplo, los experimentos descritos a continuación en la descripción detallada de la invención se pueden usar para determinar si una cápside puede transducir con éxito una célula.

65 La SEQ ID NO: 3 se genera clonando una región de 146 aminoácidos que abarca la región VP1 de AAV8 aguas arriba de los dominios VP2 y VP3 de la cápside de AAV3B. La SEQ ID NO: 4 se genera clonando la región VP1 de AAV5

aguas arriba de las regiones VP2 y VP3 de AAV3B. A continuación se proporcionan más detalles de los serotipos de AAV y proteínas de la cápside.

Un segundo aspecto de la invención proporciona una cápside de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV descrita anteriormente. Una cápside de AAV es una cubierta de proteína compuesta de proteínas VP1, VP2 y VP3 y que encapsula (o encierra) el material genético del virus.

Además, se proporciona una partícula viral que comprende la proteína de la cápside de AAV descrita anteriormente. La partícula viral comprende la cápside de AAV y el material genético del virus.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente. Esto significa que la secuencia de nucleótidos codifica una proteína funcional de la cápside.

Preferiblemente, el vector comprende además un promotor de tal forma que la secuencia de nucleótidos es expresable. Preferiblemente, el vector comprende el promotor viral p40 de AAV2, que es constitucionalmente activo en la mayoría de los tipos de células de mamíferos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona vectores de suministro de genes basados en virus adenoasociados (AAV), que normalmente infecta a seres humanos (por ejemplo, los serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6) o primates (por ejemplo, serotipos 1 y 4). Se describe información adicional sobre este virus se describe en Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Capítulo 69 en Fields Virology (3ª Ed. 1996).

La organización genómica de todos los serotipos de AAV conocidos es muy similar. El genoma de AAV es una molécula de ADN lineal monocatenaria que tiene menos de aproximadamente 5.000 nucleótidos (nt) de longitud. Unas repeticiones terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias de nucleótidos codificantes únicas de las proteínas de replicación no estructurales (Rep) y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas VP (VP1, VP2 y VP3) forman la cápside. Los 145 nt terminales son autocomplementarios y se organizan de forma que pueda formarse un dúplex intramolecular energéticamente estable que forma una horquilla con forma de T. Estas estructuras en horquilla funcionan como origen para la replicación de ADN viral, actuando como cebadores para el complejo de la ADN polimerasa celular. Después de la infección por AAV de tipo silvestre (wt) de células de mamífero, se expresan los genes de Rep (es decir, los que codifican proteínas Rep78 y Rep52) a partir del promotor P5 y el promotor P19, respectivamente, y las dos proteínas Rep intervienen en la replicación del genoma viral. Un acontecimiento de corte y empalme en el ORF de Rep tiene como resultado la expresión de exactamente cuatro proteínas Rep (es decir, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40). Sin embargo, se ha demostrado que el ARNm no sometido a corte y empalme, que codifica proteínas Rep78 y Rep52, en las células de mamífero, es suficiente para la producción del vector de AAV. También son suficientes las proteínas Rep78 y Rep52 para la producción del vector de AAV en las células de insecto.

En un AAV adecuado para uso como vector de terapia génica, el genoma del vector típicamente comprende un ácido nucleico de interés que se empaquetará para liberarse en una célula diana. De acuerdo con esta realización particular, el ácido nucleico está localizado entre las ITR virales en cualquier extremo del genoma del vector. Es posible que un genoma de AAV funcione con una sola ITR. Por lo tanto, en un vector de terapia génica de la invención basado en AAV, el genoma del vector está flanqueado por al menos una ITR, pero, más normalmente, por dos ITR de AAV (generalmente una en cada lado del genoma del vector, es decir, una en el extremo 5' y la otra en el extremo 3'). Puede haber secuencias intermedias entre el ácido nucleico en el genoma del vector y una o más de las ITR.

En el contexto de la invención, "al menos una ITR parvoviral" significa una secuencia palindrómica, que comprende principalmente secuencias ordenadas de forma simétrica complementarias, dispuestas simétricamente, también denominadas regiones "A", "B" y "C". La ITR funciona como un origen de replicación, un sitio que tiene un papel "cis" en la replicación, es decir, que es un sitio de reconocimiento para proteínas de replicación de acción en trans tales como, por ejemplo, Rep 78 (o Rep68), que reconocen las secuencias palindrómicas y específicas internas al palíndromo. Una excepción a la simetría de las secuencias de ITR es la región "D" de la ITR. Esta es especial (al no tener un complemento dentro de una ITR). El mellado del ADN monocatenario tiene lugar en la unión entre las regiones A y D. Es la región en la que se inicia la síntesis de ADN. La región D normalmente se sitúa en un lado del palíndromo y proporciona direccionalidad a la etapa de replicación del ácido nucleico. Una replicación de AAV en una célula de mamífero típicamente tiene dos secuencias de ITR. Es posible, sin embargo, posible modificar por ingeniería genética una ITR de manera que los sitios de unión estén en las dos cadenas de las regiones A y las regiones D estén localizadas simétricamente, una en cada lado del palíndromo. En una plantilla de ADN bicatenario circular (por ejemplo, un plásmido), después procede la replicación del ácido nucleico, asistida por Rep78 o Rep68, en las dos direcciones y una sola ITR es suficiente para la replicación parvoviral de un vector circular. Por lo tanto, En el contexto de la presente invención puede usarse una secuencia de nucleótidos de ITR. Preferiblemente, sin embargo, se usan dos, u otro número par, de ITR regulares. Mucho más preferiblemente, se usan dos secuencias de ITR. Por razones de seguridad, puede ser deseable construir un vector de AAV que no pueda propagarse adicionalmente después de la introducción inicial en una célula. Dicho mecanismo de seguridad para limitar la propagación de un vector indeseable en un receptor puede proporcionarse usando AAV con una ITR quimérica como se describe en el documento US 2003148506.

Los expertos en la materia apreciarán que la proteína o proteínas Rep virales usadas para producir un vector de AAV de la invención pueden seleccionarse teniendo en cuenta la fuente de las ITR virales. Por ejemplo, la ITR de AAV5 típicamente interacciona más eficazmente con la proteína Rep de AAV5, aunque no es necesario que el serotipo de ITR y de la proteína o proteínas Rep sean iguales.

