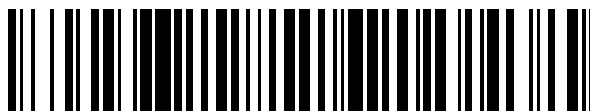


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 292**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2014** **PCT/US2014/039015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014** **WO14193716**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2014** **E 14733803 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 2999791**

54 Título: **Composiciones de vector raav3 con cápside modificada y métodos de uso en terapia génica del cáncer de hígado humano**

30 Prioridad:

21.05.2013 US 201313899481

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

28.05.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
223 Grinter Hall
Gainesville, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

**SRIVASTAVA, ARUN;
ZHONG, LI;
ZOLOTUKHIN, SERGEI;
ASLANIDI, GEORGE V.;
AGBANDJE-MCKENNA, MAVIS;
VAN VLIET, KIM M. y
LING, CHEN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 714 292 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

Composiciones de vector raav3 con cápside modificada y métodos de uso en terapia génica del cáncer de hígado humano

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de biología molecular y virología y en particular, al desarrollo de vehículos de suministro de genes. Se divulgan composiciones de vector rAAV mejoradas útiles para suministrar varios segmentos de ácido nucleico, incluyendo aquellos que codifican proteínas, polipéptidos, péptidos, oligonucleótidos antisentido y construcciones de ribozima terapéuticos a hospedadores seleccionados para su uso en diversos regímenes diagnósticos y/o terapéuticos. También se proporcionan métodos para preparar y usar estas construcciones de vector a base de rAAV modificadas en varias terapias génicas a base de virus y en particular, para el diagnóstico, prevención, tratamiento y/o mejora de síntomas de enfermedades, trastornos, disfunciones, traumatismos o lesiones en seres humanos. La divulgación proporciona sistemas de suministro de vector vírico basados en rAAV mutado con una eficacia de la transducción mejorada y/o una infectividad vírica mejorada de las células hospedadoras de mamífero seleccionadas. En particular, la divulgación proporciona vectores de rAAV y viriones mejorados que tienen sustituciones de aminoácidos en uno o más restos expuestos en la superficie de una proteína de la cápside vírica.

Descripción de la técnica anterior

Los grandes avances en el campo de la terapia génica se han logrado usando virus para suministrar material genético terapéutico. El virus adenoasociado (AAV) ha atraído una atención considerable como un vector vírico altamente eficaz para la terapia génica debido a su baja inmunogenicidad y capacidad para transducir de manera eficaz a células que no se encuentran en división. Se ha demostrado que los AAV infectan a varios tipos de células y tejidos y se han hecho avances significativos durante la última década para adaptar este sistema vírico para su uso en terapia génica humana.

En esta forma de "tipo silvestre" normal, el ADN de AAV recombinante (rAAV) se empaqueta en la cápside vírica en forma de una molécula monocatenaria de aproximadamente 4600 nucleótidos (nt) de longitud. Después de la infección de las células por el virus, la maquinaria molecular de la célula convierte la hebra monocatenaria de ADN en una forma bicatenaria. Solo la forma bicatenaria es útil para los polipéptidos de la célula que transcriben el gen o los genes contenidos en ARN.

El AAV tiene varias propiedades que favorecen su uso como vehículo de suministro génico: 1) el virus de tipo silvestre no se asocia con ninguna patología humana; 2) la forma recombinante no contiene secuencias codificantes víricas nativas; y 3) se ha observado una expresión transgénica persistente en diversas aplicaciones.

La eficacia de la transducción de los vectores de virus adenoasociado 2 (AAV) varía enormemente en diferentes células y tejidos *in vitro* e *in vivo*, lo que ha limitado la utilidad de muchos de estos en regímenes de terapia génica potenciales. Se han llevado a cabo estudios sistemáticos para dilucidar las etapas fundamentales en el ciclo de vida de los AAV. Por ejemplo, se ha documentado que una proteína celular, FKBP52, fosforilada en los restos de tirosina por la proteína tirosina cinasa del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR-PTK), inhibe la síntesis de la segunda hebra de ADN de AAV y por consiguiente, la expresión del transgén *in vitro* así como *in vivo*. También se ha demostrado que la señalización de EGFR-PTK modula el tráfico intracelular mediado por la vía de ubiquitina/proteasoma, así como la síntesis de la segunda hebra de ADN mediada por FKBP52 de los vectores de AAV. En esos estudios, la inhibición de EGFR-PTK ocasionó una ubiquitinación reducida de las proteínas de la cápside de AAV, lo que a su vez, facilitó el transporte nuclear limitando la degradación mediada por el proteasoma de vectores AAV, lo que implica la fosforilación mediada por EGFR-PTK de los restos de tirosina de las cápsides de AAV. La técnica anterior carece de vectores víricos de rAAV mejorados que tengan una eficacia de transducción mejorada para infectar células de mamífero seleccionadas y para el suministro génico dirigido a células humanas en particular.

Breve resumen de la invención

La presente divulgación supera las limitaciones y deficiencias inherentes de la técnica anterior proporcionando nuevas construcciones genéticas basadas en AAV mejoradas que codifican uno o más agentes terapéuticos útiles en la preparación de medicamentos para la prevención, tratamiento y/o mejora de una o más enfermedades, trastornos o disfunciones causadas por una deficiencia en uno o más de dichos polipéptidos. En particular, la divulgación proporciona construcciones genéticas basadas en rAAV con la proteína de la cápside VP3 modificada que codifican una o más moléculas seleccionadas, tales como, por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos o diagnósticos (incluyendo, por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, ARNip, ARNi, oligo y polinucleótidos antisentido, ribozimas y variantes y/o fragmentos activos de los mismos), para su uso en el diagnóstico, prevención, tratamiento y/o mejora de síntomas de varias enfermedades, trastornos, disfunciones, traumatismos, lesiones y similares en mamíferos.

La presente divulgación proporciona proteínas de la cápside VP3 de AAV que incluyen modificaciones de uno o más restos de aminoácidos expuestos en la superficie (incluyendo, por ejemplo, sin limitación, restos de lisina, serina, treonina y/o tirosina) en comparación con el tipo silvestre. También se proporcionan viriones de rAAV infecciosos que comprenden las proteínas de la cápside de AAV de la presente invención, así como moléculas de ácido nucleico y vectores de rAAV que codifican las proteínas de la cápside de AAV mutantes de la presente invención y ácidos nucleicos que codifican uno o más agentes diagnósticos y/o terapéuticos seleccionados para su suministro a una población seleccionada de células de mamífero.

Ventajosamente, los nuevos vectores de rAAV, construcciones de expresión y viriones infecciosos y partículas víricas que los contienen como se divulga en el presente documento tienen preferentemente una eficacia mejorada en la transducción de una o más de varias células, tejidos y órganos de interés, cuando se comparan con construcciones de expresión de tipo silvestre no modificadas y con los vectores de rAAV correspondientes y los viriones que los comprenden.

Los vectores rAAV mejorados proporcionados en el presente documento transducen a una o más células hospedadoras seleccionadas con mayores eficacias (y normalmente mucho mayores eficacias) que los vectores rAAV convencionales de tipo silvestre (es decir, "no modificados"). Llevando a cabo un análisis extensivo y experimentos detallados que implican la mutagénesis dirigida al sitio de varios restos de aminoácido expuestos en la superficie individuales y/o combinaciones de dos, tres, cuatro, cinco o seis o más de estos en diversas proteínas de la cápside de AAV de varios serotipos de AAV, los inventores han desarrollado una gran colección de vectores de rAAV con una sola o múltiples mutaciones que poseen eficacias de transducción mejoradas. Los inventores han demostrado en una serie de serotipos de AAV diferentes que la sustitución de uno o más restos de aminoácidos presentados en la superficie del virión da como resultado vectores víricos mejorados, que tienen la capacidad de una mayor eficacia de transducción que la de los vectores correspondientes no sustituidos a partir de los cuales se prepararon los mutantes.

El desarrollo de estos nuevos vectores víricos de rAAV con la cápside mutante reduce drásticamente el número de partículas víricas necesarias para los regímenes de terapia génica convencionales. Además de tener eficacias de transducción mejoradas para diversas células de mamífero, los vectores de rAAV con aminoácidos expuestos en la superficie modificados descritos en el presente documento son más estables, menos inmunogénicos y pueden producirse con un coste mucho menor al de los vectores víricos tradicionales empleados en la actualidad en los regímenes de terapia génica en mamíferos.

La invención es específicamente como se describe en las reivindicaciones.

En un aspecto particular, se proporciona una proteína de la cápside VP3 de rAAV modificada, que incluye: (a) un resto de aminoácido no de tirosina en una o más posiciones correspondientes a Y252, Y272, Y444, Y701, Y705 y Y731 de la proteína de la cápside de AAV3 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 3; (b) un resto de aminoácido no de tirosina en cada una o más posiciones correspondientes a S459 o S663, de la proteína de la cápside de AAV3 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 3; (c) un resto de aminoácido no de treonina en cada una de una o más posiciones correspondientes a T251 o T492 de la proteína de la cápside de AAV3 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 3; (d) un resto de aminoácido no de lisina en cada una o más posiciones correspondientes a K528, K533 o K545 de la proteína de la cápside de AAV3 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 3; (e) (i) un resto de aminoácido no de tirosina en la posición Y701 o Y705; y (ii) un resto de aminoácido no de tirosina en la posición Y705 o Y731 o un resto de aminoácido no de serina en la posición S663 de la proteína de la cápside de AAV3 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 3; (f) una combinación de tres o más sustituciones de aminoácido listadas en (a), (b), (c) y (d); cada una con un aminoácido no nativo; (g) una combinación de cuatro o más sustituciones de aminoácido listadas en (a), (b), (c) y (d); cada una con un aminoácido no nativo; o (h) una combinación de cinco o más sustituciones de aminoácido listadas en (a), (b), (c) y (d); cada una con un aminoácido no nativo; o como alternativa, en donde cada una de las sustituciones de aminoácidos se encuentra en una posición de aminoácido correspondiente a la misma en uno cualquiera de los otros serotipos de vector de tipo silvestre seleccionado entre el grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9 y AAV10, como se expone en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10, respectivamente.

Las proteínas con múltiples mutaciones incluyen, pero sin limitación, combinaciones de sustituciones con aminoácidos no nativos en cada uno de tres o más restos de aminoácido expuestos en la superficie distintos en la cápside de AAV3. Estos vectores con múltiples mutaciones incluyen las sustituciones:

- (a) Y701F, Y705F y Y731F;
- (b) Y705F, Y731F y S663 V;
- (c) Y705F, Y731F y T492V;
- (d) Y705F, Y731F, K533R;
- (e) S663V, T492V y K533R;
- (f) Y705F, Y731 F, S663 V y T492V; y
- (g) Y705F, Y731F, S663V, T492V y K533R en los restos de aminoácido indicados de la proteína de la cápside de

AAV3 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 3 o en restos de aminoácido expuestos en la superficie equivalentes en uno cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10, como se expone en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, respectivamente.

Los aminoácidos no nativos sustituidos pueden incluir una sustitución de uno o más aminoácidos normalmente no presentes en un resto particular en la proteína de tipo silvestre correspondiente e incluyen preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos no nativos seleccionados entre el grupo que consiste en fenilalanina (F), valina (V), histidina (H), isoleucina (I), alanina (A), leucina (L), ácido aspártico (D), asparagina (N), ácido glutámico (E), arginina (R), serina (S) e isoleucina (I).

También se describen polinucleótidos aislados y purificados que codifican una o más variantes mutadas en proteínas de la cápside divulgadas como se describe en el presente documento, así como vectores víricos adenoasociados recombinantes (rAAV) que comprenden uno o más de dichos polinucleótidos. Preferentemente, las construcciones de vector incluyen además al menos un segmento de ácido nucleico que codifica una molécula terapéutica o diagnóstica unida operativamente a un promotor capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en una célula hospedadora adecuada que comprende el vector. La eficacia de transducción de un virión que comprende la proteína de la cápside VP3 de AAV modificada será normalmente mayor que la de la proteína de tipo silvestre no modificada correspondiente y por tanto, poseerá una eficacia de transducción en una célula de mamífero que es al menos 2 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 10 veces o al menos aproximadamente 12 veces o más en una célula hospedadora de mamífero seleccionada que la de un virión que comprende una proteína de la cápside correspondiente no modificada. En ciertos aspectos, la eficacia de transducción de los vectores rAAV proporcionados en el presente documento será al menos aproximadamente 15 veces mayor, al menos aproximadamente 20 veces mayor, al menos aproximadamente 25 veces mayor, al menos aproximadamente 30 veces mayor o al menos aproximadamente 40, 45 o 50 veces o más mayor que la de un virión que comprende una proteína de la cápside correspondiente no modificada. Por otra parte, los viriones infecciosos que incluyen una o más proteínas de la cápside VP3 de AAV modificadas son preferentemente menos susceptibles a la ubiquitinación cuando se introducen en una célula de mamífero que un virión que comprende una proteína de la cápside correspondiente no modificada.

La presente divulgación también se refiere a vectores de rAAV, en donde el segmento de ácido nucleico comprende además un promotor, un potenciador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación o cualquier combinación de las mismas, unida operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica el polinucleótido seleccionado de interés.

Preferentemente, el promotor es un promotor heterólogo, un promotor específico de tejido, un promotor específico de célula, un promotor constitutivo, un promotor inducible o una combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, los segmentos de ácido nucleico clonados en los nuevos vectores de expresión de rAAV descritos en el presente documento expresarán o codificarán uno o más polipéptidos, péptidos, ribozimas, ácidos nucleicos peptídicos, ARNip, ARNi, oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos antisentido, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o cualquier combinación de los mismos.

Como se observa en el presente documento, los agentes terapéuticos útiles en el presente documento pueden incluir uno o más agonistas, antagonistas, factores antiapoptóticos, inhibidores, receptores, citocinas, citotoxinas, agentes eritropoyéticos, glucoproteínas, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, hormonas, receptores de hormonas, interferones, interleucinas, receptores de interleucina, factores de crecimiento nervioso, péptidos neuroactivos, receptores de péptidos neuroactivos, proteasas, inhibidores de proteasas, proteína descarboxilasas, proteína cinasas, inhibidores de proteína cinasas, enzimas, proteínas de unión a receptor, proteínas de transporte o uno o más inhibidores de las mismas, receptores de serotonina o uno o más inhibidores de la captación de la misma, serpinas, receptores de serpinas, supresores tumorales, moléculas de diagnóstico, agentes quimioterapéuticos, citotoxinas o cualquier combinación de los mismos.

Aunque los inventores contemplan particularmente el uso de los vectores rAAV3 indicados en la FIG. 41 en los métodos para la terapia génica de uno o más cánceres de hígado de mamífero, pueden prepararse vectores con la cápside mutada y empaquetarse dentro de viriones de cualquier serotipo de AAV conocido, incluyendo, por ejemplo, AAV serotipo 1 (AAV1), AAV serotipo 2 (AAV2), AAV serotipo 4 (AAV4), AAV serotipo 5 (AAV5), AAV serotipo 6 (AAV6), AAV serotipo 7 (AAV7), AAV serotipo 8 (AAV8), AAV serotipo 9 (AAV9), AAV serotipo 10 (AAV10), AAV serotipo 11 (AAV11) o AAV serotipo 12 (AAV12).

En el presente documento se describen poblaciones y pluralidades de dichos vectores rAAV con la cápside mutada, así como viriones, partículas víricas infecciosas y células hospedadoras de mamífero que incluyen uno o más segmentos de ácido nucleico que los codifican.