5 La o las ITR usadas en la invención típicamente son funcionales, es decir, pueden resolverse completamente y son secuencias de AAV, siendo preferidos los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Las ITR de AAV resolubles de acuerdo con la presente invención no necesitan tener una secuencia de ITR de tipo silvestre (por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre puede alterarse por inserción, eliminación, truncamiento o mutaciones de sentido erróneo), siempre que la ITR medie las funciones deseadas, por ejemplo, el empaquetamiento viral, la integración y/o el rescate de provirus, y similares.

10 En realizaciones preferidas adicionales, se eliminan del genoma de plantilla (y, por lo tanto, del ADN del virión producido a partir del mismo) los genes cap de AAV y los genes rep de AAV. Esta configuración maximiza el tamaño de la secuencia o secuencias de ácido nucleico que puede llevar la cápside de AAV.

15 Las secuencias que pueden usarse en la presente invención para la producción de vectores de terapia génica de AAV pueden derivar del genoma de cualquier serotipo de AAV. En general, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa a nivel de los aminoácidos y a nivel del ácido nucleico, proporcionan un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente física y funcionalmente equivalentes, y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. Si se desea más información sobre la secuencia genómica de los diversos serotipos de AAV y una visión general de las similitudes genómicas, véase, por ejemplo, la base de datos GenBank Número de Registro U89790; GenBank, número de registro J01901; GenBank, número de registro AF043303; GenBank, número de registro AF085716. En la presente invención puede usarse AAV de serotipo 20 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. Sin embargo, Los serotipos 1,5 u 8 de AAV son fuentes preferidas de secuencias de AAV para uso en el contexto de la presente invención. Las secuencias de los serotipos de AAV pueden mutarse o modificarse por ingeniería genética cuando se van a usar en la producción de vectores de terapia génica.

25 Preferiblemente, las secuencias de ITR de AAV para uso en el contexto de la presente invención proceden de AAV1, AAV2, AAV4 y/o AAV6. Asimismo, las secuencias codificantes de Rep (Rep78 y Rep52) preferiblemente derivan de AAV1, AAV2, AAV4 y/o AAV6.

30 Las secuencias de ITR y Rep de AAV están particularmente conservadas entre la mayoría de serotipos. Las proteínas Rep78 de diversos serotipos de AAV, por ejemplo, tienen una identidad mayor del 89 % y la identidad de las secuencias de nucleótidos totales a nivel del genoma entre AAV2, AAV3A, AAV3B, y AAV6 es de aproximadamente el 82 %. Por otra parte, se sabe que las secuencias de Rep y las ITR de muchos serotipos de AAV complementan de forma cruzada (es decir, sustituyen funcionalmente) eficazmente a las secuencias correspondientes de otros serotipos en la producción de partículas de AAV en células de mamífero. El documento US 2003148506 revela que las secuencias Rep e ITR de AAV también complementan de forma cruzada eficazmente otras secuencias de Rep e ITR de AAV en células de insectos.

35 Se sabe que las proteínas VP de AAV determinan el tropismo celular del virión de AAV. Las secuencias que codifican la proteína VP están significativamente menos conservadas que los genes y las proteínas Rep entre diferentes serotipos de AAV. La capacidad de las secuencias de Rep e ITR de complementar de forma cruzada las secuencias correspondientes de otros serotipos permite la producción de partículas de AAV pseudotipificadas que comprenden proteínas de la cápside de un serotipo (por ejemplo, AAV1, 5 u 8) y las secuencias de Rep y/o ITR de otros serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2). Dichas partículas rAAV pseudotipadas son parte de la presente invención, ya que las secuencias de Rep y/o ITR de cualquier serotipo de AAV se pueden usar con la proteína de la cápside modificada de la invención.

40 En el contexto de la presente invención también pueden usarse secuencias de "AAV" modificadas, por ejemplo, para la producción de vectores de terapia génica de AAV. Estas secuencias modificadas, por ejemplo, incluyen secuencias que tienen al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente al 75 %, al menos aproximadamente al 80 %, al menos aproximadamente al 85 %, al menos aproximadamente al 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, o puede usarse más identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos (por ejemplo, una secuencia que tenga aproximadamente el 75-99 % de la secuencia de nucleótidos de la identidad) con un ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9, o Rep, en lugar de la ITR del AAV de tipo silvestre, o las secuencias de Rep.

45 Aunque es similar a los otros serotipos de AAV en muchos aspectos, AAV5 difiere de otros serotipos de AAV de simio y humanos en mayor medida que otros serotipos de simio y humanos conocidos. En vista de esto, la producción de rAAV5 puede diferir de la producción de otros serotipos en células de insecto. Cuando se emplean métodos de la invención para producir rAAV5, se prefiere que uno o más constructos que comprenden, colectivamente en el caso de más de un constructo, una secuencia de nucleótidos que comprende una ITR de AAV5, una secuencia de nucleótidos comprenda una secuencia codificante de Rep de AAV5 (es decir, una secuencia de nucleótidos comprende una Rep78 de AAV5). Estas secuencias de ITR y Rep pueden modificarse cuando se desee para obtener una producción eficaz

de vectores de AAV5 o vectores de AAV5 seudotipificados.

Está dentro de las competencias técnicas del experto en la materia seleccionar el virus, subtipo de virus o serotipo de virus más apropiado. Algunos subtipos o serotipos pueden ser más apropiados que otros para un cierto tipo de tejido.

5 Por ejemplo, la expresión específica de hígado de un ácido nucleico de interés puede inducirse ventajosamente por la transducción mediada por AAV de células hepáticas. El hígado es susceptible de transducción mediada por AAV y pueden usarse diferentes serotipos (por ejemplo, AAV1, AAV5 o AAV8). La transducción del músculo puede realizarse mediante la administración de un AAV que codifica un ácido nucleico a través del torrente sanguíneo. Por lo tanto, es aplicable la administración intravenosa o intraarterial.

Ventajosamente, utilizando el vector de la presente invención, se puede obtener un mayor grado de transducción celular. Este es particularmente el caso de las células hepáticas.

15 Por consiguiente, los vectores de la invención, por lo tanto, representan una herramienta para el desarrollo de estrategias para la administración *in vivo* de una secuencia de nucleótidos terapéutica, mediante la modificación por ingeniería genética del ácido nucleico dentro de un vector de terapia génica que transduce eficazmente un tipo celular apropiado, tal como células hepáticas.

20 El vector puede comprender otros elementos para permitir que se exprese la proteína terapéutica funcional. Dichos elementos se conocen bien por los expertos en la técnica.

Preferiblemente, se aíslan los ácidos nucleicos y las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente.

25 Estaría bien con las capacidades de un experto en la técnica producir las moléculas de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente. Esto podría hacerse, por ejemplo, usando la síntesis química de una secuencia dada.

30 La invención también se refiere a un método para transferir un ácido nucleico de interés a un mamífero que comprende introducir un vector de AAV recombinante en un mamífero, el vector de AAV recombinante que comprende un gen de interés que está encapsidado en una cápside que comprende la proteína de cápside descrita anteriormente.

35 La invención también proporciona una célula huésped que comprende la proteína de la cápside que tiene las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente o la secuencia de nucleótidos descrita anteriormente.

40 Como se usa en el presente documento, el término "huésped" se refiere a organismos y/o células que albergan una proteína o una secuencia de nucleótidos de la invención, así como organismos y/o células que son adecuadas para usarse en la expresión de un gen o proteína recombinante. No se pretende limitar la presente invención a ningún tipo particular de célula u organismo. De hecho, se contempla que en la presente invención encontrará utilidad como hospedador cualquier organismo y/o célula adecuada. Una célula huésped puede estar en forma de una sola célula, una población de células similares o diferentes, por ejemplo, en forma de un cultivo (tal como un cultivo líquido o un cultivo en un sustrato sólido), un organismo o parte del mismo.

45 Una célula huésped de acuerdo con la invención puede permitir la expresión de una molécula de ácido nucleico terapéutico. Por lo tanto, la célula huésped puede ser, por ejemplo, una bacteria, una levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero.

50 Además, la invención proporciona un animal transgénico no humano que comprende células que comprenden la proteína de la cápside que tiene la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente o una secuencia de nucleótidos descrita anteriormente. Preferiblemente, el animal es un mamífero no humano; especialmente un primate. Como alternativa, el animal puede ser un roedor, especialmente un ratón; o puede ser canino, felino, ovino o porcino.

55 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de la cápside que tiene la secuencia de aminoácidos de la presente invención o un vector de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El uno o más excipientes incluyen vehículos, diluyentes y/u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos o adyuvantes, etc.

60 Los niveles más altos de transferencia génica logrados con las secuencias de la presente invención representan un avance más allá del estado actual de la técnica. Se ha observado una mejora en la potencia que permitirá la transferencia de genes utilizando dosis más bajas de vectores, mejorando de este modo la seguridad (especialmente reduciendo la toxicidad hepática, que depende de la dosis) y a un menor coste. Por consiguiente, las secuencias y el vector de la presente invención pueden tener una aplicabilidad clínica a trastornos tales como la deficiencia congénita del FVII, enfermedad de Gaucher, deficiencia de OTC, enfermedad de Fabry, enfermedades por almacenamiento de glucógeno, deficiencia de  $\alpha$ -1-antitripsina, colestasis intrahepática familiar progresiva, enfermedad de Wilson, síndrome de Crigler Najjar y carcinoma hepatocelular entre otros.

65

Por consiguiente, la divulgación puede proporcionar un método para tratar una o más de las enfermedades enumeradas anteriormente que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector como se ha descrito anteriormente a un paciente que padece dicha enfermedad. Preferiblemente, el paciente es un ser humano.

5 Cuando dicha enfermedad se "trata" en el método anterior, esto significa que uno o más síntomas de dicha enfermedad se mejoran. No significa que los síntomas de dicha enfermedad estén completamente remediados, de modo que ya no estén presentes en el paciente, aunque en algunos métodos, esto puede ocurrir. El método de tratamiento da como resultado que uno o más de los síntomas de dicha enfermedad sean menos graves que antes del tratamiento.

10 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado.

Además, la invención puede proporcionar la proteína de la cápside como se ha descrito anteriormente, o un vector como se ha descrito anteriormente para su uso en terapia, preferiblemente para una de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Además, la divulgación puede proporcionar el uso de la proteína de la cápside como se ha descrito anteriormente o un vector como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para tratar una de las enfermedades como se ha mencionado anteriormente.

20 En la descripción anterior, el término "identidad" se usa para hacer referencia a la similitud de dos secuencias. A efectos de la presente invención, se define aquí que para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de un aminoácido para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos). Luego se comparan los residuos de aminoácidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad porcentual entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, identidad % = n.º de posiciones idénticas/n.º de posiciones total (es decir, posiciones solapantes) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

30 Puede realizarse una comparación de secuencias a lo largo de las longitudes enteras de las dos secuencias que se están comparando o sobre fragmentos de las dos secuencias. Por lo general, la comparación se realizará sobre toda la longitud de las dos secuencias que se están comparando. Sin embargo, la identidad de la secuencia puede realizarse sobre una región de, por ejemplo, aproximadamente veinte, aproximadamente cincuenta, aproximadamente cien, aproximadamente doscientos, aproximadamente quinientos, aproximadamente 1000 o aproximadamente 2000 o más residuos de aminoácidos contiguos.

40 El experto en la materia será consciente del hecho de que se dispone de varios programas informáticos diferentes para determinar la homología o identidad entre dos secuencias. En las realizaciones preferidas, la identidad entre dos secuencias se analiza utilizando el paquete de software Clone Manager Professional versión 9 (preferiblemente, versión 9.4). Esta herramienta de análisis es producida por Sci-Ed Software (Scientific & Educational Software, 11010 Lake Grove Blvd, Ste 100, PMB 122, Morrisville, NC 27560, EE.UU. - <http://www.sci-ed.com/index.htm>). Los ajustes utilizados para comparar las secuencias son preferiblemente los siguientes: alineamiento global del ADN; parámetros: ambas hebras; matriz de puntuación: lineal (no coincidencia 2, OpenGap 4, ExtGap 1). Como alternativa, también se pueden usar métodos tales como Fast Scan -MaxScore y Fast Scan MaxQual con el mismo software y la misma configuración local.

50 También pueden usarse otros métodos para determinar la identidad de secuencia. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software Accelrys GCG (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), usando una matriz Blosum 62 o una matriz PAM250, y un "gap weight" (penalización por creación de hueco) de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

55 Un experto en la materia apreciará que todos los aspectos de la invención, estén relacionados con, por ejemplo, el aminoácido, la partícula viral, el vector, la célula huésped o el uso, son igualmente aplicables a todos los demás aspectos de la invención. En particular, ciertos aspectos del método de tratamiento, por ejemplo, la administración del vector, pueden haberse descrito con mayor detalle que en algunos de los otros aspectos, por ejemplo, relacionados con el uso del vector en terapia. Sin embargo, el experto en la materia apreciará cuando se ha proporcionado más información detallada para un aspecto particular de la invención que, esta información generalmente es igualmente aplicable a otros aspectos de la invención. Además, el experto en la técnica también apreciará que la descripción en relación con el método de tratamiento es igualmente aplicable al uso del vector en terapia.