Preferentemente, las células hospedadoras de mamífero serán células hospedadoras humanas, incluyendo, por ejemplo, células sanguíneas, células madre, células hematopoyéticas, células CD34⁺, células hepáticas, células cancerosas, células vasculares, células pancreáticas, células neuronales, células oculares o retinianas, células epiteliales o endoteliales, células dendríticas, fibroblastos o cualquier otra célula originaria de mamífero, incluyendo,

5 sin limitación, células hepáticas (es decir, de hígado), células pulmonares, células cardíacas, células pancreáticas, células intestinales, células diafragmáticas, células renales (es decir, de riñón), células neuronales, células sanguíneas, células de médula ósea o uno cualquiera o más tejidos seleccionados de un mamífero para el que se contempla la terapia génica a base de virus.

10 También se describen una composición y formulaciones que incluyen uno o más de las proteínas, segmentos de ácido nucleico, vectores víricos, células hospedadoras o partículas víricas de la presente invención, junto con uno o más tampones, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluirse en uno o más kits diagnósticos o terapéuticos, para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad, lesión, trastorno, traumatismo o disfunción en mamíferos.

15 También se describe un método para proporcionar a un mamífero que lo necesite una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de una molécula biológica seleccionada, comprendiendo el método proporcionar a una célula, tejido u órgano de un mamífero que lo necesite, una cantidad de un vector rAAV; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de la molécula biológica seleccionada.

También se divulga un método para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar al menos uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal o un traumatismo en un mamífero. En un sentido general, el método incluye al menos la etapa de administrar a un mamífero que lo necesite uno o más de los

25 vectores rAAV divulgados, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar los uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno, disfunción, lesión, afección anormal o traumatismo en el mamífero. En el caso de los vectores basados en rAAV3, dichas condiciones anormales incluyen preferentemente una o más enfermedades del hígado del mamífero, incluyendo, por ejemplo, CHC; en el caso de los vectores basados en rAAV8, dichas condiciones anormales incluyen preferentemente una o más enfermedades del ojo del

30 mamífero; o, en el caso de los vectores de rAAV6, una o más enfermedades de células madre, células sanguíneas, células hematopoyéticas o células CD35⁺, incluyendo, por ejemplo, enfermedad de células falciformes, β -talasemia y similares.

También se describe un método para transducir a una población de células de mamífero. En un sentido general, el método incluye al menos la etapa de introducir en una o más células de la población, una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más de los vectores de rAAV divulgados en el presente documento.

En un aspecto adicional, se describen segmentos de ácido nucleico aislados que codifican una o más proteínas de la cápside VP3 mutantes como se describen en el presente documento y proporciona vectores recombinantes,

40 partículas víricas, viriones infecciosos y células hospedadoras aisladas que comprenden una o más de las secuencias de vector mejoradas descritas y probadas en el presente documento.

Adicionalmente, se divulgan composiciones, así como kits terapéuticos y/o diagnósticos que incluyen uno o más de los vectores divulgados o las composiciones de AAV, formuladas con uno o más ingredientes adicionales o

45 preparados con una o más instrucciones para su uso.

La divulgación también proporciona métodos para marcar, así como métodos para usar de diversos modos los vectores rAAV mejorados con la cápside mutada divulgados, incluyendo, por ejemplo, aplicaciones, metodologías, procedimientos diagnósticos y/o regímenes de terapia génica *in situ*, *in vitro* e *in vivo*. Debido a que muchos de los

50 vectores mejorados descritos en el presente documento son resistentes a la degradación por el proteasoma, poseen eficacias de transducción significativamente mejoradas *in vivo*, lo que los hace particularmente adecuados para regímenes de terapia génica en humanos basada en vectores y en particular, para suministrar una o más construcciones genéticas a células de mamífero seleccionadas *in vivo* y/o *in vitro*.

En un aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden vectores de virus adenoasociados (AAV), viriones, partículas víricas y formulaciones farmacéuticas de los mismos, útiles en métodos para suministrar material genético que codifica uno o más productos beneficiosos o terapéuticos a células y tejidos de mamífero. En particular, las composiciones y los métodos proporcionan un avance significativo en la técnica mediante su uso en el tratamiento,

55 la prevención y/o la mejora de los síntomas de una o más enfermedades de mamíferos. Se contempla que la terapia génica en seres humanos se beneficiará particularmente de las presentes enseñanzas proporcionando nuevas y mejoradas construcciones de vector vírico para su uso en el tratamiento de una serie diversa de enfermedades, trastornos y disfunciones.

En otro aspecto, se divulga un vector rAAV modificado que codifica uno o más agentes terapéuticos para mamíferos para la prevención, tratamiento y/o mejora de uno o más trastornos en el mamífero al que se suministra la construcción de vector.

65

En particular, se proporcionan construcciones de expresión basadas en rAAV que codifican uno o más agentes terapéuticos para mamíferos (incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos, enzimas, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, así como variantes y/o fragmentos activos de los mismos, para su uso en el tratamiento, profilaxis y/o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad, disfunción, lesión y/o trastorno en mamíferos.

En un aspecto, se proporciona un vector de rAAV que comprende al menos una primera proteína de la cápside que comprende al menos una primera sustitución de aminoácidos a un aminoácido no nativo en uno o más restos de aminoácido expuestos en la superficie en una proteína de la cápside de rAAV y en donde el vector incluye adicionalmente al menos un primer segmento de ácido nucleico que codifica al menos un primer agente diagnóstico o terapéutico unido operativamente a un promotor capaz de expresar el segmento en una célula hospedadora que comprende la construcción de vector de expresión.

Los vectores de rAAV con aminoácidos expuestos en la superficie modificados pueden incluir además opcionalmente una o más secuencias potenciadoras que están unidas cada una al segmento de ácido nucleico. Las secuencias potenciadoras a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en un potenciador de CMV, un potenciador sintético, un potenciador específico de hígado, un potenciador específico vascular, un potenciador específico de cerebro, un potenciador específico de células neurales, un potenciador específico de pulmón, un potenciador específico de músculo, un potenciador específico de riñón, un potenciador específico de páncreas y un potenciador específico de células de islote.

Los promotores a modo de ejemplo útiles en el presente documento incluyen, sin limitación, uno o más promotores heterólogos, específicos de tejido, constitutivos o inducibles, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, un promotor seleccionado entre el grupo que consiste en un promotor de CMV, un promotor de β -actina, un promotor de insulina, un promotor de enolasa, un promotor de BDNF, un promotor de NGF, un promotor de EGF, un promotor de factor de crecimiento, un promotor específico de axones, un promotor específico de dendritas, un promotor específico de cerebro, un promotor específico de hipocampo, un promotor específico de riñón, un promotor de elafina, un promotor de citocinas, un promotor de interferón, un promotor de factor de crecimiento, un promotor de α_1 -antitripsina, un promotor específico de células cerebrales, un promotor específico de células neuronales, un promotor específico de células del sistema nervioso central, un promotor específico de células del sistema nervioso periférico, un promotor de interleucina, un promotor de serpina, un promotor de CMV híbrido, un promotor de β -actina híbrido, un promotor de EF1, un promotor de U1a, un promotor de U1b, un promotor inducible por Tet, un promotor de VP16-LexA o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones a modo de ejemplo, el promotor puede incluir un promotor de β -actina de mamífero o aviar.

El primer segmento de ácido nucleico también puede incluir además una o más secuencias de regulación postranscripcional o una o más señales de poliadenilación, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de las marmotas, una señal de poliadenilación o cualquier combinación de los mismos.

Los agentes diagnósticos o terapéuticos a modo de ejemplo que pueden suministrarse a células hospedadoras mediante las presentes construcciones de vector incluyen, pero sin limitación, un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, una ribozima, un ácido nucleico péptido, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido y cualquier combinación de los mismos.

En aspectos a modo de ejemplo, los vectores de rAAV mejorados codificarán preferentemente al menos una proteína o polipéptido diagnóstico o terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en un marcador molecular, un agonista adrenérgico, un factor antiapoptótico, un inhibidor de la apoptosis, un receptor de citocinas, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una descarboxilasa del ácido glutámico, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor de factor de crecimiento, una hormona, un receptor de hormonas, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, una cinasa, un inhibidor de cinasas, un factor de crecimiento nervioso, una netrina, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, un factor neurogénico, un receptor de factor neurogénico, una neuropilina, un factor neurotrófico, una neurotrofina, un receptor de neurotrofina, un antagonista de N-metil-D-aspartato, una plexina, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasas, una proteína proteolítica, un inhibidor de proteínas proteolíticas, una semaforina, un receptor de semaforina, una proteína transportadora de serotonina, un inhibidor de la captación de serotonina, un receptor de serotonina, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral y cualquier combinación de los mismos.

En determinadas aplicaciones, los vectores rAAV con la cápside modificada pueden incluir uno o más segmentos de ácido nucleico que codifican un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en BDNF, CNTF, CSF, EGF, FGF, G-SCF, GM-CSF, gonadotropina, IFN, IFG-1, M-CSF, NGF, PDGF, PEDF, TGF, TGF-B2, TNF, VEGF, prolactina, somatotropina, XIAP1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-10(187A), IL-10 viral, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 y cualquier combinación de los mismos.

También se describen en el presente documento vectores rAAV con eficacia de transducción mejorada modificados genéticamente que incluyen al menos un primer segmento de ácido nucleico que codifica uno o más agentes terapéuticos para alterar, inhibir, reducir, prevenir, eliminar o conferir la actividad de uno o más procesos biológicos endógenos en la célula. En aspectos particulares, dichos agentes terapéuticos pueden ser aquellos que inhiben o reducen de manera selectiva los efectos de uno o más procesos, disfunciones, trastornos o enfermedades metabólicos. En determinadas realizaciones, el defecto puede estar provocado por una lesión o traumatismo en el mamífero para el que se desea dicho tratamiento. En otros aspectos, el defecto puede estar causado por la sobreexpresión de un compuesto biológico endógeno, mientras que en otras realizaciones más, el defecto puede estar provocado por el defecto en la expresión o incluso la ausencia de uno o más compuestos biológicos endógenos.

Cuando se contempla el uso de dichos vectores para la introducción de una o más proteínas, polipéptidos, péptidos, ribozimas, ARNpi y/u oligonucleótidos antisentido exógenos, a una célula transfectada con el vector, se pueden emplear los vectores AAV modificados divulgados en el presente documento incorporando en el vector al menos un primer polinucleótido exógeno posicionado operativamente cadena abajo y bajo el control de al menos un primer promotor endógeno que expresa el polinucleótido en una célula que comprende el vector para producir el agente terapéutico codificado, incluyendo, por ejemplo, péptidos, proteínas, polipéptidos, anticuerpos, ribozimas, ARNpi y oligo o polinucleótidos antisentido.

Los vectores y sistemas de expresión de rAAV genéticamente modificados también pueden incluir además opcionalmente un segundo segmento de ácido nucleico distinto que comprende, consiste esencialmente en o consiste en, uno o más potenciadores, uno o más elementos reguladores, uno o más elementos transcripcionales o cualquier combinación de los mismos, que alteran, mejoran, regulan y/o afectan a la transcripción de la secuencia de nucleótido de interés expresada por los vectores rAAV modificados.

Por ejemplo, los vectores rAAV pueden incluir además un segundo segmento de ácido nucleico que comprende, consiste esencialmente en o consiste en, un potenciador de CMV, un potenciador sintético, un potenciador específico de células, un potenciador específico de tejido o cualquier combinación de los mismos. El segundo segmento de ácido nucleico además también puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en, una o más secuencias intrónicas, uno o más elementos reguladores postranscripcionales o cualquier combinación de los mismos.

Los vectores y los sistemas de expresión mejorados también pueden incluir adicionalmente un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en, uno o más polienlazadores, sitios de restricción y/o regiones de clonación múltiple para facilitar la inserción (clonación) de uno o más elementos genéticos, genes de interés o construcciones terapéuticas o diagnósticas seleccionados en el vector rAAV en un sitio seleccionado dentro del vector.

En aspectos adicionales, los polinucleótidos exógenos que pueden suministrarse en células hospedadoras adecuadas mediante los vectores rAAV mejorados con la cápside modificada divulgados en el presente documento son preferentemente originarios de mamíferos, con polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos o péptidos de origen humano, primate no humano, porcino, bovino, ovino, felino, canino, equino, epino, caprino o lupino que se prefieran particularmente.

Los polinucleótidos exógenos que pueden suministrarse a las células hospedadoras mediante los vectores víricos con la cápside modificada pueden, en ciertas realizaciones, codificar una o más proteínas, uno o más polipéptidos, uno o más péptidos, una o más enzimas o uno o más anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) o como alternativa, pueden expresar uno o más ARNip, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, moléculas de PNA o cualquier combinación de los mismos. Cuando se desean terapias génicas combinadas, pueden producirse dos o más moléculas diferentes a partir de un solo sistema de expresión de rAAV o como alternativa, puede transfectarse una célula hospedadora seleccionada con dos o más sistemas de expresión de rAAV únicos, pudiendo comprender cada uno de ellos uno o más polinucleótidos distintos que codifican un agente terapéutico.

En otros aspectos, también se divulgan vectores rAAV con la cápside modificada que están comprendidos dentro de una partícula de virus adenoasociado o un virión, así como pluralidades de dichos viriones o partículas infecciosas. Dichos vectores y viriones pueden estar comprendidos en uno o más diluyentes, tampones, soluciones fisiológicas o vehículos farmacéuticos o formularse para su administración a un mamífero en uno o más regímenes diagnósticos, terapéuticos y/o profilácticos. Los vectores, partículas víricas, viriones y pluralidades de la presente invención también pueden proporcionarse en formulaciones de excipientes que son aceptables para administración a ganado, animales exóticos, animales domesticados y a animales de compañía seleccionados (incluyendo mascotas y similares), así como a primates no humanos, especímenes de zoológico u otros en cautividad y similares.

También se divulgan células hospedadoras que comprenden al menos uno de los vectores de expresión de rAAV con la proteína de la cápside modificada o una o más partículas víricas o viriones que comprenden dicho vector de expresión. Dichas células hospedadoras son, en particular, células de mamífero, prefiriéndose especialmente las células hospedadoras humanas y pueden encontrarse aisladas, en cultivo celular o en cultivo tisular. En el caso de

los modelos animales genéticamente modificados, las células hospedadoras transformadas pueden estar incluso comprendidas dentro del cuerpo de un animal no humano en sí.

En ciertos aspectos, también se contempla que la creación de células hospedadoras no humanas recombinantes y/o de células hospedadoras humanas recombinantes aisladas que comprenden uno o más de los vectores de rAAV divulgados es útil para varios protocolos diagnósticos y de laboratorio, incluyendo, por ejemplo, medios para la producción de cantidades a gran escala de los vectores de rAAV divulgados en el presente documento. Se contempla particularmente que dichos métodos de producción de virus son una mejora frente a las metodologías existentes que incluyen, en particular, aquellas que requieren títulos muy elevados de las soluciones madre de virus para ser útiles como herramienta de terapia génica. Los inventores contemplan que una ventaja muy significativa de los presentes métodos será la capacidad para utilizar bajos títulos de partículas víricas en los protocolos de transducción en mamíferos, y aun así conservar las tasas de transfección a un nivel adecuado.

Las composiciones que comprenden uno o más de los vectores de rAAV, sistemas de expresión, partículas de AAV infecciosas con la cápside modificada y eficacia de la transducción o células hospedadoras también forman parte de la presente divulgación y en particular, aquellas composiciones que comprenden al menos un primer excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en terapia y para su uso en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de una o más enfermedades, trastornos, disfunciones o traumatismos en mamíferos. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender además opcionalmente uno o más diluyentes, tampones, liposomas, un lípido, un complejo lipídico; o los vectores de rAAV modificados en la tirosina pueden estar comprendidos dentro de una microesfera o una nanopartícula.