#### Descripción detallada de la invención

65 La invención se describirá ahora en detalle, solo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras, en las que:

La Figura 1 muestra la evaluación de las cápsides híbridas de AAV. La parte A muestra un esquema de las cápsides híbridas y la parte B ilustra la eficiencia de transferencia *in vitro* de las diferentes cápsides híbridas en dos MOI diferentes (multiplicidad de infecciones) en células HUH7.

5 La Figura 2 muestra los resultados de los experimentos de transducción celular. La Figura 2A muestra los resultados de la transducción de células HUH7 con los vectores de AAV8, AAV5, AAV-rh 10, AAV-LK03 y AAV Mutante C. La Figura 2B muestra los resultados de la transducción de células HepG2 adherentes con los vectores de AAV8, AAV5, AAV-LK03 y AAV Mutante C.

10 La Figura 3A muestra el análisis de citometría de flujo de la transducción de hepatocitos primarios con los vectores de AAV8, AAV5, AAV-rh10 y AAV Mutante C. La Figura 3B son imágenes de microscopio fluorescente de los hepatocitos transducidos.

15 La Figura 4A muestra la excitación/emisión de GFP a 485 nm/535 nm resultante de la transducción de cultivos 3D de células HepG2 con vectores de AAV8 y AAV Mutante C que contienen un gen GFP en una MOI de  $1 \times 10^4$  o  $1 \times 10^5$ . La Figura 4B son imágenes de microscopio fluorescente de las células 3D HepG2 transducidas (objetivo 5x, constante de tiempo de exposición de GFP [300 ms]).

20 La Figura 5 muestra la prevalencia de los anticuerpos contra vectores de AAV en pacientes con hemofilia grave como resultado de un método de inmovilización ELISA.

El programa de investigación de los inventores se diseñó para establecer un vector de AAV que tiene una tasa de transducción relativamente alta y efectos secundarios mínimos. Como resultado, los inventores han desarrollado nuevas cápsides y vectores híbridos.

#### 25 Ejemplo 1

Se generaron nuevas cápsides híbridas intercambiando empíricamente diversos dominios de 4 cápsides de AAV diferentes: (1) AAV8, (2) AAV5, (3) AAV3B, y (4) AAV-LK03 (véase la Figura 1). Se ha informado que este último transduce hepatocitos humanos de manera más eficiente que las cápsides de AAV de origen natural que existen en la actualidad. De forma destacable, LK03 tiene una homología de secuencia de aminoácidos >95% con AAV3B. La proteína de la cápside de la presente invención es una cápside sintética que se ha desarrollado mediante la selección de motivos de cápsides de AAV de tipo silvestre de los serotipos 1-rh10. Las regiones VP2 y VP3 de LK03 se reemplazaron con las regiones correspondientes de AAV8 y AAV5 para generar los mutantes A (SEQ ID NO: 1) (Mut A) y B (SEQ ID NO: 2) (Mut B) respectivamente. En el mutante C (SEQ ID NO: 3) (Mut C), se clonó una región de 146 aminoácidos que abarca la región VP1 de AAV8 aguas arriba de los dominios VP2 y VP3 de la cápside de AAV3B. De manera similar, en el mutante D (SEQ ID NO: 4) (Mut D), la región AAV5-VP1 se clonó aguas arriba de las regiones VP2 y VP3 AAV3B. En el mutante E (SEQ ID NO: 5) (Mut E), los dominios v-I, v-II y v-IX de AAV8 se reemplazaron con el cognado de AAV3B. En la mutante F (SEQ ID NO: 6) (Mut F), se clonó una región de 262 aminoácidos que contenía el sitio de unión del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos de AAV3B en la región correspondiente de la cápside de AAV8.

La relación de VP1, VP2 y VP3 para las cápsides sintéticas, en particular el mutante C y el mutante D, es similar a la observada para AAV2, 3b, 5 u 8. Tanto el mutante C como el mutante D tienen un fuerte tropismo para las células hepáticas humanas y son capaces de mediar niveles más altos de transferencia génica en estas células cuando se comparan con las cápsides de AAV de tipo silvestre, incluyendo AAV5 y AAV8.

Las secuencias de la cápside se ensamblaron mediante PCR superpuesta o se generaron por síntesis génica (GenScript; Mut C, Mut E y F). Las secuencias de la cápside se clonaron en un plásmido auxiliar de AAV que contenía la secuencia de codificación Rep78 de AAV2 que tiene un codón de inicio modificado (ATG a ACG). Las reservas de vectores se prepararon mediante transfección de plásmidos triples estándar de células HEK293 con pCMV-eGFP, pRep2Cap y el plásmido auxiliar adenoviral, pHGT1. El vector se purificó por centrifugación en gradiente de densidad con iodixanol. Los genomas de vectores se titularon por QPCR con cebadores específicos para eGFP. El rendimiento de los vectores de AAV híbridos fue comparable al observado previamente con AAV8. La eficiencia de transferencia génica de estas cápsides híbridas se evaluó *in vitro* utilizando la línea celular de carcinoma hepatocelular HUH7 en la multiplicidad de infección (MOI)  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$ . El nivel de transferencia génica se determinó mediante la detección del gen indicador, eGFP, mediante citometría de flujo. El mayor nivel de transferencia génica se logró con el mutante C a niveles que fueron al menos 5 veces más altos que el AAV8 (Figura 1B). Este mutante medió niveles similares de transferencia génica como AAV3B y el nuevo serotipo LK03. La eficiencia de la transferencia génica del mutante D fue menor que la del mutante C, pero 3 veces mayor que el serotipo parental, AAV5. Los mutantes E y F tuvieron niveles mucho más bajos de transferencia génica en comparación con los mutantes C con niveles similares de células positivas para GFP que se observaron con AAV8 y AAV5 de tipo silvestre.

Ejemplo 2

**Producción de vectores de AAV recombinantes.** Los vectores de AAV se realizaron mediante co-transfección de células T HEK293 adherentes con una combinación de plásmidos que consistían en el plásmido vector en el que el gen indicador EGFP estaba bajo el control del promotor CMV, un plásmido auxiliar adenoviral y un plásmido de empaquetamiento en el que el respectivo gen cap de AAV estaba aguas abajo del gen Rep de AAV2 bajo el control de los promotores endógenos. Los vectores se purificaron utilizando cromatografía en columna AVB. La valoración de todos los vectores se realizó mediante el ensayo de qPCR, así como el análisis de gel alcalino.

**Transducción *in vitro*.** Las líneas celulares de cáncer de hígado cultivadas en monocapa se transdujeron con AAV a varias MOI seguidas de una evaluación de la eficiencia de transducción utilizando citometría de flujo a las ~72 horas después de la transferencia génica.

Los hepatocitos humanos primarios se obtuvieron de Life-technologies y se mantuvieron en cultivo según las instrucciones del proveedor. Luego se expusieron a GFP que codificaba AAV bajo el promotor CMV. La eficiencia de la transferencia génica se evaluó 3-4 días más tarde utilizando citometría de flujo o microscopía de fluorescencia directa.

Se expusieron cultivos en 3D de células HepG2 encapsuladas a diferentes MOI de AAV, seguido de una evaluación por cuantificación de fluorescencia verde utilizando un lector de placa o mediante microscopía de fluorescencia directa.

**Título de anticuerpo anti-AAV.** Se utilizó un método de inmunoabsorción para evaluar el título de anticuerpo anti-AAV en muestras de plasma obtenidas de pacientes con hemofilia grave. Los títulos de anticuerpos anti-AAV se expresaron como el título de criterio de valoración (Unidades relativas/ml) definido como el recíproco de la dilución interpolada con un valor de absorbancia igual a cinco veces el valor de fondo de la absorbancia media.

**Eficacia de transducción de vectores de mutante C de AAV en comparación con otros serotipos en líneas celulares de hígado humano y hepatocitos humanos primarios**

En un estudio enfocado, se comparó la eficacia de transducción *in vitro* de AAV8, AAV5, AAV-rh10, AAV-LK03 y AAV Mut C en Huh7 (línea celular de cáncer de hígado) y líneas celulares HepG2 (línea celular de cáncer de hígado). Todos los vectores contenían el gen indicador de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV).

Los vectores AAV8, AAV5 y AAV-rh10 fueron menos eficientes en la transducción de células Huh7 con una expresión media de GFP que variaba del 15 %-26 %. En comparación, se observaron niveles más altos de transferencia génica con AAV-LK03 y Mut C con una eficiencia de transducción cercana al 70 % para los vectores pseudotipados con estas proteínas de la cápside (Figura 2A). La diferencia en la eficiencia de transferencia génica entre Mut C y AAV8 fue altamente significativa ( $p = 0,0012$ ).

Se obtuvieron resultados similares en la línea celular HepG2 (Figura 2B) con una eficiencia de transferencia génica casi 10 veces mayor observada cuando las células HepG2 se transdujeron con AAV Mut C y AAV-LK03 en comparación con AAV8 y AAV5, independientemente de MOI ( $P = <0,05$ ).

Se evaluó la siguiente eficiencia de transferencia génica de hepatocitos humanos primarios derivados de 3 donantes diferentes. Todos los donantes eran hombres, siendo 2 de origen caucásico y 1 de origen afro-caribeño. La edad de estos donantes varió de 21-52 años. Los hepatocitos primarios se expusieron a un vector de AAV a una MOI de  $10^6$  usando un vector que codifica GFP bajo el control del promotor de CMV. La eficiencia de la transducción se evaluó mediante microscopía fluorescente o citometría de flujo a los 4-5 días después de la transferencia génica. Como se muestra en la Figura 3, la eficiencia de transferencia génica lograda con AAV Mut C ( $32,06 \pm 4\%$ ) fue más de 4 veces superior a la alcanzada con AAV8 ( $7,3 \pm 7\%$ ). La diferencia en la eficiencia de transferencia génica de los hepatocitos humanos primarios entre los grupos AAV Mut C y AAV8 fue altamente significativa ( $p = 0,0015$  utilizando una prueba t de muestra). El análisis de imagen fluorescente directa validó los datos de citometría de flujo que muestran un nivel mucho más alto de expresión de GFP en las células transducidas con AAV Mut C (Figura 3B).

Los inventores examinaron a continuación la transferencia génica mediada por AAV en cultivos 3D de células HepG2 encapsuladas en alginato usando JetCutter para producir aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  de perlas esféricas que contenían células HepG2 a una concentración aproximada de 1,7 M por ml de perlas. La resistencia de este modelo es que dentro de las perlas las células encapsuladas proliferan para formar esferoides celulares compactos (AELS) con buen contacto célula a célula y función celular. Los AELS presentan un mejor crecimiento y una función específica del hígado regulada positivamente en comparación con los cultivos en monocapa, con una arquitectura celular típica que muestra desmosomas, uniones estrechas y micro-vellosidades, una alta representación del retículo endoplásmico y las mitocondrias, y una generación de matriz extracelular que recuerda al hígado normal.

Los cultivos de perlas en 3D se transdujeron con AAV8 o AAV Mut C en una MOI de  $1 \times 10^4$  o  $1 \times 10^5$  usando un vector que contiene el casete de expresión de CMV GFP. Como anteriormente, la eficiencia de transducción se determinó

cuantificando la fluorescencia verde utilizando un lector de placas (Figura 4A) o microscopía de fluorescencia directa (Figura 4B). Se observó una eficacia de transferencia génica de 3-5 veces mayor de los esferoides 3D con AAV Mut C en comparación con la expresión de GFP en perlas transducidas con AAV8. Esta diferencia en la eficiencia de transferencia génica también se observó utilizando microscopía fluorescente directa.

5 **Evaluación de anticuerpos preexistentes contra el mutante C en pacientes con hemofilia grave**

10 Se cribaron muestras de plasma de pacientes con hemofilia grave no seleccionados para evaluar la prevalencia de anticuerpos preexistentes contra AAV Mut C utilizando un método ELISA de inmunoadaptación. El 63 % de los pacientes no mostró anticuerpos detectables contra AAV Mut C. Los niveles correspondientes para AAV8 y AAV-LK03 fueron del 51 %. Por lo tanto, esto sugiere que menos pacientes con hemofilia grave tienen anticuerpos contra AAV Mut C.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> UCL Business PLC
- <120> Cápside
- 20 <130> P531277PCT
- <150> GB1508026.0
- <151> 11-05-2015
- 25 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 30 <211> 738
- <212> PRT
- <213> Proteína sintética
- <400> 1
- 35