Se prefieren particularmente formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección intramuscular, intravenosa o directa en un órgano o tejido o una pluralidad de células o tejidos de un ser humano u otro mamífero, sin embargo, las composiciones divulgadas en el presente documento también pueden ser útiles en la administración a áreas concretas del organismo del mamífero, incluyendo, por ejemplo, formulaciones que son adecuadas para inyección directa en uno o más órganos, tejidos o tipos celulares dentro del organismo. Dichos sitios de inyección incluyen, pero sin limitación, el cerebro, una articulación o cápsula articular, un tejido sinovial o subsinovial, tendones, ligamentos, cartílagos, hueso, músculo periarticular o un espacio articular de una articulación de mamífero, así como administración directa a un órgano, tal como el corazón, hígado, pulmón, páncreas, intestino, cerebro, vejiga, riñón u otro sitio dentro del cuerpo del paciente, incluyendo, por ejemplo, introducción de los vectores víricos mediante administración intraabdominal, intratorácica, intravascular o intracerebroventricular.

Otros aspectos de la divulgación se refieren a partículas de virión de virus adenoasociados recombinantes, a composiciones y a células hospedadoras que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en, uno o más de los vectores rAAV con la cápside modificada y eficacia de transducción mejorada divulgados en el presente documento, tales como, por ejemplo, formulaciones farmacéuticas de los vectores previstas para la administración a un mamífero por medios adecuados, tales como, mediante inyección intramuscular, intravenosa, intraarticular o directa a una o más células, tejidos u órganos de un mamífero seleccionado. Normalmente, dichas composiciones pueden formularse con excipientes farmacéuticamente aceptables, como se describe más adelante en el presente documento y pueden comprender uno o más liposomas, lípidos, complejos lipídicos, microesferas o formulaciones de nanopartículas para facilitar la administración a los órganos, tejidos y células seleccionados para los que se desea la terapia.

También se proporcionan kits que comprenden uno o más de los vectores rAAV con la cápside modificada divulgados (así como uno o más viriones, partículas víricas, células hospedadoras transformadas o composiciones que comprenden dichos vectores) e instrucciones para usar dichos kits en una o más realizaciones clínicas terapéuticas, diagnósticas y/o profilácticas. Dichos kits pueden comprender además uno o más reactivos, enzimas de restricción, péptidos, agentes terapéuticos, compuestos farmacéuticos o medios para el suministro de las composiciones a células hospedadoras o a un animal (por ejemplo, jeringas, inyectables y similares). Los kits a modo de ejemplo incluyen aquellos para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad, deficiencia, disfunción y/o lesión o pueden incluir componentes para la producción a gran escala de los vectores víricos en sí, tal como para venta comercial o para su uso por terceros, incluyendo, por ejemplo, virólogos, profesionales médicos y similares.

Otro aspecto importante de la divulgación se refiere a métodos de uso de los vectores rAAV, viriones, sistemas de expresión, composiciones y células hospedadoras descritas en el presente documento en la preparación de medicamentos para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar al menos uno o más síntomas de una enfermedad, una disfunción, un trastorno, una afección anormal, una deficiencia, lesión o traumatismo en un animal y en particular, en un mamífero vertebrado. Dichos métodos implican generalmente administrar a un mamífero que lo necesite, uno o más de los vectores, viriones, partículas virales, células hospedadoras, composiciones o pluralidades de los mismos divulgados, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para diagnosticar, prevenir, tratar o aliviar uno o más de los síntomas de dicha enfermedad, disfunción, trastorno, afección anormal, deficiencia, lesión o traumatismo en el animal afectado. Los métodos también pueden abarcar el tratamiento profiláctico de animales que se sospecha que tienen dichas afecciones o la administración de dichas composiciones a aquellos animales en riesgo de desarrollar dichas afecciones, ya sea después del diagnóstico o antes de la aparición de los síntomas.

Como se ha descrito anteriormente, el polinucleótido exógeno codificará preferentemente una o más proteínas, polipéptidos, péptidos, ribozimas u oligonucleótidos antisentido o una combinación de estos. De hecho, el polinucleótido exógeno puede codificar dos o más de dichas moléculas o una pluralidad de dichas moléculas, según se desee. Cuando se desean terapias génicas combinadas, pueden producirse dos o más moléculas diferentes a partir de un solo sistema de expresión de rAAV o como alternativa, puede transfectarse una célula hospedadora seleccionada con dos o más sistemas de expresión de rAAV únicos, cada una de las cuales proporcionará polinucleótidos heterólogos únicos que codifican al menos dos de dichas moléculas diferentes.

También se divulgan composiciones que comprenden uno o más de los vectores rAAV, sistemas de expresión, partículas de AAV infecciosas y células hospedadoras y en particular, aquellas composiciones que comprenden además al menos un primer excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en la fabricación de medicamentos y métodos que implican la administración terapéutica de dichos vectores rAAV. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender además opcionalmente liposomas, un lípido, un complejo lipídico; o los vectores de rAAV pueden estar comprendidos dentro de una microesfera o una nanopartícula. Se prefieren particularmente formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección intramuscular, intravenosa o directa en un órgano o tejido de un ser humano.

También se divulgan métodos de uso de los vectores, viriones, sistemas de expresión, composiciones y células hospedadoras divulgados descritos en el presente documento, en la preparación de medicamentos para tratar o aliviar los síntomas de diversas deficiencias de polipéptidos en un mamífero. Dichos métodos implican generalmente administrar a un mamífero o ser humano que lo necesite, uno o más de los vectores, viriones, células hospedadoras o composiciones divulgados, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar los síntomas de dicha deficiencia en el mamífero afectado. Los métodos también pueden abarcar el tratamiento profiláctico de animales que se sospecha que tienen dichas afecciones o la administración de dichas composiciones a aquellos animales en riesgo de desarrollar dichas afecciones, ya sea después del diagnóstico o antes de la aparición de los síntomas.

Breve descripción de los dibujos

Para facilitar la comprensión de los principios de la invención, a continuación se hará referencia a las realizaciones o los ejemplos, ilustrados en los dibujos y se usará un lenguaje específico para describir a los mismos. Sin embargo, ha de entenderse que no se pretende con estos limitar el alcance de la invención.

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la divulgación. La divulgación puede entenderse mejor por referencia a la siguiente descripción, tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que las referencias numéricas iguales identifican elementos iguales y en los que:

Las FIG. 1A, FIG. 1B, y FIG. 1C muestran el efecto de los inhibidores y activadores de la vía de NF- κ B en la expresión de EGFP mediada por vector AAV en células HeLa *in vitro*. Las células se pretrataron con diversas concentraciones de inhibidores y activadores durante 12 h y se transdujeron con 2×10^3 vgs de AAV-EGFP por célula. La FIG. 1A muestra la expresión de transgén detectada mediante microscopía de fluorescencia 48 h después de la infección. Se muestran imágenes representativas. La FIG. 1B muestra análisis cuantitativos de los datos de la FIG. 1A. Se analizaron como se describe las imágenes de cinco campos visuales. $*P < 0,001$. La FIG. 1C es un análisis de transferencia de Western de extractos de células HeLa transducidas con vectores scAAV y en presencia de moduladores de NF- κ B. Las muestras se analizaron usando anticuerpos anti-p65 y anti-I κ B [vía clásica], anticuerpo anti-p100/p52 [vía no clásica] para la detección de la señalización de NF- κ B en respuesta a la exposición a AAV. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes;

Las FIG. 2A y FIG. 2B muestran la transducción mediada por vector AAV-EGFP de células dendríticas derivadas de monocitos primarios humanos en presencia de moduladores de NF- κ B. La FIG. 2A muestra la expresión de transgén detectada mediante citometría de flujo 48 h después de la transducción. La FIG. 2B es un análisis de transferencia de Western para componentes de la vía clásica y no clásica de activación de NF- κ B en extractos nucleares de células dendríticas, transducidas de manera simulada o transducidas con 2.000 vgs/célula de vectores scAAV y en presencia de moduladores de NF- κ B;

Las FIG. 3A y FIG. 3B muestran la respuesta innata y de NF- κ B inducida por el vector AAV en ratones *in vivo*. Se llevo a cabo un perfil de la expresión génica de mediadores innatos (FIG. 3A) o de la activación de NF- κ B (FIG. 3B) como se ha descrito. Se muestran los múltiplos de cambio de los datos en la expresión génica en el punto de tiempo de 2 h comparando los vectores AAV con Bay11 (líneas discontinuas o abiertas) con los vectores AAV sin Bay11 (barras negras o grises). El umbral mínimo de múltiplo de aumento (línea negra horizontal) fue de 2,5 (FIG. 3A) o 3,0 (FIG. 3B) midiendo la variabilidad de Δ CT duplicados (en comparación con GAPDH, $2^{\Delta\Delta\text{CT}(\text{variabilidad})}$).

Las FIG. 4A y FIG. 4B ilustran la expresión de transgenes en hepatocitos murinos 10 días después de la inyección de 1×10^{11} vgs de cada uno de los vectores WT-scAAV-EGFP o TM-scAAV-EGFP/animal a través de la vena caudal. La FIG. 4A muestra imágenes representativas. Ampliación original: x400. La FIG. 4B muestra los análisis cuantitativos de los datos de la FIG. 4A. Se analizaron cuantitativamente las imágenes de cinco campos

visuales como se describe en la leyenda de la **FIG. 1A**;

La **FIG. 5** demuestra que el genoma de AAV contiene supuestos sitios de unión para factores de transcripción sensibles a NF- κ B dentro de las repeticiones terminales invertidas (ITR). Los supuestos sitios de unión de factor de transcripción sensibles a NF- κ B en las ITR de AAV se identificaron mediante análisis *in silico* usando la base de datos web TRANSFAC. Se anotaron los sitios de unión para los factores de transcripción p300, TFIIIB y Sp1 con fuente subrayada en verde, rojo y azul, respectivamente. La secuencia recuadrada representa la D-secuencia de 20 nucleótidos monocatenaria dentro del ITR;

Las **FIG. 6A, FIG. 6B, FIG. 6C, FIG. 6D, y FIG. 6E** muestran el efecto de los activadores e inhibidores de NF- κ B en la expresión transgénica a partir de un vector AAV2-EGFP en células HeLa *in vitro*. Las células se trataron de manera simulada o se pretrataron con diversas combinaciones de inhibidores y activadores durante 12 h. Las células lavadas se infectaron con 2×10^3 vg/célula de scAAV2-EGFP (**FIG. 6A**), ssAAV2-EGFP (**FIG. 6B**), o TM-scAAV2-EGFP (**FIG. 6C**). La detección de transgén se detectó mediante microscopía de fluorescencia 48 h después de la infección. Se muestran imágenes representativas; Análisis de transferencia de Western de extractos citoplasmáticos (**FIG. 6D**) y nucleares (**FIG. 6E**) de células HeLa transducidas con vectores scAAV y en presencia de moduladores de NF- κ B. Las muestras se analizaron usando anticuerpo anti-p100/p52 para la detección de la señalización de NF- κ B. Se usaron anticuerpos anti-GADPH y lamina B como controles adecuados. Estos resultados son representativos de dos experimentos independientes;

La **FIG. 7** muestra un análisis de transferencia de tipo Western de homogeneizados de hígado de ratones después de las inyecciones de tratamiento simulado ($n = 2$) o de inyecciones con vectores scAAV, con y sin administración previa de Bay11 ($n = 3$ cada uno). Las muestras se analizaron usando anticuerpo anti-p52 para la detección de la señalización de NF- κ B en respuesta a la exposición a AAV. Se usó anticuerpo anti- β -actina como control de carga;

Las **FIG. 8A, FIG. 8B, FIG. 8C, FIG. 8D, FIG. 8E y FIG. 8F** muestran los múltiplos de cambio en la expresión génica de diversas citocinas/quimiocinas a partir de ARNm total recogido de muestras de hígado de animales a los que se inyectan los vectores WT-AAV o TM-AAV, después del pretratamiento con PBS o Bay11. **FIG. 8A**: IL-1 α ; **FIG. 8B**: IL-6; **FIG. 8C**: TNF- α ; **FIG. 8D**: IL-12 α ; **FIG. 8E**: KC; y **FIG. 8F**: RANTES. Los valores son significativos por encima de 2,6 y por debajo de 0,38; se calculan determinando la variabilidad en las placas de 96 pocillos usadas para medir la expresión génica específica;

La **FIG. 9** demuestra la respuesta humoral a vectores AAV en ausencia o presencia de inhibidor de NF- κ B. Se determinaron los niveles de IgG2a anti-AAV2 en sangre periférica de ratones en el día 10 después de las inyecciones de vectores scAAV, con y sin administración previa de Bay11 ($n = 4$ cada uno);

La **FIG. 10** ilustra ensayos de cambio en la movilidad electroforética llevados a cabo con extractos de células completas preparados a partir de células HeLa y sonda de secuencia D[+] monocatenaria marcada con 32 P (carril 1), que interactuaron con una proteína de célula hospedadora (carril 3, punta de flecha). Se usó la sonda de secuencia D[-] monocatenaria (carril 2) como control adecuado, que también interactuó con una proteína celular, FKBP52 (carril 4, flecha). También se llevaron a cabo ensayos de unión usando sonda de secuencia mCD[+] marcada con biotina seguido de selección con perlas de estreptavidina y fraccionamiento mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La banda de proteína relevante se visualizó con tinción de plata, se cortó del gel y se sometió a espectrometría de masas y se observó que uno de los péptidos únicos compartía homología con el factor de represión de NF- κ B (NRF);

Las **FIG. 11A y FIG. 11B** muestran el análisis de la expresión de transgén mediada por AAV3 en células T47D y T47D+hHGFR. La **FIG. 11A** muestra que números equivalentes de células T47D y T47D+hHGFR se infectaron con diversas multiplicidades de infección (MOI) indicadas de vectores scAAV3-CBAP-EGFP en condiciones idénticas. La expresión del transgén se determinó mediante microscopía de fluorescencia 72 h después de la infección. La **FIG. 11B** muestra que las células T47D+hHGFR se transdujeron con 2.000 vgs/célula de vectores scAAV3 en ausencia o presencia de 5 μ g/ml de hHGF. La expresión del transgén se determinó mediante microscopía de fluorescencia 72 h después de la infección;

Las **FIG. 12A, FIG. 12B y FIG. 12C** muestran el efecto de BMS-777607 en la expresión de transgén mediada por AAV3. La **FIG. 12A** muestra células T47D+ hHGFR, tratadas de manera simulada o tratadas con diversas concentraciones de BMS-777607, que se infectaron con 2.000 vgs/célula de vectores scAAV3-CBAP-EGFP. La expresión del transgén se determinó mediante microscopía de fluorescencia 72 h después de la infección. La **FIG. 12B** ilustra células T47D y T47D+hHGFR que se infectaron con 10.000 vgs/célula de vectores scAAV3-CBAP-EGFP en ausencia o presencia de BMS-777607 1 μ M. La **FIG. 12C** muestra células T47D y T47D+hHGFR que se trataron de manera simulada o se pretrataron con BMS-777607 durante dos horas. Se prepararon lisados de células completas y se analizaron en transferencias de Western usando diversos anticuerpos primarios indicados. Como control de carga, se usó β -actina;

Las **FIG. 13A y FIG. 13B** muestran el efecto de BMS-777607 en la expresión de transgén mediada por diversos serotipos de AAV. En la **FIG. 13A**, se infectó a células T47D+ hHGFR tanto tratadas de manera simulada como tratadas con BMS-777607 1 μ M con 2.000 vgs/célula de vectores scAAV2-, scAAV3- o scAAV4-CBAP-EGFP. En la **FIG. 13B**, se infectó a células T47D+ hHGFR tanto tratadas de manera simulada como tratadas con BMS-777607 1 μ M con 2.000 vgs/célula de vectores scAAV5-, scAAV5-, scAAV7-, scAAV8 o scAAV9-CBAP-EGFP. La expresión del transgén se determinó mediante microscopía de fluorescencia 72 h después de la infección;