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

Asn Leu

- <210> 2
- <211> 725
- <212> PRT
- <213> Proteína sintética
- <400> 2

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 711 349 T3

Asn Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser  
 405 410 415  
 Ser Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val  
 420 425 430  
 Asp Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val  
 435 440 445  
 Gln Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn  
 450 455 460  
 Trp Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser  
 465 470 475 480  
 Gly Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met  
 485 490 495  
 Glu Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met  
 500 505 510  
 Thr Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met  
 515 520 525  
 Ile Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu  
 530 535 540  
 Glu Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn  
 545 550 555 560  
 Arg Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser  
 565 570 575  
 Ser Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val  
 580 585 590  
 Pro Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile  
 595 600 605  
 Trp Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala  
 610 615 620  
 Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys  
 625 630 635 640  
 Asn Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val



ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

ES 2 711 349 T3

130						135										140
Pro	Val	Asp	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Gly	
145					150					155					160	
Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr	
				165					170					175		
Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro	
			180					185					190			
Ala	Ala	Pro	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	
		195					200					205				
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ser	
	210					215					220					
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile	
225					230					235					240	
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu	
				245					250					255		
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His	Tyr	
			260					265					270			
Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	His	
		275					280					285				
Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn	Trp	
	290					295					300					
Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Lys	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Val	
305					310					315					320	
Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Leu	
				325					330					335		
Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	
			340					345					350			
Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	Asp	
		355					360					365				
Val	Phe	Met	Val	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	Ser	
	370					375					380					

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 4  
<211> 735  
<212> PRT  
<213> Proteina sintética  
  
<400> 4

5

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 711 349 T3

Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro  
 130 135 140  
 Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly Lys  
 145 150 155  
 Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly  
 165 170 175  
 Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro Ala  
 180 185 190  
 Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly Ala  
 195 200 205  
 Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser  
 210 215 220  
 Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr  
 225 230 235 240  
 Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr  
 245 250 255  
 Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe  
 260 265 270  
 Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys  
 275 280 285  
 His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly  
 290 295 300  
 Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr  
 325 330 335  
 Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val  
 340 345 350  
 Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val  
 355 360 365  
 Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln  
 370 375 380

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys



ES 2 711 349 T3

	115						120							125			
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg		
	130					135					140						
Pro	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile		
	145				150					155					160		
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln		
				165					170					175			
Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro		
			180					185					190				
Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Met	Ala	Ala	Gly	Gly		
		195					200					205					
Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser		
	210					215					220						
Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val		
	225				230					235					240		
Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His		
				245					250					255			
Leu	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His		
			260					265					270				
Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe		
		275					280					285					
His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn		
	290					295					300						
Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln		
	305				310					315					320		
Val	Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Glu	Gly	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn		
				325					330					335			
Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro		
			340					345					350				
Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala		
		355					360					365					

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6  
<211> 736  
5 <212> PRT  
<213> Proteína sintética  
  
<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 711 349 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

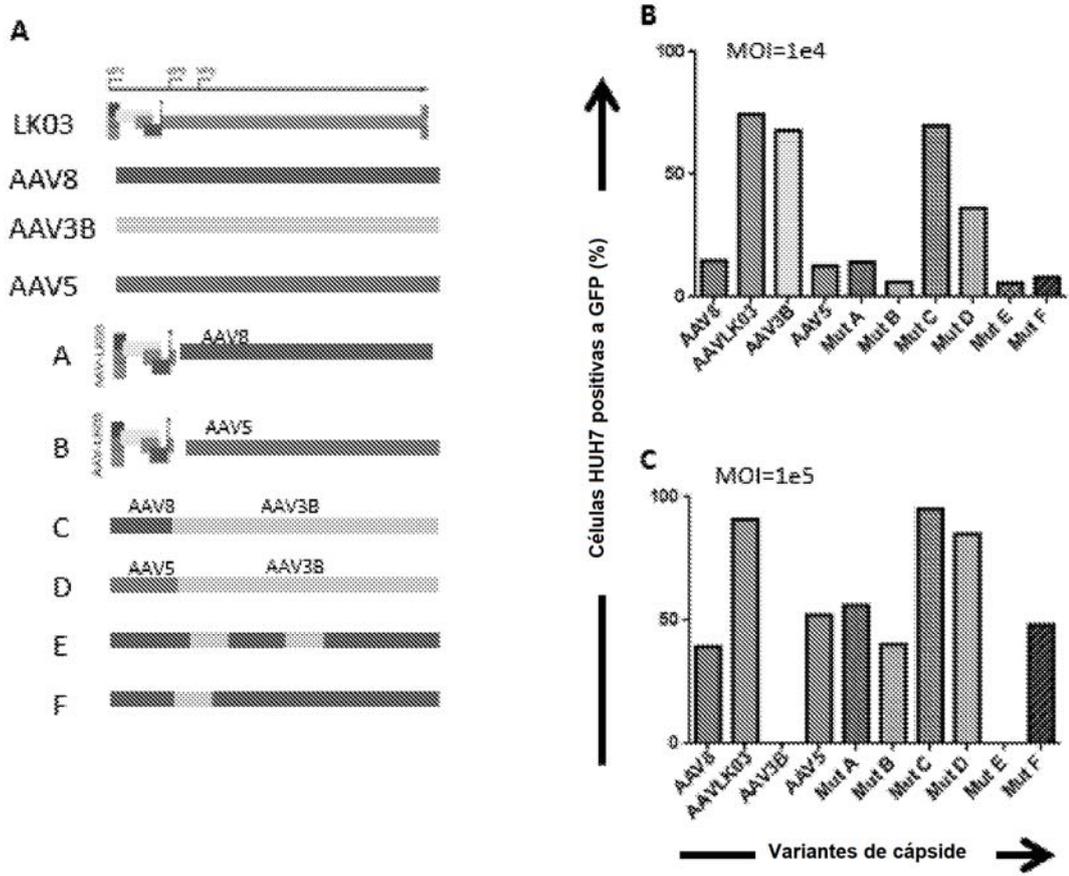
Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