Las **FIG. 14A, FIG. 14B, FIG. 14C y FIG. 14D** muestran los análisis comparativos de la eficiencia de transducción mediada por AAV3 en células Huh7 y Hep293TT con o sin tratamiento con MG132. En la **FIG. 14A**, se infectó a células HeLa tanto tratadas de manera simulada como tratadas con MG132 5 μ M con vectores scAAV2-CBAP-EGFP. En la **FIG. 14B**, se infectó a células Huh7 y Hep293TT, tratadas de manera simulada o tratadas con

diversas concentraciones de MG132, con vectores scAAV3-WT-CBAp-EGFP. En la **FIG. 14C**, se infectó a células HeLa tanto tratadas de manera simulada como tratadas con Tyr23 200 μ M con vectores scAAV2-CBAp-EGFP. En la **FIG. 14D**, se infectó a células Hep293TT, tanto tratadas de manera simulada como tratadas con Tyr23 con vectores scAAV3-CBAp-EGFP. La expresión del transgén se determinó 72 h después de la transducción;

Las **FIG. 15A**, **FIG. 15B** y **FIG. 15C** muestran los análisis de mutación dirigida al sitio de restos de tirosina expuestos en la superficie en cápsides de AAV3. Se transdujeron células Huh7 con vectores WT o F501Y scAAV3-CBAp-EGFP en condiciones idénticas y la expresión del transgén se determinó 72 h después de la transducción. Se muestra la eficacia de la transducción de la expresión de transgén mediada por WT (**FIG. 15A**) y diversos Y-F scAAV3 en células Huh7 (**FIG. 15B**) y Hep293TT (**FIG. 15C**). La expresión del transgén se determinó 72 h después de la transducción;

Las **FIG. 16A**, **FIG. 16B** y **FIG. 16C** ilustran la eficacia de la transducción de vectores WT y mutantes individuales, dobles y triples de AAV3. En la **FIG. 16A**, se transdujeron células Huh7 con vectores WT o varios vectores scAAV3-CBAp-EGFP mutantes en Y-F en condiciones idénticas. La expresión del transgén se determinó 72 h después de la transducción. En la **FIG. 16B**, Se transdujeron células Huh7 con 5.000 vgs/célula de vectores WT o scAAV3 mutantes en Y→F en ausencia o presencia de 5 μ g/ml de hHGF. La **FIG. 16C** muestra la expresión de transgén determinada mediante microscopía de fluorescencia 72 h después de la infección;

Las **FIG. 17A**, **FIG. 17B**, **FIG. 17C** y **FIG. 17D** muestran la eficacia de transducción de vectores AAV3 *in vivo* después de inyecciones intratumorales directas. Se muestra la eficacia de transducción de vectores WT-AAV3 en tumores derivados de Huh7 (**FIG. 17A**) y Hep293TT (**FIG. 17B**) en ratones NSG. También se muestra la eficacia de transducción de vectores WT- (**FIG. 17C**) y Y705+731F-AAV3 (**FIG. 17D**) en tumores derivados de Hep293TT en ratones NSG. Se muestra la fluorescencia de la tinción con EGFP (verde) y DAPI (azul) de dos secciones de tumor representativas de cada conjunto de ratones;

Las **FIG. 18A**, **FIG. 18B** y **FIG. 18C** ilustran la eficacia de transducción de vectores WT y Y705+731F-AAV3 en tumores derivados de Hep293TT en ratones NSG después de inyecciones en la vena caudal. Se muestra la fluorescencia de la tinción con EGFP (verde) y DAPI (azul) del tumor en tres secciones representativas de cada conjunto de ratones a los que se inyectó PBS (**FIG. 18A**), vectores WT-AAV3 (**FIG. 18B**), o vectores Y705+731F-AAV3 (**FIG. 18C**);

Las **FIG. 19A** y **FIG. 19B** muestran el efecto de varios inhibidores de cinasa en la expresión de EGFP mediada por ssAAV y scAAV en células HEK293. Las células se pretrataron con inhibidores durante 1 h antes de la infección y después se transdujeron con 1×10^3 vgs/célula. En la **FIG. 19A**, la expresión del transgén se detectó mediante microscopía de fluorescencia 48 h después de la infección. En la **FIG. 19B**, se analizaron del modo descrito imágenes de tres campos visuales. * $P < 0,005$, ** $P < 0,001$ frente a WT AAV2;

Las **FIG. 20A** y **FIG. 20B** muestran el análisis de la expresión de EGFP después de la transducción de células HEK293 con mutantes con mutación dirigida al sitio de la cápside de scAAV2. Se sustituyó cada una de las 15 serinas (S) expuestas en la superficie en la cápside de AAV2 con valina (V) y después se evaluó su eficacia para mediar la expresión del transgén. La **FIG. 20A** muestra el análisis de la expresión de EGFP a las 48 h después de la infección a una MOI de 1×10^3 vgs/célula. La **FIG. 20B** muestra la cuantificación de la eficacia de la transducción de cada uno de los vectores AAV2 con mutaciones de serina. * $P < 0,005$, ** $P < 0,001$ frente a WT AAV2;

Las **FIG. 21** y **FIG. 21B** ilustran la estructura de AAV2. En la **FIG. 21A**, se muestra un trímero de VP3 de AAV2 en representación de lazo y visto en el eje triple icosaédrico (izquierda) y rotado 90° (derecha) con los monómeros de VP colorados en azul, púrpura y azul claro mostrando la ubicación de los restos de serina 458, 492 y 662 en las esferas amarilla, verde y roja, respectivamente. Las posiciones aproximadas de los ejes icosaédricos dobles, triples y quintuples se representan por el óvalo, el triángulo y el pentágono rellenos, respectivamente. En la **FIG. 21B**, la superficie de la cápside de AAV2 se muestra en color azul como los restos de serina 458, 492 y 662 se resalta en los mismos colores, como se ha mostrado anteriormente en figuras similares. Los restos S458 y S492 están ubicados adyacentes entre sí en la superficie externa de las protrusiones que apuntan hacia la depresión que rodea a los ejes dobles. S662 está ubicada en el bucle HI (coloreado en blanco) entre las hebras β -H y β -I del barril beta central de ocho cadenas) que se encuentra en la parte inferior de la depresión que rodea a los ejes icosaédricos quintuples. Los bucles DE relacionados con la simetría quintuple (entre las hebras β -D y β -E), que forman el canal en los ejes icosaédricos quintuples, se muestran en color marrón. Las posiciones aproximadas de los ejes icosaédricos dobles (2F), triples (3F) y quintuples (5F) se indican por las flechas abiertas;

Las **FIG. 22A** y **FIG. 22B** resumen la evaluación del efecto de la sustitución de serina en la posición 662 en la cápside de scAAV2 con diferentes aminoácidos para mediar la expresión de transgén. Se generaron los ocho mutantes de serina con diferentes aminoácidos a continuación: S662→Valina (V), S662→Alanina (A), S662→Asparagina (N), S662→Ácido aspártico (D), S662→Histidina (H), S662→Isoleucina (I), S662→Leucina (L) y S662→Fenilalanina (F) y se analizó su eficacia de transducción en células 293. La **FIG. 22A** muestra el análisis de expresión de EGFP a las 48 h después de la infección de células 293 a una MOI de 1×10^3 vgs/célula. La **FIG. 22B** muestra la cuantificación de la eficacia de la transducción de cada uno de los vectores AAV2 con mutaciones de serina. * $P < 0,005$, ** $P < 0,001$ frente a WT AAV2;

Las **FIG. 23A** y **FIG. 23B** muestran el análisis de la correlación de la eficacia de la transducción de los vectores scAAV2-S662V con la actividad de p38 MAPK en diversos tipos celulares. La **FIG. 23A** ilustra la cuantificación de la eficacia de transducción de los vectores WT- y S662V-AAV2 en HEK293, HeLa, NIH3T3, H2.35 y moDC. La **FIG. 23B** es un análisis de transferencia de Western de lisados de diferentes líneas celulares respecto de los niveles de expresión de p-p38 MAPK. Se midieron los niveles totales de p38 MAPK y GADPH y se usaron como

controles de carga. * $P < 0,005$, ** $P < 0,001$ frente a WT AAV2;

Las **FIG. 24A**, **FIG. 24B** y **FIG. 24C** ilustran la expresión de transgén mediada por el vector scAAV en células dendríticas derivadas de monocitos (moDC). La **FIG. 24A** ilustra el efecto de inhibidores de JNK y p38 MAPK y la sustitución dirigida al sitio del resto de serina en la posición 662 en la expresión de EGFP. La **FIG. 24B** resume la cuantificación de los datos de la **FIG. 24A** a las 48 h después de la infección y del inicio de la maduración. La **FIG. 24C** es un análisis de la expresión de marcadores coestimuladores, tales como CD80, CD83, CD86 en moDC infectadas con vectores scAAV2-S662V a una MOI de 5×10^4 vgs/célula. Las iDC - células dendríticas inmaduras y las mDC - células dendríticas maduras, estimuladas con citocinas, generadas como se describe en el presente documento, se usaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Se muestra un ejemplo representativo. * $P < 0,005$, ** $P < 0,001$ frente a WT AAV2;

La **FIG. 25** ilustra el análisis de la actividad de eliminación de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para hTERT en células K562. Las CTL se generaron tras la transducción de moDC mediante vectores scAAV2-S662V que codifican la telomerasa humana truncada (hTERT). Las moDC transducidas con el vector scAAV2-S662V-EGFP se usaron para generar CTL no específicos. Teñidas previamente con 3,3-dioctadeciloxacarbocianina (DiOC18(3)), una tinción de membrana fluorescente verde, se cultivaron 1×10^5 células diana K562 durante una noche con diferentes proporciones de CTL (80:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1). Se añadió contratinción de ácido nucleico permeable a membrana, yoduro de propidio, para marcar las células con membranas plasmáticas comprometidas. Se analizaron por citometría de flujo los porcentajes de células eliminadas dobles positivas a la tinción;

Las **FIG. 26A** y **FIG. 26B** muestran el análisis de la expresión de EGFP después de la transducción de células HEK293 con mutantes con mutación dirigida al sitio de la cápside de AAV2. Se sustituyó cada uno de los 17 restos de treonina (T) expuestas en la superficie en la cápside de AAV2 con valina (V) y se evaluó su eficacia para mediar la expresión del transgén. En la **FIG. 26A**, se muestra el análisis de la expresión de EGFP a las 48 h después de la infección (MOI de 1×10^3 vg/célula). La **FIG. 26B** muestra la cuantificación de la eficacia de la transducción de cada uno de los vectores scAAV2 con mutaciones de treonina. * $P < 0,005$, ** $P < 0,001$ frente a WT AAV2;

Las **FIG. 27A** y **FIG. 27B** muestran el análisis de la expresión de EGFP en células HEK293 infectadas con múltiples mutantes con mutación dirigida al sitio de la cápside de AAV2. Se combinaron varias de las mutaciones de treonina más eficaces en la cápside de AAV2 individuales para producir dobles y triples mutantes y se evaluó la eficacia de cada vector. La **FIG. 27A** ilustra el análisis de la expresión de EGFP a las 48 h después de la infección a una MOI de 1×10^3 vg/célula. La **FIG. 27B** muestra la cuantificación de la eficacia de la transducción de cada uno de los vectores AAV2 con mutaciones de treonina. * $P < 0,005$, ** $P < 0,001$ frente a WT AAV2;

Las **FIG. 28A** y **FIG. 28B** demuestran la evaluación de la expresión de EGFP en células H2.35 transducidas con vectores AAV2 con la cápside optimizada. Se combinaron las mutaciones de tirosina, serina y treonina más eficaces en una sola cápside de AAV2 para producir varios mutantes de AAV optimizados. Se estimó la eficacia de cada vector en hepatocitos murinos inmortalizados. La **FIG. 28A** muestra el análisis de la expresión de EGFP a las 48 h después de la infección a una MOI de 1×10^3 vg/célula. La **FIG. 28B** resume la cuantificación de la eficacia de la transducción de cada uno de los vectores scAAV2 optimizados. * $P < 0,005$, ** $P < 0,001$ frente a WT AAV2;

Las **FIG. 29A** y **FIG. 29B** ilustran la cinética de expresión de EGFP en células H2.35 mediada por los vectores AAV con la cápside optimizada. La **FIG. 29A** muestra el análisis de la expresión de EGFP a las 16, 24 y 48 h después de la infección a una MOI de 1×10^3 vg/célula. La **FIG. 29B** ilustra los resultados de la cuantificación de la eficacia de la transducción de cada uno de los vectores scAAV2 optimizados. * $P < 0,005$, ** $p < 0,001$ frente a WT AAV2;

Las **FIG. 30A** y **FIG. 30B** muestran el análisis del tráfico intracelular de vectores AAV con múltiples mutaciones hacia el núcleo. Se separaron las fracciones nucleares y citoplasmáticas de células H2.35 infectadas con AAV2-WT, AAV2-Y444F+Y500F+Y730F o el mutante múltiple AAV2-Y444F+Y500F+Y730F+T491V y se llevó a cabo un análisis qPCR para evaluar la distribución del genoma del vector dentro de las células a las 16 h (**FIG. 30A**) y las 48 h (**FIG. 30B**) después de la infección. ** Una $P < 0,001$ frente a WT en el núcleo se consideró significativa;

Las **FIG. 31A** y **FIG. 31B** muestran la obtención de imágenes *in vivo* de la expresión génica de luciferasa después de la inyección en la vena caudal de múltiples mutantes con mutación dirigida al sitio de la cápside de AAV2. Se inyectó a ratones C57BL/6 con 1×10^{10} vg/animal de varios de los vectores scAAV mutantes más eficaces que portan el gen de luciferasa. Se tomaron imágenes en vida para analizar la diferencia en la actividad de luciferasa. La salida visual representa el número de fotones emitidos/segundo/cm² como una imagen con color falso, donde el máximo es rojo y el mínimo es azul (**FIG. 31A**) y la intensidad de señal relativa (**FIG. 31B**) * $P < 0,005$ se consideró significativa;

Las **FIG. 32A** y **FIG. 32B** ilustran la superficie de la cápside de AAV2. La **FIG. 32A** muestra la superficie de la cápside de AAV2 (gris) con los 17 restos de treonina mutados en colores azul (251, 329, 330, 454, 503, 581, 592, 597, 660, 671, 701, 713, 716), verde (455), amarillo (491), marrón (550) y rosa (659). Se indica mediante flechas la ubicación en superficie de T329, T330, T713 y T716. Los bucles DE relacionados con la simetría quintuple (entre las hebras β D y β E) se representan en color naranja. Los bucles HI (entre las hebras β H y β I) se representan en color blanco y S662 ubicado en este bucle se representa en color rojo. El triángulo blanco rayado en la **FIG. 32A** representa una unidad vírica asimétrica unida mediante un eje quintuple y dos ejes triples con un eje doble entre los triples. Los óvalos rayados delimitan las huellas aproximadas (2/60) de los restos de treonina que afectan a la transducción cuando se mutan. La **FIG. 32B** muestra una proyección de "mapa" de los restos de la superficie de la cápside de AAV2 dentro de una unidad vírica asimétrica. Las áreas abarcadas por las

treoninas de la superficie de AAV2 y S662 se encuentran coloreadas como en la **FIG. 32A**. Los restos en los restos triples mutantes de tirosina 444, 500 y 730 se muestran en tonalidades de púrpura. Los óvalos rayados se describen en la **FIG. 23A**. El triángulo rayado (azul) muestra restos previamente determinados como importantes en la unión al receptor de heparina sulfato para AAV2 y AAV6 (Wu *et al.*, 2006; Opie *et al.*, 2003);

Las **FIG. 33A**, **FIG. 33B** y **FIG. 33C** ilustran el alineamiento de aminoácidos de las cápsides de tipo silvestre de los serotipos AAV1 a AAV10. La **FIG. 33A** muestra el alineamiento de aminoácidos de las cápsides del serotipo AAV1-10 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10). La **FIG. 33B** muestra el alineamiento de aminoácidos de las cápsides del serotipo AAV1-AAV10 de tipo silvestre, así como de los restos de serina y treonina expuestos en la superficie que se conservan entre las cápsides de AAV1-AAV10 (los restos expuestos en la superficie conservados se muestran en negrita); y la **FIG. 33C** muestra los restos de tirosina conservados expuestos en la superficie en las cápsides de AAV1-AAV12 de tipo silvestre, así como realizaciones de modificaciones de aminoácidos. Los restos de tirosina conservados entre AAV1-AAV12 se muestran en negrita;

La **FIG. 34** muestra las eficacias de empaquetado y transducción de diversos vectores AAV2 con mutaciones de serina→valina en relación con el de vectores WT AAV2 y el alineamiento de aminoácidos de cápsides de AAV1-AAV10 de tipo silvestre;

La **FIG. 35** representa las eficacias de empaquetado y transducción de vectores mutantes en serina reemplazados con diversos aminoácidos en relación con vectores WT AAV2;

Las **FIG. 36A**, **FIG. 36B**, **FIG. 36C**, **FIG. 36D** y **FIG. 36E** muestran la eficacia de transducción de vectores rAAV3 y rAAV8 en tumores de HCC humanos en un modelo de xenoinjerto murino *in vivo*. Se usaron ratones NSG macho y hembra portadores de tumores Huh7 para la inyección en la vena caudal de los vectores rAAV3-CBAP-FLuc o rAAV8-CBAP-FLuc a 1×10^{11} vgs/ratón. $n = 4$ por grupo. La **FIG. 36A** muestra imágenes representativas del cuerpo completo del ratón. Se muestran imágenes de bioluminiscencia a los 3 días después de la administración del vector. La **FIG. 36B** ilustra el análisis cuantitativo de los datos de expresión de transgén de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo de ratones a los 3 días después de la administración del vector. La **FIG. 36C** muestra ratones NSG portadores de tumores Huh7 usados para inyecciones intratumorales directas con vectores rAAV3-CBAP-FLuc o rAAV8-CBAP-FLuc a una dosis menor de 1×10^{11} vgs/ratón (L) o a una dosis mayor de 1×10^{12} vgs/ratón (H). $n = 4$ por grupo. Se muestran imágenes representativas de la dosis menor a los 7 días después de la administración del vector. La **FIG. 36D** representa los datos cuantitativos para la expresión de transgenes en tumores e hígado de ratones a los que se inyectaron vectores rAAV3 o rAAV8 a los 3 días o 7 días después de la administración del vector. La **FIG. 36E** muestra los números de copias del genoma del vector que persisten en muestras de tejido hepático a las que se inyecta una dosis mayor de vectores rAAV3 o rAAV8 7 días después de la administración del vector;

Las **FIG. 37A**, **FIG. 37B**, **FIG. 37C**, **FIG. 37D**, **FIG. 37E** y **FIG. 37F** muestran la eficacia de la transducción de vectores rAAV3 WT y con la cápside modificada en células de cáncer hepático humano *in vitro*. La **FIG. 37A** muestra células Huh7 que se transdujeron con los vectores víricos indicados que portaban el casete de expresión CBAP-FLuc a 5.000 vgs/célula. La **FIG. 37B** muestra células HepG2 y la **FIG. 37C** muestra células Hep293TT que se transdujeron con los vectores víricos indicados que portaban el casete de expresión CBAP-EGFP a 5.000 vgs/célula. La **FIG. 37D** muestra células Huh7 que se transdujeron con los vectores víricos indicados que portaban el casete de expresión CBAP-EGFP a 5.000 vgs/célula tanto en ausencia como presencia de dosis bajas (100 ng/ml) o elevadas (100 µg/ml) de heparina soluble. La **FIG. 37E** muestra células Huh7 que se transdujeron con los vectores víricos indicados que portaban el casete de expresión CBAP-EGFP a 5.000 vgs/célula tanto en ausencia como presencia de 5 µg/ml de hHGF. La **FIG. 37F** muestra células T47D humanas o T47D+hHGFR que se transdujeron con los vectores víricos indicados que portaban el casete de expresión de CBAP-EGFP a 5.000 vgs/célula. Se determinaron los niveles de expresión de todos los transgenes 48 h después de la transducción;

Las **FIG. 38A**, **FIG. 38B**, **FIG. 38C** y **FIG. 38D** muestran la eficacia de transducción de vectores a modo de ejemplo rAAV3 con la cápside mutada *in vivo*. La **FIG. 38A** muestra ratones NSG portadores de tumores hepáticos humanos de Huh7 o Hep293TT que se usaron para inyecciones en la vena caudal con los vectores víricos mutantes indicados que portaban el casete de expresión CBAP-FLuc a 5×10^{10} vgs/ratón. $n = 4$ por cada grupo. En el día 3, se obtuvieron imágenes de bioluminiscencia del cuerpo completo, seguido de la disección tanto del tumor en crecimiento como del hígado normal. Se muestran imágenes representativas. La **FIG. 38B** muestra datos cuantitativos que muestran la expresión de FLuc en tumores derivados de Huh7 y Hep293TT. Se muestran los números de copias del genoma del vector en tumores de Huh7 (**FIG. 38C**), y en hígados normales (**FIG. 38D**);

Las **FIG. 39A**, **FIG. 39B** y **FIG. 39C** muestran realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención. La **FIG. 39A** muestra la supresión de la tumorigénesis hepática humana en un modelo de xenoinjerto de ratón mediante vectores rAAV3 optimizados que expresan el gen TCS; La **FIG. 39B** y **FIG. 39C** muestran los resultados de ratones portadores de tumores Huh7-FLuc que se usaron para inyecciones en la vena caudal de los vectores víricos indicados a 5×10^{10} vgs/ratón en el día 0 y se monitorizó el crecimiento tumoral con el paso del tiempo hasta el día 11. La **FIG. 39B** ilustra imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo representativas de ratones de ambos grupos en el día 8. La **FIG. 39C** resume las actividades en suero de AST y ALT que se midieron en ratones a los que se inyectó el vector rAAV3-TCS y el vector rAAV3-EGFP en el día 11 mediante métodos espectrofotométricos. Los datos se presentan como la media $\pm$ DE. ($n = 5$ /grupo);

Las **FIG. 40A**, **FIG. 40B** y **FIG. 40C** muestran construcciones de vector y de secuencias de polinucleótidos a modo de ejemplo útiles de acuerdo con un aspecto de la presente invención. La **FIG. 40A** muestra las estructuras esquemáticas de los vectores rAAV usados en estos estudios. HP: horquilla; D: secuencia D en la

repetición terminal invertida (ITR) de AAV; CBAP: potenciador de CMV/promotor de β -actina de pollo; FLuc: luciferasa de luciérnaga; hGH (A)n: secuencia de poliA de hormona de crecimiento humana; HP-: estructura de horquilla sin el sitio de resolución terminal (*trs*); EGFP: proteína verde fluorescente potenciada; AFPp: promotor de α -fetoproteína humana; TCS: Tricosantina; La FIG. 40B muestra la secuencia de nucleótidos del gen de TCS original. El codón de inicio (ATG) y el codón de parada (TAG) se muestran en fuente verde y roja, respectivamente. La FIG. 40C muestra la secuencia de nucleótidos del gen TCS marcado con FLAG. Se muestran los sitios para enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* usados para clonar el TCS sintetizado químicamente en letra cursiva y negrita, respectivamente, y la secuencia de marcador FLAG que contiene el codón de parada (TAA) se encuentra subrayada; y la FIG. 41 muestra la eficacia de transducción de diversos vectores scAAV3-CBAP-EGFP mutantes individuales, dobles y múltiples en la línea celular de CHC humano, Huh7.

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 1 de tipo silvestre (AAV1);
 la SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 2 de tipo silvestre (AAV2);
 la SEQ ID NO: 3 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 3 de tipo silvestre (AAV3);
 la SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 4 de tipo silvestre (AAV4);
 la SEQ ID NO: 5 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 5 de tipo silvestre (AAV5);
 la SEQ ID NO: 6 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 6 de tipo silvestre (AAV6);
 la SEQ ID NO: 7 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 7 de tipo silvestre (AAV7);
 la SEQ ID NO: 8 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 8 de tipo silvestre (AAV8);
 la SEQ ID NO: 9 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 9 de tipo silvestre (AAV9);
 la SEQ ID NO: 10 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del virus adenoasociado de serotipo 10 de tipo silvestre (AAV10);
 la SEQ ID NO: 11 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 12 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 13 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 14 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 15 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 16 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 17 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 18 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 19 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 20 es una secuencia de cebador oligonucleotídico de acuerdo con la presente invención;
 la SEQ ID NO: 21 es una secuencia de cebador oligonucleotídico;
 la SEQ ID NO: 22 es una secuencia de ácido nucleico que contiene el supuesto sitio de unión para factores de transcripción sensibles a NF- κ B (véase la FIG. 5);
 la SEQ ID NO: 23 es una secuencia de sonda de ácido nucleico monocatenario (véase la FIG. 10);
 la SEQ ID NO: 24 es una secuencia de sonda de ácido nucleico bicatenario (véase la FIG. 10);
 la SEQ ID NO: 25 es una secuencia de sonda de ácido nucleico monocatenario (véase la FIG. 10);
 la SEQ ID NO: 26 es la secuencia de ácido nucleico del gen TCS (véase la FIG. 40B); y
 la SEQ ID NO: 27 es la secuencia de ácido nucleico del gen TCS marcado con FLAG (véase la FIG. 40C).

Descripción de realizaciones ilustrativas

Los virus adenoasociados (AAV) recombinantes se han usado con éxito para la transferencia génica *in vivo* en numerosos modelos animales preclínicos de enfermedades humanas y se han usado con éxito para la expresión a largo plazo de una gran variedad de genes terapéuticos (Daya y Berns, 2008; Niemeyer *et al.*, 2009; Owen *et al.*, 2002; Keen-Rhinehart *et al.*, 2005; Scallan *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004). Los vectores AAV también han generado un beneficio clínico a largo plazo en seres humanos cuando se dirigen a sitios inmunoprivilegiados, es decir, administración ocular para la amaurosis congénita de Leber (Bainbridge *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008; Cideciyan *et al.*, 2008). Una importante ventaja de este vector es un perfil inmunitario comparativamente bajo, provocando únicamente respuestas inflamatorias limitadas y, en algunos casos, incluso dirigiendo la tolerancia inmunitaria a productos de transgén (LoDuca *et al.*, 2009). No obstante, la eficacia terapéutica, cuando se dirige a órganos no inmunoprivilegiados, se ha visto limitada en seres humanos debido a las respuestas de anticuerpos y de linfocitos T CD8⁺ T contra la cápside vírica, mientras que en modelos animales, también se ha informado de respuestas

adaptativas al producto del transgén (Manno *et al.*, 2006; Mingozi *et al.*, 2007; Muruve *et al.*, 2008; Vandenberghe y Wilson, 2007; Mingozi y High, 2007). Estos resultados sugirieron que las respuestas inmunitarias siguen siendo un problema para la transferencia de genes mediada por vectores AAV.

Basándose en datos preclínicos a partir de modelos murinos (Snyder *et al.*, 1999), se consideró durante años que los AAV eran mínimamente inmunogénicos, debido a la ausencia de la exposición previa a estos antígenos en estos modelos y a la presencia de varios mecanismos inductores de la tolerancia frente al vector (Dobrzynski *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2007). Esto se ilustró mejor en estudios de transferencia de genes en modelos murinos y caninos de hemofilia B, que mostraron una eficacia terapéutica notable (5-25 % de niveles de F.IX) y una expresión a largo plazo (2-8 años) y estable de F.IX (Snyder *et al.*, 1999). En el primer ensayo clínico usando AAV para suministrar el gen de F.IX humano al hígado en sujetos con hemofilia B, se observaron niveles terapéuticos (~11,8 %) de la expresión de F.IX a una elevada dosis del vector (2×10^{12} vgs/kg de peso corporal) (Manno *et al.*, 2006).

Sin embargo, 4-6 semanas después de la transferencia génica, se observó una respuesta de linfocitos T específicos para la cápside de AAV que coincidía con un aumento en las transaminasas hepáticas y una reducción en la expresión del transgén de F.IX a niveles basales. Esta respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD8⁺ fue inesperada (Mingozi *et al.*, 2007), ya que esto no se había observado en ninguno de los modelos animales preclínicos. Este estudio y varios otros han relacionado las respuestas inmunitarias inflamatorias e innatas del hospedador con la eliminación mediada por linfocitos T citotóxicos de los hepatocitos transducidos (Zhu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Madsen *et al.*, 2009). Posteriormente, se dedicaron grandes esfuerzos a esquivar la respuesta inmunitaria del hospedador frente a los vectores de AAV. Estos incluyeron el uso de serotipos de AAV de origen natural alternativos, tales como vectores AAV1 (Brantly *et al.*, 2009; Cohn *et al.*, 2007) o AAV8 (Nathwani *et al.*, 2006), el uso de cápsides reordenadas (Gray *et al.*, 2010) o AAV2 mutante para tirosinas expuestas en la superficie (Markusic *et al.*, 2010). Además, las estrategias para contrarrestar los riesgos asociados con la respuesta inmunitaria han incluido el uso de construcciones de transgén que tienen expresión dirigida en el tejido hospedador (Wang *et al.*, 2010) o el desarrollo de protocolos de supresión inmunitaria transitoria (Jiang *et al.*, 2006).

Aunque dichas estrategias han mejorado incrementalmente la seguridad de la transferencia génica de AAV, aún falta por ver su eficacia en seres humanos. Por ejemplo, la inmunosupresión con ciclosporina y MMF fue eficaz a una dosis menor del vector AAV1 (3×10^{11} vg/kg) pero no logró evitar las respuestas de IFN- α y linfocitos T CD8⁺ contra la cápside a dosis elevadas (1×10^{12} vg/kg) durante la transferencia génica dirigida al músculo en pacientes con deficiencia de lipoproteína lipasa (Ross *et al.*, 2006). Los datos remarcen la importancia de practicar estudios adicionales acerca de la biología de las interacciones de virus-célula hospedadora para identificar la primera "señal de peligro" en respuesta a la infección con AAV. Se razonó que la comprensión de cómo se regulan la actividad potencial y la selectividad de las proteínas asociadas con la respuesta inmunitaria inflamatoria e innata en las células hospedadoras tras la transducción con AAV podría proporcionar indicios para abordar los obstáculos de la respuesta inmunitaria del hospedador contra la cápside y/o el producto del transgén. Aunque en comparación con otros vectores víricos, los vectores AAV son ineficaces para transducir a las APC profesionales, tales como DC, las señales adicionales que activan a NF- κ B podrían ocasionar un aumento de la expresión del transgén en estas células, aumentando por tanto el riesgo de respuestas adaptativas al producto del transgén.

En la actualidad se usan vectores recombinantes basados en AAV de serotipo 2 en una serie de ensayos clínicos de terapia génica (Daya y Berns, 2008) y recientemente han mostrado una eficacia notable en el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber (Bainbridge *et al.*, 2008; Cideciyan *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008). Sin embargo, han surgido preocupaciones en referencia a la respuesta humoral a los vectores AAV2 basándose en la elevada prevalencia de seropositividad en la población general (~80 al 90 %) (Boutin *et al.*, 2008; Mendell *et al.*, 2010; Manno *et al.*, 2006). El descubrimiento de numerosos nuevos serotipos de AAV ha favorecido el desarrollo de vectores AAV para esquivar este problema potencial (Muramatsu *et al.*, 1996; Chiorini *et al.*, 1997; Chiorini *et al.*, 1999; Rutledge *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004).