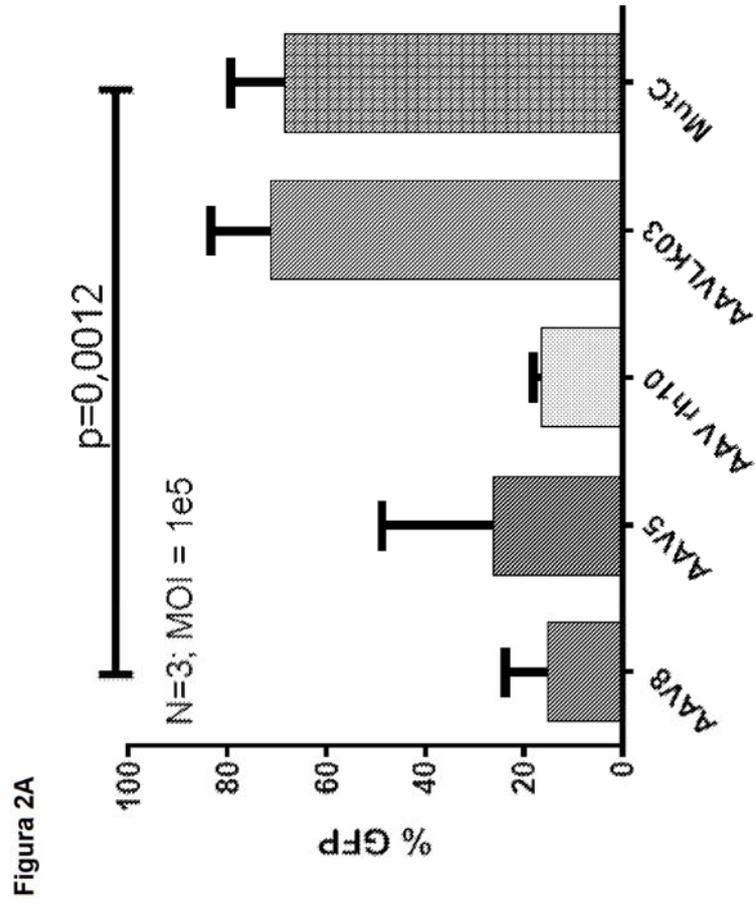


**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína de la cápside del AAV que tiene una secuencia de aminoácidos que:
  - 5 (i) tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3; o
  - (ii) tiene al menos un 99 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 3 y es una cápside híbrida que comprende regiones de las cápsides de AAV3B y AAV8.
- 10 2. La proteína de la cápside del AAV de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos un 99,5 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3.
3. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la secuencia de aminoácidos tiene la secuencia de la SEQ ID NO.3.
- 15 4. Una cápside de AAV que comprende la proteína de la cápside de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una partícula viral que comprende la proteína de la cápside de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 6. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. Una célula huésped que comprende la proteína de la cápside de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 6.
- 25 8. Un animal transgénico no humano que comprende células que comprenden la proteína de la cápside de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 6.
9. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de la cápside de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 6, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 30 10. La proteína de la cápside de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 6 para su uso en terapia.

Figura 1





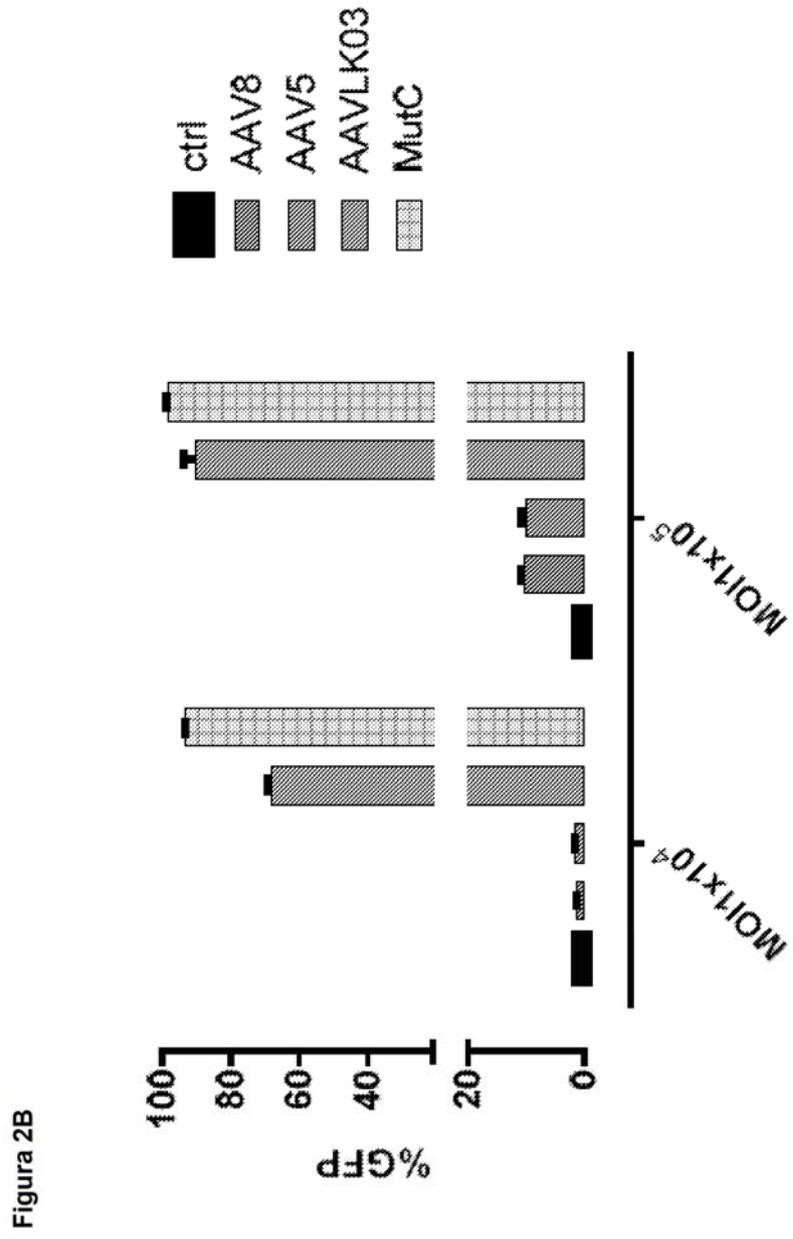
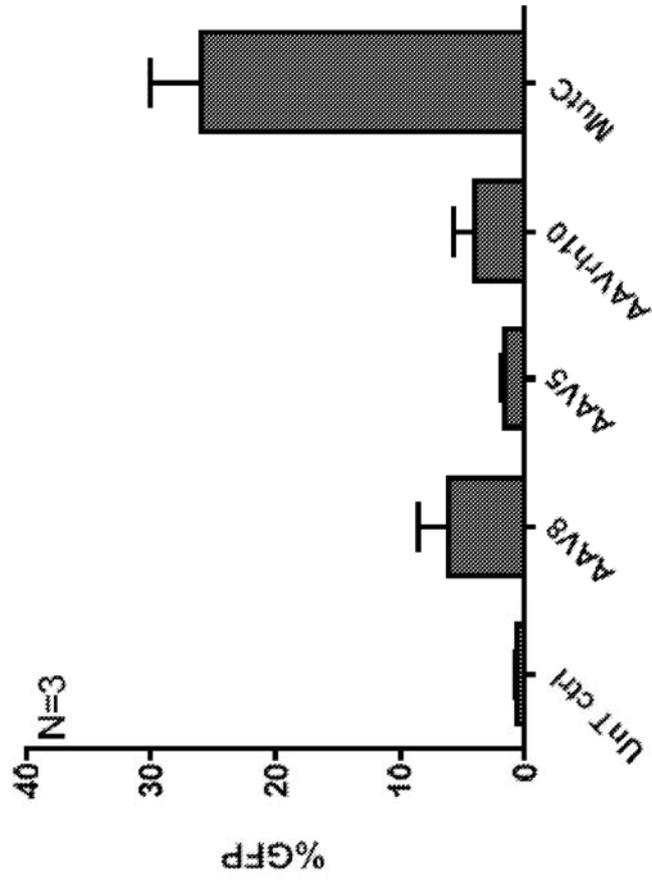
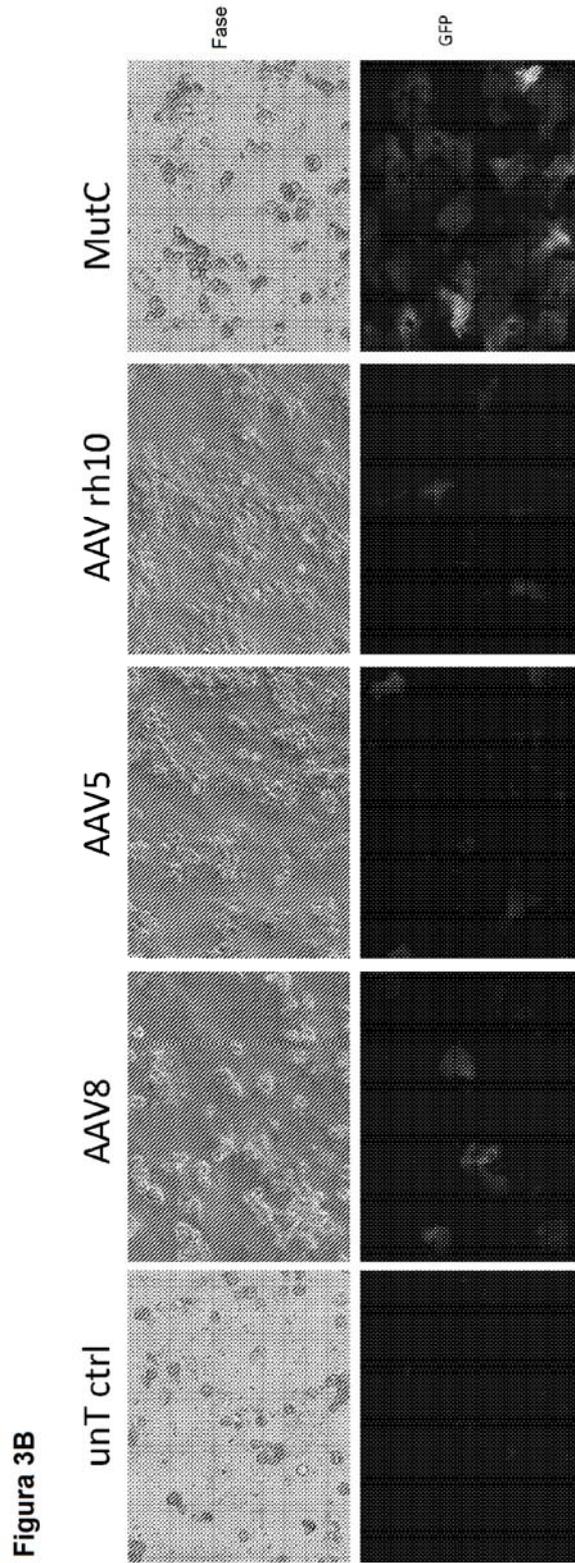


Figura 3A





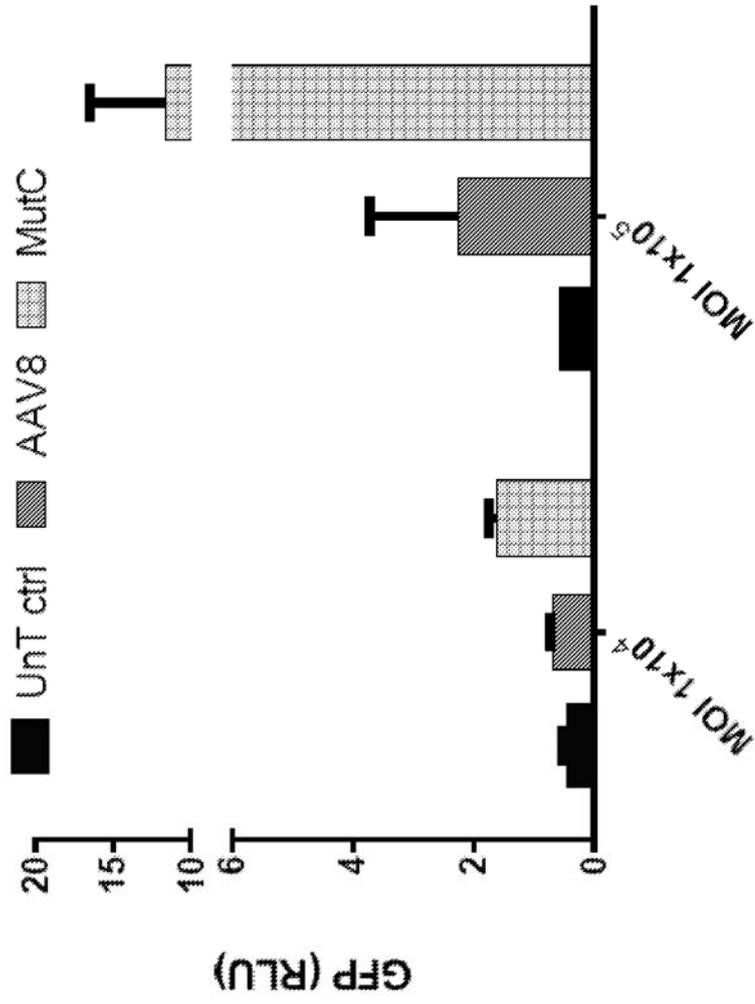


Figura 4A