Por ejemplo, recientemente se ha comunicado que los vectores AAV8 recombinantes son terapéuticos en un modelo de ratón de cáncer hepático (Kato *et al.*, 2006). Sin embargo, varios grupos han descrito diversas estrategias para usar como diana células de cáncer hepático humano en modelos murinos usando vectores AAV2 (Su *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Tse *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Malecki *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Para identificar el serotipo de AAV más eficaz para dirigirse a células de cáncer hepático humano, se demostró que se transducen con una eficacia extrema mediante vectores AAV3 tres líneas celulares de cáncer hepático humano (Glushakova *et al.*, 2009). Posteriormente, se identificó el receptor de factor de crecimiento de hepatocitos humanos como un co-receptor celular para la infección con AAV3 (Ling *et al.*, 2010). Inicialmente, seguía sin esclarecerse el papel preciso de hHGFR, especialmente el papel de la actividad tirosina cinasa asociada con el dominio intracelular de hHGFR, en la transducción mediada por AAV3. Los datos en el ejemplo 5 (véase más adelante) proporcionaron una explicación más detallada de las interacciones de AAV3-hHGFR e ilustran el desarrollo de vectores AAV3 con la cápside mutada optimizados para su uso en apuntar de manera selectiva a células de cáncer hepático humano.

PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE DE rAAV

El ensamblaje supramolecular de 60 subunidades individuales de proteína de la cápside en una red icosaédrica de T-1 no envuelta capaz de proteger a un genoma de ADN monocatenario de 4,7 kb es una etapa crítica en el ciclo de vida del parvovirus humano dependiente de colaborador, el virus adenoasociado 2 (AAV2). La partícula de AAV2 madura de 20 nm de diámetro está compuesta por tres proteínas estructurales denominadas VP1, VP2 y VP3 (masas moleculares de 87, 73 y 62 kDa respectivamente) en una proporción de 1:1:18. Basándose en su simetría y estas estimaciones de peso molecular, de las 60 proteínas de la cápside que comprende la partícula, tres son proteínas VP1, tres son proteínas VP2 y cincuenta y cuatro son proteínas VP3. El empleo de tres proteínas estructurales convierte a los serotipos de AAV en únicos entre los parvovirus, ya que todos los demás conocidos empaquetan sus genomas dentro de partículas icosaédricas formadas por únicamente dos proteínas de la cápside. La disposición de barreloide de cadena β antiparalela de estas 60 proteínas de la cápside da como resultado una partícula con un tropismo definido que es altamente resistente a la degradación. Los inventores han demostrado que la modificación de uno o más restos de tirosina en una o más de las proteínas de la cápside logra una transfección superior a una dosis menor y con un coste menor que los protocolos convencionales. Al modificar de manera específica de sitio uno o más restos de tirosina en la superficie de la cápside, los inventores han logrado una mejora significativa en la eficacia de transducción.

USOS PARA LOS VECTORES rAAV MEJORADOS CON LA CÁPSIDE MODIFICADA

Por tanto, la presente divulgación describe composiciones que incluyen uno o más de los vectores rAAV modificados con tirosina divulgados comprendidos en un kit para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad, lesión, trastorno, traumatismo o disfunción en mamíferos.

Dichos kits pueden ser útiles en diagnósticos, profilaxis y/o terapias y particularmente útiles en el tratamiento, la prevención y/o la mejora de uno o más síntomas de cáncer, diabetes, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad renal, enfermedad cardiovascular, enfermedad pancreática, enfermedad intestinal, enfermedad hepática, enfermedad neurológica, trastorno neuromuscular, déficit neuromotor, deterioro neuroesquelético, discapacidad neurológica, disfunción neurosensorial, ictus, isquemia, trastorno alimentario, deficiencia de α 1-antitripsina (AAT), enfermedad de Batten, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de células falciformes, β -talasemia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad esquelética, traumatismo, enfermedad pulmonar o cualquier combinación de los mismos.

Se describe un uso de una composición divulgada en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad, trastorno, disfunción, lesión o traumatismo, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento, prevención y/o profilaxis de una enfermedad, trastorno o disfunción y/o la mejora de uno o más síntomas de dicha enfermedad, trastorno o disfunción. Las afecciones a modo de ejemplo para las que puede ser particularmente útil una terapia génica a base de virus rAAV incluyen, pero sin limitación, cáncer, diabetes, enfermedad de células falciformes, β -talasemia, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad renal, enfermedad cardiovascular, enfermedad pancreática, enfermedades de los ojos, enfermedad intestinal, enfermedad hepática, enfermedad neurológica, trastorno neuromuscular, déficit neuromotor, deterioro neuroesquelético, discapacidad neurológica, disfunción neurosensorial, ictus, deficiencia de α 1-antitripsina (AAT), enfermedad de Batten, isquemia, un trastorno alimentario, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad esquelética, enfermedad pulmonar y cualquier combinación de los mismos.

Se describe un método para tratar o mejorar los síntomas de dicha enfermedad, lesión, trastorno o disfunción en un mamífero. Dichos métodos implican generalmente al menos la etapa de administrar a un mamífero que lo necesite, uno o más vectores rAAV modificados en la tirosina como se divulga en el presente documento, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para tratar o mejorar los síntomas de dicha enfermedad, lesión, trastorno o disfunción en el mamífero.

Dichos regímenes de tratamiento se contemplan particularmente en terapia en humanos, mediante la administración de una o más composiciones ya sea por vía intramuscular, intravenosa, subcutánea, intratecal, intraperitoneal o mediante inyección directa en un órgano o un tejido del mamífero que se encuentre en tratamiento.

También se describe un método para proporcionar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones de rAAV de la presente invención, en una cantidad y durante un tiempo eficaces para proporcionar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes terapéuticos deseados codificados por uno o más segmentos de ácido nucleico comprendidos dentro del vector rAAV. Preferentemente, el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, un marcador diagnóstico, una molécula de diagnóstico, una molécula indicadora y cualquier combinación de los mismos.

COMPOSICIONES DE VECTOR AAV

Un aspecto importante de la presente metodología es el hecho de que los vectores rAAV mejorados descritos en el presente documento permiten el suministro de títulos menores de partículas víricas a fin de lograr la misma eficacia de la transducción que la obtenida usando altos niveles de vectores rAAV convencionales con la superficie de la cápside no modificada. Para ese fin, la cantidad de composiciones de AAV y el tiempo de administración de dichas composiciones se encontrará dentro del ámbito del experto en la materia que se beneficie de las presentes enseñanzas. De hecho, los inventores contemplan que pueda lograrse la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones divulgadas mediante una sola administración, tal como, por ejemplo, una sola inyección de números suficientes de partículas infecciosas para proporcionar un beneficio terapéutico al paciente que se someta a dicho tratamiento. Como alternativa, en algunas circunstancias, puede ser deseable proporcionar administraciones múltiples o sucesivas de las composiciones de vector AAV, ya sea durante un periodo relativamente corto o relativamente prolongado, como puede determinarse por el experto médico que supervise la administración de dichas composiciones. Por ejemplo, el número de partículas infecciosas administradas a un mamífero puede ser de aproximadamente 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o incluso más partículas infecciosas/ml, administradas en forma de una sola dosis (o dividida en dos o más administraciones, *etc.*), según sea necesario para lograr la terapia para la enfermedad o trastorno particular que se esté tratando. De hecho, en ciertas realizaciones, puede ser deseable administrar dos o más composiciones diferentes basadas en vector rAAV, ya sea solas o en combinación con uno o más agentes diagnósticos, fármacos, compuestos bioactivos o similares diferentes, para lograr los efectos deseados de un régimen o terapia particular. En la mayoría de regímenes de terapia génica a base de vectores rAAV, los inventores contemplan que se necesitarán menores títulos de partículas infecciosas cuando se usan los vectores rAAV con la cápside modificada descritos en el presente documento, en comparación con el uso de vectores rAAV de tipo silvestre o "no modificados" correspondientes.

Como se usa en el presente documento, las expresiones células "modificadas por ingeniería genética" y "recombinantes" pretenden hacer referencia a una célula en la que se ha introducido un segmento de polinucleótido exógeno (tal como un segmento de ADN que provoca la transcripción de una molécula biológicamente activa). Por lo tanto, las células modificadas por ingeniería genética pueden distinguirse de las células de origen natural, que no contienen un segmento de ADN exógeno introducido de manera recombinante. Las células modificadas por ingeniería genética son, por lo tanto, células que comprenden al menos uno o más segmentos de polinucleótido heterólogos introducidos por la mano del hombre.

Para expresar un agente terapéutico de acuerdo con la presente divulgación, se puede preparar un vector de expresión rAAV modificado con tirosina que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica un agente terapéutico bajo el control de uno o más promotores. Para poner a una secuencia "bajo el control de un promotor", se posiciona el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción de la fase de lectura transcripcional generalmente a entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos "cadena abajo" (es decir, en dirección 3') del promotor seleccionado. El promotor "cadena arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del polipéptido codificado. Este es el significado de "expresión recombinante" en este contexto. Las construcciones de vector recombinante particularmente preferidas son aquellas que comprenden un vector rAAV. Dichos vectores se describen con detalle en el presente documento.

Cuando se contempla el uso de dichos vectores para la introducción de una o más proteínas, polipéptidos, péptidos, ribozimas y/u oligonucleótidos antisentido exógenos, a una célula transfectada con el vector, se pueden emplear vectores rAAV con la cápside modificada divulgados en el presente documento para suministrar uno o más polinucleótidos exógenos a una célula hospedadora seleccionada.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las construcciones genéticas divulgadas en el presente documento pueden prepararse en varias composiciones y también pueden formularse en vehículos farmacéuticos adecuados para su administración a sujetos humanos o animales. Las moléculas de rAAV y las composiciones que los comprenden proporcionan agentes terapéuticos nuevos y útiles para el tratamiento, el control y la mejora de los síntomas de varios trastornos y en particular, enfermedades, trastornos y disfunciones articulares, incluyendo, por ejemplo, artrosis, artritis reumatoide y trastornos relacionados.

También se describen composiciones que comprenden uno o más de los vectores rAAV con la cápside modificada divulgados, sistemas de expresión, viriones, partículas virales, células de mamífero o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, se proporcionan formulaciones farmacéuticas de uno o más vectores rAAV con la cápside modificada divulgados en el presente documento para su administración a una célula o un animal, ya sea solos o en combinación con una o más modalidades de terapia y en particular, para la terapia de células y tejidos humanos y enfermedades que afectan al ser humano. La formulación de excipientes y soluciones transportadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, como lo es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones concretas descritas en el presente documento en diversos regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración y formulación

oral, parenteral, intravenosa, intranasal, intraarticular e intramuscular.

DEFINICIONES ILUSTRATIVAS

De acuerdo con la presente divulgación, los polinucleótidos, segmentos de ácido nucleico, secuencias de ácido nucleico y similares incluyen, pero sin limitación, ADN (incluyendo, pero sin limitación ADN genómicos o extragenómicos), genes, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ARN (incluyendo, pero sin limitación, ARNr, ARNm y ARNt), nucleósidos y segmentos de ácido nucleico adecuados, ya se obtengan de fuentes naturales, se sinteticen o modifiquen químicamente o se preparen de otro modo o se sinteticen en su totalidad o en parte por la mano del hombre.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse métodos y composiciones similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente divulgación, en el presente documento se describen los métodos y composiciones preferidos. Para los fines de la presente divulgación, se definen los siguientes términos a continuación:

De acuerdo con las convenciones establecidas en legislación de patentes, los términos "un" y "una", cuando se usan en la presente solicitud, incluidas las reivindicaciones, indican "uno o más".

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, ha de entenderse como referencia a un intervalo de números alrededor de un número dado, así como a todos los números en un intervalo de números citado (por ejemplo, "aproximadamente 5 a 15" significa "de aproximadamente 5 a aproximadamente 15", a menos que se indique lo contrario). Por otra parte, todos los intervalos numéricos en el presente documento han de entenderse como inclusivos de cada número entero dentro del intervalo.

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "transportador" incluya cualquier disolvente, medio de dispersión, recubrimientos, diluyentes, tampones, agentes isotónicos, soluciones, suspensiones, coloides, compuestos inertes o similares o una combinación de los mismos, que sean farmacéuticamente aceptables para su administración al animal relevante. Es bien conocido por los expertos habituales en la técnica farmacéutica el uso de uno o más vehículos de suministro para los compuestos químicos en general y para agentes quimioterapéuticos en particular. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones diagnósticas, profilácticas y terapéuticas. También pueden incorporarse uno o más principios activos complementarios en o administrarse en asociación con, una o más de las composiciones quimioterapéuticas divulgadas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "segmento de ADN" se refiere a una molécula de ADN que se ha aislado del ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN obtenido de una muestra biológica usando una de las composiciones divulgadas en el presente documento se refiere a uno o más segmentos de ADN que se han extraído o purificado a partir de ADN genómico total de la especie de la que se obtienen. Se incluyen dentro de la expresión "segmento de ADN" segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de dichos segmentos, así como vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fago, virus y similares.

La expresión "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es capaz de tratar o mejorar una enfermedad o afección o de otro modo capaz de producir un efecto terapéutico previsto. La expresión "por ejemplo", como se usa en el presente documento, se usa simplemente a modo de ejemplo, sin pretender ser limitante y no ha de interpretarse que se refiera solamente a aquellos artículos explícitamente enumerados en la memoria descriptiva.

Como se usa en el presente documento, "heterólogo" se define en relación con una secuencia génica de referencia predeterminada. Por ejemplo, con respecto a una secuencia génica estructural, un promotor heterólogo se define como un promotor que no se produce de manera natural adyacente al gen estructural citado, sino que se coloca mediante manipulación en laboratorio. Análogamente, un gen o segmento de ácido nucleico heterólogo se define como un gen o segmento que no se produce de manera natural adyacente a los elementos promotores y/o potenciadores citados.

Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a un grado de complementariedad entre dos o más secuencias de polinucleótido o de polipéptido. La palabra "identidad" puede sustituir a la palabra "homología" cuando una primera secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos tiene exactamente la misma secuencia primaria que un segundo ácido nucleico o secuencia de aminoácidos. Pueden determinarse la homología de secuencia y la identidad de secuencia analizando dos o más secuencias usando algoritmos y programas informáticos conocidos en la técnica. Pueden usarse dichos métodos para evaluar si una secuencia dada es idéntica u homóloga a otra secuencia seleccionada.

Como se usa en el presente documento, "homólogo" significa, cuando se refiere a polinucleótidos, secuencias que

tienen la misma secuencia de nucleótidos esencial, a pesar de tener orígenes diferentes. Normalmente, las secuencias de ácido nucleico homólogas proceden de genes u organismos estrechamente relacionados que poseen una o más secuencias genómicas sustancialmente similares. Por el contrario, un polinucleótido "análogo" es uno que comparte la misma función que un polinucleótido de una especie u organismo diferente, pero puede tener una

5 secuencia de nucleótidos primaria significativamente diferente que codifica una o más proteínas o polipéptidos que efectúan funciones similares o que poseen una actividad biológica similar. Los polinucleótidos análogos normalmente pueden proceder de dos o más organismos que no están estrechamente relacionados (por ejemplo, ya sea genética o filogenéticamente).

10 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de restos aminoacídicos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación (u otros algoritmos disponibles para los expertos habituales) o por inspección visual.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "que necesita tratamiento" se refiere a una valoración de un profesional sanitario, tal como un médico o un veterinario que considera que un paciente necesita (o se beneficiará de una o más maneras) del tratamiento. Dicha valoración puede efectuarse basándose en varios factores que se encuentran dentro de la experiencia del profesional sanitario y puede incluir el conocimiento de que el paciente se

20 encuentra enfermo a causa de una patología que es tratable mediante uno o más compuestos o composiciones farmacéuticas como los divulgados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" incluye uno o más tipos de: polidesoxinucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier

25 otro tipo de polinucleótido que es un N-glucósido de una base púrica o pirimidínica o de bases púricas o pirimidínicas modificadas (incluyendo sitios abásicos). La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, también incluye polímeros de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos que están unidos de manera covalente, normalmente por enlaces fosfodiéster entre subunidades, pero en algunos casos, fosforotioatos, metilfosfonatos y similares. Los "ácidos nucleicos" incluyen ADN mono y bicatenario, así como ARN mono y bicatenario. Los ácidos

30 nucleicos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, ADNg; ARNhn; ARNm; ARNr, ARNt, microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN nucleolar pequeño (ARNsnO), ARN nuclear pequeño (ARNnp) y ARN temporal pequeño (ARNtp) y similares y cualquier combinación de los mismos.

La expresión "de origen natural" tanto usada en el presente documento como aplicada a un objeto se refiere al

35 hecho de que un objeto se puede hallar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo a los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por la mano del hombre en un laboratorio es de origen natural. Como se usa en el presente documento, las estirpes de roedores de laboratorio que pueden haberse criado de manera selectiva de acuerdo con la genética clásica se consideran animales de origen natural.

40 La expresión "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a que las secuencias de ácido nucleico que se unen se encuentran normalmente contiguas o sustancialmente contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, ya que los potenciadores funcionan generalmente cuando se separan del promotor por varias kilobases y las secuencias

45 intrónicas pueden tener longitudes variables, pueden unirse algunos elementos polinucleotídicos pero no de manera contigua.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" (también denominado de manera indistinta como "hospedador" o "sujeto") se refiere a cualquier hospedador que pueda recibir una o más de las composiciones

50 farmacéuticas divulgadas en el presente documento. Preferentemente, el sujeto es un animal vertebrado, lo que pretende indicar cualquier especie animal (y preferentemente, una especie de mamífero, tal como un ser humano). En determinadas realizaciones, un "paciente" se refiere a un hospedador animal que incluye, sin limitación, cualquier hospedador mamífero. Preferentemente, el término se refiere a cualquier hospedador mamífero, incluyendo este último, pero sin limitación, humanos y primates no humanos, bovinos, caninos, caprinos, cavinos, corvinos, epinos,

55 equinos, felinos, hircinos, lapinos, leporinos, lupinos, murinos, ovinos, porcinos, raninos, racinos, vulpinos y similares, incluyendo ganado, especímenes de zoológico, animales exóticos, así como animales de compañía, mascotas y cualquier animal que se encuentre bajo el cuidado de un profesional veterinario. Un paciente puede ser de cualquier edad a la que el paciente sea capaz de responder a la inoculación con la presente vacuna mediante la generación de una respuesta inmunitaria. En realizaciones particulares, el paciente mamífero es preferentemente un

60 ser humano.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que preferentemente no producen reacciones alérgicas o reacciones adversas similares cuando se administran a un mamífero y en particular, cuando se administran a un ser humano. Como se usa en el presente documento, "Sal farmacéuticamente

65 aceptable" se refiere a una sal que preferentemente conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no produce ningún efecto toxicológico indeseado. Los ejemplos de dichas sales incluyen, sin limitación, sales de

adición de ácidos formados con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares); y sales formadas con ácidos orgánicos que incluyen, sin limitación, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pámico (embónico), ácido alginico, ácido naftoico, ácido poliglutámico, ácidos naftalenosulfónicos, ácidos naftalenodisulfónicos, ácido poligalacturónico; sales con cationes metálicos polivalentes, tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares; sales formadas con un catión orgánico formado a partir de N,N'-dibenciletilendiamina o etilendiamina; y combinaciones de los mismos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto de la presente divulgación derivado de bases y ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen, pero sin limitación, los ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftaleno-2-sulfónico, trifluoroacético y bencenosulfónico. Las sales derivadas de bases adecuadas incluyen, pero sin limitación, álcalis, tales como sodio y amoníaco.

Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene", "prevención", "suprimir", "que suprime" y "supresión", como se usan en el presente documento, se refieren a administrar un compuesto ya sea solo o contenido en una composición farmacéutica antes de la aparición de los síntomas clínicos de una patología, a fin de prevenir cualquier síntoma, aspecto o característica de la patología. Dichas prevención y supresión no necesitan ser absolutas para considerarse médicamente útiles.

El término "promotor", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región o regiones de una secuencia de ácido nucleico que regulan la transcripción.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" pretende abarcar un solo "polipéptido", así como varios "polipéptidos", e incluye cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, los términos que incluyen, pero sin limitación, "péptido", "dipéptido", "tripéptido", "proteína", "enzima", "cadena de aminoácido" y "secuencia de aminoácidos contigua" se encuentran abarcados dentro de la definición de un "polipéptido", y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de o de manera indistinta con, cualquiera de estos términos. El término incluye además polipéptidos que han sufrido una o más modificaciones postraduccionales, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización, escisión proteolítica, procesamiento postraducciona l o modificación mediante inclusión de uno o más aminoácidos de origen no natural. Existe en la técnica una nomenclatura convencional para los polinucleótidos y estructuras de polipéptido. Por ejemplo, se emplean ampliamente abreviaturas de una letra y de tres letras para describir aminoácidos: Alanina (A; Ala), Arginina (R; Arg), Asparagina (N; Asn), Ácido aspártico (D; Asp), Cisteína (C; Cys), Glutamina (Q; Gln), Ácido glutámico (E; Glu), Glicina (G; Gly), Histidina (H; His), Isoleucina (I; Ile), Leucina (L; Leu), Metionina (M; Met), Fenilalanina (F; Phe), Prolina (P; Pro), Serina (S; Ser), Treonina (T; Thr), Triptófano (W; Trp), Tirosina (Y; Tyr), Valina (V; Val) y Lisina (K; Lys). Se prefiere que los restos de aminoácidos descritos en el presente documento se encuentren en la forma isomérica "L". Sin embargo, puede sustituirse cualquier resto de L-aminoácido por restos en la forma isomérica "D" a condición de que se conserven las propiedades deseadas del polipéptido.

"Proteína" se usa en el presente documento de manera indistinta con "péptido" y "polipéptido", e incluye tanto péptidos como polipéptidos producidos de manera sintética, recombinante o *in vitro* y péptidos y polipéptidos expresados *in vivo* tras administrarse las secuencias de ácido nucleico en un animal hospedador o un sujeto humano. Preferentemente, el término "polipéptido" se refiere a cualquier longitud de cadena de aminoácido, incluyendo aquellas de péptidos cortos de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 restos de aminoácido de longitud, oligopéptidos de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 restos de aminoácido de longitud y polipéptidos más largos que incluyen aproximadamente 100 restos de aminoácido o más de longitud. Asimismo, el término también pretende incluir enzimas, es decir, biomoléculas funcionales que incluyen al menos un polímero de aminoácido. Los polipéptidos y proteínas de la presente invención también incluyen polipéptidos y proteínas que están o se han modificado postraduccionalmente e incluyen cualquier derivado o conjugado de azúcar u otros añadido a la cadena principal de aminoácidos.

El término "recombinante" indica que la materia (por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido) se ha alterado artificial o sintéticamente (de manera no natural) mediante intervención humana. La alteración puede llevarse a cabo en el material en o extraído de, su ambiente o estado natural. Específicamente, por ejemplo, una secuencia de promotor es "recombinante" cuando se produce mediante la expresión de un segmento de ácido nucleico modificado por ingeniería genética por la mano del hombre. Por ejemplo, un "ácido nucleico recombinante" es uno que se prepara recombinando ácidos nucleicos, por ejemplo, durante la clonación, reordenamiento de ADN u otros procedimientos o mediante mutagénesis química o de otro tipo; un "polipéptido recombinante" o "proteína recombinante" es un polipéptido o proteína que se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante; y un "virus recombinante", por ejemplo, un virus AAV recombinante, se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

La expresión "elemento regulador", como se usa en el presente documento, se refiere a una región o regiones de una secuencia de ácido nucleico que regulan la transcripción. Los elementos reguladores a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, potenciadores, elementos postranscripcionales, secuencias de control transcripcional y similares.

La expresión "segmento de ARN" se refiere a una molécula de ARN que se ha aislado del ARN celular total de una especie particular. Por lo tanto, los segmentos de ARN pueden referirse a uno o más segmentos de ARN (ya sean de origen nativo o sintético) que se han aislado o purificado a partir de, otros ARN. Se incluyen dentro del término "segmento de ARN" segmentos de ARN y fragmentos más pequeños de dichos segmentos.

Las expresiones "corresponde sustancialmente a", "sustancialmente homólogo" o "identidad sustancial", como se usan en el presente documento, indican una característica de un ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos, en donde una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos seleccionada tiene al menos aproximadamente un 70 o aproximadamente un 75 por ciento de identidad en comparación con una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos seleccionada. Más normalmente, la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia tendrán al menos aproximadamente un 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 o incluso un 85 por ciento de identidad de secuencia y más preferentemente, al menos aproximadamente un 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 por ciento de identidad de secuencia. Aún más preferentemente, las secuencias altamente homólogas normalmente comparten más de al menos aproximadamente un 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad de secuencia entre la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia con la que se comparó.

Puede calcularse el porcentaje de identidad de secuencia a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se van a comparar o puede calcularse excluyendo pequeñas eliminaciones o adiciones que suman un total de menos de aproximadamente el 25 por ciento de la secuencia de referencia elegida. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, tal como una porción de un gen o secuencia flanqueante o una porción repetitiva de un cromosoma. Sin embargo, en el caso de la homología de secuencia de dos o más secuencias polinucleótidas, la secuencia de referencia comprenderá normalmente al menos aproximadamente 18-25 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente 26 a 35 nucleótidos e incluso más normalmente, al menos aproximadamente 40, 50, 60, 70, 80, 90 o incluso 100 o más nucleótidos.

Cuando se desean fragmentos altamente homólogos, el alcance del porcentaje de identidad entre las dos secuencias será de al menos aproximadamente el 80 %, preferentemente, al menos aproximadamente el 85 % y más preferentemente, de aproximadamente el 90 % o 95 % o mayor, como se determina fácilmente mediante uno o más de los algoritmos de comparación de secuencias de sobra conocidos por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, el programa de análisis FASTA descrito por Pearson y Lipman (1988). El término "sujeto", como se usa en el presente documento, describe un organismo, incluyendo mamíferos, tales como primates, a los que se puede proporcionar tratamiento con las composiciones de acuerdo con la presente invención. Las especies de mamífero que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento divulgado incluyen, pero sin limitación, simios; chimpancés; orangutanes; seres humanos; monos; animales domesticados, tales como perros y gatos; ganado, tal como caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras y pollos; y otros animales, tales como ratones, ratas, cobayas y hámsteres.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen estructural" pretende describir de manera general un polinucleótido, tal como un gen, que se expresa para producir un péptido, polipéptido, proteína, ribozima, molécula de ARN catalítica o molécula antisentido codificados.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, describe un organismo, incluyendo mamíferos, tales como primates, a los que se puede proporcionar tratamiento con las composiciones de acuerdo con la presente invención. Las especies de mamífero que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento divulgado incluyen, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, tales como simios; chimpancés; monos y orangutanes, animales domesticados, incluyendo perros y gatos, así como ganado, tal como caballos, vacas, cerdos, ovejas y cabras u otras especies de mamífero, incluyendo, sin limitación, ratones, ratas, cobayas, conejos, hámsteres y similares.

"Elemento regulador transcripcional" se refiere a una secuencia de polinucleótido que activa la transcripción sola o en combinación con una o más secuencias de ácido nucleico diferentes. Un elemento regulador transcripcional puede, por ejemplo, comprender uno o más promotores, uno o más elementos de respuesta, uno o más elementos reguladores negativos y/o uno o más potenciadores.

Como se usa en el presente documento, un "sitio de reconocimiento de factor de transcripción" y un "sitio de unión a factor de transcripción" se refieren a secuencias o motivos de secuencia de polinucleótidos que se identifican como sitios para la interacción específica de secuencia de uno o más factores de transcripción, tomando frecuentemente la forma de unión directa de proteína-ADN. Normalmente, los sitios de unión de factor de transcripción pueden identificarse mediante impronta de ADN, ensayos de cambio de movilidad en gel y/o pueden predecirse basándose en motivos de secuencia consenso conocidos o mediante otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

"Unidad transcripcional" se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende al menos un primer gen

estructural unido operativamente a al menos una primera secuencia promotora de acción en cis y opcionalmente, unido operativamente a una o más secuencias de ácido nucleico de acción en cis necesarias para una transcripción eficaz de las secuencias génicas estructurales y al menos un primer elemento regulador distal según sea necesario para la transcripción específica de tejido y de desarrollo adecuada de la secuencia de gen estructural posicionada operativamente bajo el control de los elementos promotores y/o potenciadores, así como cualquier secuencia en cis adicional que sea necesaria para una transcripción y traducción eficaces (por ejemplo, sitios de poliadenilación, secuencias de control de la estabilidad del ARNm, etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula transformada" pretende hacer referencia a una célula hospedadora cuyo complemento de ácido nucleico se ha alterado mediante la introducción de uno o más polinucleótidos exógenos en esa célula.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" pretende describir de manera general un proceso de introducir una secuencia polinucleotídica exógena (por ejemplo, un vector vírico, un plásmido o una molécula de ADN o ARN recombinante) en una célula hospedadora o protoplasto, donde se incorpora el polinucleótido exógeno en al menos un primer cromosoma o es capaz de replicarse de manera autónoma dentro de la célula hospedadora transformada. La transfección, electroporación y captación de ácido nucleico "desnudo" representan ejemplos de técnicas usadas para transformar una célula hospedadora con uno o más polinucleótidos.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a la administración de uno o más compuestos (ya sea solos o contenidos en una o más composiciones farmacéuticas) tras el inicio de los síntomas clínicos de una patología, a fin de reducir o eliminar cualquier síntoma, aspecto o característica de la patología. Dicho tratamiento no ha de ser absoluto para que se considere médicamente útil. Por tanto, los términos "tratamiento", "tratar", "tratado", o "que trata" pueden referirse a terapia o a la mejora o la reducción, en el alcance o la gravedad de la enfermedad, de uno o más síntomas de la misma, ya sea antes o después de que su desarrollo afecte al paciente.

Las expresiones "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a material que se encuentra sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan al material como se encuentra en su estado nativo. Por lo tanto, los polinucleótidos aislados de acuerdo con la invención preferentemente no contienen materiales normalmente asociados con estos polinucleótidos en su ambiente natural o *in situ*.

"Ligar" o "unir" se refiere a cualquier método conocido en la técnica para conectar funcionalmente una o más proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o polinucleótidos, incluyendo, sin limitación, fusión recombinante, enlaces covalentes, enlaces disulfuro, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, enlaces electrostáticos y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "plásmido" o "vector" se refiere a una construcción genética que está compuesta por material genético (es decir, ácidos nucleicos). Normalmente, un plásmido o un vector contienen un origen de replicación que es funcional en células hospedadoras bacterianas, por ejemplo, *Escherichia coli* y marcadores de selección para detectar a las células hospedadoras bacterianas que incluyen el plásmido. Los plásmidos y vectores de la presente invención pueden incluir uno o más elementos genéticos como se describen en el presente documento, dispuestos de tal forma que puede transcribirse y traducirse una secuencia codificante insertada en células de expresión adecuadas. Además, el plásmido o vector puede incluir uno o más segmentos de ácido nucleico, genes, promotores, potenciadores, activadores, regiones de clonación múltiple o cualquier combinación de los mismos, incluyendo segmentos que se obtienen de o proceden de una o más fuentes naturales y/o artificiales.

La expresión "una secuencia esencialmente como se expone en la SEQ ID NO: X" significa que la secuencia corresponde sustancialmente a una porción de la SEQ ID NO: X y tiene relativamente pocos nucleótidos (o aminoácidos en el caso de secuencias de polipéptido) que no son idénticos a o un equivalente funcional de, los nucleótidos (o aminoácidos) de la SEQ ID NO: X. La expresión "equivalente biológicamente funcional" se entiende bien en la técnica y se define adicionalmente con detalle en el presente documento. Por consiguiente, se contemplan particularmente como útiles en la práctica de la invención secuencias que tienen de aproximadamente un 85 % a aproximadamente un 90 %; o más preferentemente, de aproximadamente un 91 % a aproximadamente un 95 %; o incluso más preferentemente, de aproximadamente un 96 % a aproximadamente un 99 %; de nucleótidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a una o más secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento.

Las condiciones de hibridación estándar adecuadas para la presente divulgación incluyen, por ejemplo, hibridación en formamida al 50 %, solución de Denhardt 5x, SSC 5x, fosfato de sodio 25 mM, SDS al 0,1 % y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 42 °C durante 16 h seguido de lavados secuenciales de 1 h con SSC 0,1 x, solución de SDS al 0,1 % a 60 °C para retirar la cantidad deseada de señal de fondo. Las condiciones de hibridación de baja rigurosidad para la presente invención incluyen, por ejemplo, hibridación en formamida al 35 %, solución de Denhardt 5x, SSC 5x, fosfato de sodio 25 mM, SDS al 0,1 % y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado o de ADN de *E. coli* a 42 °C durante 16 h, seguido de lavados secuenciales con SSC 0,8x, SDS al 0,1 % a 55 °C. Los expertos en la materia reconocerán que pueden ajustarse fácilmente las condiciones para

obtener el nivel deseado de rigurosidad.

Naturalmente, la presente divulgación también abarca segmentos de ácido nucleico que son complementarios, esencialmente complementarios y/o sustancialmente complementarios a al menos una o más de las secuencias de nucleótidos específicas expuestas específicamente en el presente documento. Las secuencias de ácido nucleico que son "complementarias" son aquellas que son capaces de emparejarse por bases de acuerdo con las reglas de complementariedad de Watson-Crick. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias complementarias" significa secuencias de ácido nucleico que son sustancialmente complementarias, como puede evaluarse mediante la misma comparación de nucleótidos expuesta anteriormente o definida como capaz de hibridar con uno o más de los segmentos de ácido nucleico específicos divulgados en el presente documento en condiciones relativamente rigurosas, tales como aquellas descritas inmediatamente antes.

Como se ha descrito anteriormente, las sondas y cebadores de la presente invención pueden ser de cualquier longitud. Al asignar valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer resto es 1, el segundo resto es 2, etc., puede proponerse un algoritmo que define todas las sondas o cebadores contenidos dentro de una secuencia dada: n a $n + y$, donde n es un número desde 1 hasta el último número de la secuencia e y es la longitud de la sonda o cebador menos uno, donde $n + y$ no supera el último número de la secuencia. Por lo tanto, para una sonda o cebador de 25 pares de bases (es decir, un "25-mero"), la colección de sondas o cebadores corresponde a las bases 1 a 25, las bases 2 a 26, las bases 3 a 27, las bases 4 a 28 y así sucesivamente a lo largo de la longitud completa de la secuencia. De manera similar, para una sonda o cebador de 35 pares de bases (es decir, un 35 mero), la secuencia de cebador o sonda a modo de ejemplo incluye, sin limitación, secuencias correspondientes a las bases 1 a 35, las bases 2 a 36, las bases 3 a 37, las bases 4 a 38 y así sucesivamente a lo largo de la longitud completa de la secuencia. Análogamente, para 40 meros, dichas sondas o cebadores pueden corresponder a los nucleótidos desde el primer par de bases hasta el pb 40, desde el segundo pb de la secuencia hasta el pb 41, desde el tercer pb hasta el pb 42 y así sucesivamente, mientras que para 50 meros, dichas sondas o cebadores pueden corresponder a una secuencia de nucleótidos que se extiende desde el pb 1 hasta el pb 50, desde el pb 2 hasta el pb 51, desde el pb 3 hasta el pb 52, desde el pb 4 hasta el pb 53 y así sucesivamente.

En ciertos aspectos, será ventajoso emplear uno o más segmentos de ácido nucleico de la presente divulgación, en combinación con un marcador detectable adecuado (es decir, un "marcador"), tal como en el caso de emplear sondas polinucleotídicas marcadas para determinar la presencia de una secuencia diana dada en un ensayo de hibridación. Se conoce en la técnica una gran variedad de compuestos y composiciones indicadores adecuados para marcar sondas oligonucleotídicas, incluyendo, sin limitación, ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros, tales como avidina/biotina, etc., que pueden detectarse en un ensayo adecuado. En realizaciones particulares, también se puede emplear uno o más marcadores fluorescentes o un marcador enzimático, tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radiactivos u otros menos deseables desde el punto de vista medioambiental. En el caso de marcadores enzimáticos, se conocen sustratos indicadores colorimétricos, cromogénicos o fluorogénicos que pueden emplearse para proporcionar un método para detectar la muestra que es visible para el ojo humano o mediante métodos analíticos, tales como centellografía, fluorimetría, espectrofotometría y similares, para identificar la hibridación específica con muestras que contienen una o más secuencias de ácido nucleico complementarias o sustancialmente complementarias. En el caso de los denominados ensayos "multiplexados", donde se detectan dos o más sondas marcadas ya sea de manera simultánea o secuencial, puede ser deseable marcar una primera sonda oligonucleotídica con un primer marcador que tiene una primera propiedad o parámetro de detección (por ejemplo, un máximo espectral de emisión y/o excitación), que también está marcada con una segunda sonda oligonucleotídica con un segundo marcador que tiene una segunda propiedad o parámetro de detección que es diferente (es decir, discreta o diferenciable del primer marcador). Se conoce bien entre los expertos en la materia de genética molecular el uso de ensayos multiplexados, particularmente en el contexto de los protocolos de amplificación/detección genética.

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico (formada normalmente de ADN) capaz de replicarse en una célula hospedadora y/o a la que puede unirse operativamente otro segmento de ácido nucleico, a fin de provocar la replicación del segmento unido. Un plásmido, cósmido o un virus es un vector a modo de ejemplo.

Ejemplos

Se proporcionan los siguientes ejemplos. En la medida que se refieran a la invención como se expone en las reivindicaciones, dichos ejemplos son ilustrativos de la invención. En todos los demás casos, los ejemplos han de observarse únicamente como ejemplos comparativos.

EJEMPLO 1 -- VECTORES RAAV2 DE ÚLTIMA GENERACIÓN: LAS MUTACIONES PUNTUALES EN LAS TIROSINAS PROPORCIONAN UNA ALTA EFICACIA DE TRANSDUCCIÓN A DOSIS MENORES

El presente ejemplo demuestra que las mutaciones de restos de tirosina expuestos en la superficie en las cápsides de AAV2 esquivan la etapa de ubiquitinación, evitando de este modo la degradación mediada por el proteasoma y dando como resultado una transducción de alta eficacia por estos vectores en células humanas *in vitro* y en hepatocitos murinos *in vivo*, dando lugar a la producción de niveles terapéuticos de factor de coagulación humano a

dosis de vector reducidas. El aumento de la eficacia de transducción observado para los vectores mutantes en tirosina se debe a la falta de ubiquitinación y al tráfico intracelular al núcleo. Además de proporcionar una visión del papel de la fosforilación de la tirosina de la cápside de AAV2 en varias etapas del ciclo vital de AAV2, estos estudios han dado como resultado el desarrollo de nuevos vectores de AAV2 que tienen la capacidad de alta eficacia de transducción a dosis más bajas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vectores AAV2 recombinantes. Se generaron usando métodos publicados soluciones madre de vectores scAAV2 que contenían el gen de proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) dirigido por el promotor de β -actina (CBA) de pollo (scAAV2-EGFP) y vectores ssAAV2 que contenían el gen de factor IX (F.IX) bajo el control del potenciador de apolipoproteína/potenciador de α -1 antitripsina humana (ApoE/hAAT) (ssAAV2-F.IX).

Localización de tirosinas de la superficie en la cápside de AAV2. Se usó la estructura cristalina de AAV2 (número de referencia de PDB 11p3) para localizar los restos de tirosina en la superficie de la cápside de AAV2. Se generaron los monómeros de VP3 con relación icosaédrica doble, triple y quintuple aplicando operadores de simetría icosaédrica a un monómero de referencia usando Program O en una estación de trabajo Octane de Silicon Graphics. Después, se visualizó la posición de los restos de tirosina y se analizó en el contexto de una unidad vírica asimétrica usando el programa COOT y se presentó gráficamente usando el programa PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific, San Carlos, CA, EE. UU.).

Construcción de plásmidos de cápside de AAV2 mutantes en los restos de tirosina expuestos en la superficie. Se llevó a cabo un procedimiento en dos etapas, basado en mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II® (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) usando el plásmido pACG-2. Brevemente, en la etapa uno, se llevaron a cabo dos reacciones de extensión PCR en tubos separados para cada mutante. Un tubo contenía el cebador PCR directo y el otro contenía el cebador inverso. En la etapa dos, se mezclaron las dos reacciones y se llevó a cabo la mutagénesis por la PCR convencional según las instrucciones del fabricante. Los cebadores de la PCR se diseñaron para introducir cambios de restos de tirosina a fenilalanina, así como un cambio silente para crear un nuevo sitio de endonucleasa de restricción con fines de exploración. Todos los mutantes se exploraron con la enzima de restricción adecuado y se secuenciaron antes de su uso.

Preparación de lisados de células completas (WCL) y co-inmunoprecipitaciones.

Se sometió a aproximadamente 2×10^6 células HeLa tratadas de manera simulada o tratadas con MG132 a una infección simulada o a infección con los vectores WT scAAV2-EGFP o mutante Y730F a 5×10^3 partículas/célula durante 2 h a 37 °C. Para las inmunoprecipitaciones, se trató a las células con tripsina al 0,01 % y se lavaron exhaustivamente con PBS. Los WCL se limpiaron de unión no específica mediante incubación con 0,25 mg de IgG de ratón normal, junto con 20 μ l de perlas de proteína G-agarosa. Tras el preaclerado, se añadieron 2 μ g de anticuerpo para la cápside contra partículas de AAV2 intactas (IgG₃ monoclonal de ratón, clon A20; Research Diagnostics, Inc. (Flanders, NJ, EE. UU.) o 2 μ g de IgG normal de ratón (como control negativo) y se incubaron a 4 °C durante 1 h, seguido de precipitación con perlas de proteína G-agarosa. Para las inmunoprecipitaciones, se usaron las soluciones de sedimento resuspendido para la SDS-PAGE. Las membranas se trataron con anticuerpo monoclonal anti-Ub conjugado a HRP (dilución 1:2.000) específico para ubiquitina (Ub) (inmunoglobulina G₁ monoclonal de ratón, γ lgG₁, clon P4D1; Santa Cruz, CA, EE. UU.). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron usando quimioluminiscencia (ECL-plus, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EE.UU.).

Aislamiento de fracciones nucleares y citoplasmáticas a partir de células HeLa. Se aislaron fracciones nucleares y citoplasmáticas a partir de células HeLa y se infectaron de manera simulada o se usaron células infectadas con vector WT scAAV2-EGFP o Y700F para aislar las fracciones citoplasmáticas y nucleares. Se determinó que la pureza de cada fracción era > 95 %.

Análisis de transferencia de Southern para el tráfico de AAV2. Se aislaron muestras de ADN de baja M_r procedentes de fracciones nucleares y citoplasmáticas y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1 % o geles alcalinos de agarosa al 1 %, seguido de hibridación de transferencia de Southern usando una sonda de ADN específica para EGFP marcada con 32 P.

Ensayos de transducción de vectores AAV2 recombinantes in vitro. Se usaron aproximadamente 1×10^5 células HeLa para las transducciones con los vectores AAV2 recombinantes. Se midió la eficacia de la transducción 48 h después de la transducción obteniendo imágenes de EGFP usando microscopía de fluorescencia. Se analizaron imágenes de tres a cinco campos visuales de manera cuantitativa mediante el programa de análisis de imágenes ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). La expresión del transgén se determinó como el área total de fluorescencia (pixel²) por campo visual (media $\pm$ DT). Se usó análisis de la varianza (ANOVA) para comparar entre los resultados del ensayo y el control y se determinó que eran estadísticamente significativos.

Estudios de transducción de vectores AAV2 recombinantes in vivo. Se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena caudal vectores scAAV2-EGFP en ratones C57BL/6 a 1 x razón de 10^{10} partículas víricas por animal. Se montaron sobre portaobjetos secciones de hígado de tres lóbulos hepáticos de los ratones con inyección simulada y

no simulada 2 semanas después de la inyección. La eficacia de la transducción se midió mediante obtención de imágenes de EGFP del modo descrito. Los vectores ssAAV2-F.IX se inyectaron por vía intravenosa (a través de la vena caudal) o en la vena porta de ratones C57BL/6, BALB/c y C3H/HeJ a razón de 1×10^{10} o 1×10^{11} partículas víricas por animal. Las muestras de plasma se obtuvieron mediante sangrado retroorbital y se analizaron respecto de la expresión de hF.IX mediante ELISA.

RESULTADOS

Las mutaciones en los restos de tirosina expuestos en la superficie mejoran significativamente la eficacia de la transducción de vectores AAV2. Para demostrar que la fosforilación de las tirosinas de las cápsides de AAV2 provoca una ubiquitinación aumentada y da como resultado un deterioro del tráfico intracelular y es por lo tanto desfavorable para la transducción vírica, se modificaron los restos de tirosina expuestos en la superficie en las cápsides de AAV2. La inspección de la superficie de la cápside de la estructura de AAV2 reveló siete restos de tirosina expuestos en la superficie (Y252,

Y272, Y444, Y500, Y700, Y704 e Y730). Se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio para cada uno de los siete restos de tirosina, que se sustituyeron de manera conservativa con restos de fenilalanina (tirosina-fenilalanina, Y-F) (Tabla 1). Se empaquetaron con éxito los genomas de scAAV2-EGFP encapsidados en cada una de las cápsides con las tirosinas mutadas y las mutaciones de los restos de tirosina expuestos en la superficie no provocaron una estabilidad reducida del vector.

TABLA 1
Títulos de vectores AAV2 de tipo silvestre (WT) y con mutaciones Y→F con tirosinas modificadas

Vectores AAV	1 ^{er} título de empaquetado (vgs/ml)	2 ^o título de empaquetado (vgs/ml)	3 ^{er} título de empaquetado (vgs/ml)	4 ^o título de empaquetado (vgs/ml)
WT scAAV2-EGFP	$3,4 \times 10^{11}$	$1,0 \times 10^{12}$	$3,2 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^{11}$
Y252F scAAV2-EGFP	$3,8 \times 10^{11}$	$4,0 \times 10^{11}$	ND	ND
Y272 scAAV2-EGFP	$7,7 \times 10^{11}$	$1,0 \times 10^{11}$	ND	ND
Y444F scAAV2-EGFP	$9,7 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^9$	$5,0 \times 10^{10}$
Y500F scAAV2-EGFP	$8,8 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$	$4,0 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^{10}$
Y700F scAAV2-EGFP	$1,0 \times 10^{11}$	$4,0 \times 10^{11}$	ND	ND
Y704F scAAV2-EGFP	$6,0 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^{11}$	ND	ND
Y730F scAAV2-EGFP	$1,2 \times 10^{11}$	$5,0 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{11}$	$4,0 \times 10^{11}$

ND = no realizado.

Se analizó la eficacia de transducción de cada uno de los vectores mutantes en las tirosinas y se comparó con la del vector WT scAAV2-EGFP en células HeLa *in vitro* en condiciones idénticas. A partir de los resultados, resultó evidente que mientras que las células con infección simulada no mostraron fluorescencia verde, la eficacia de transducción de cada uno de los vectores mutantes en las tirosinas fue significativamente mayor en comparación con el vector WT scAAV2-EGFP a razón de 2.000 partículas víricas/célula. Específicamente, la eficacia de transducción de los vectores Y444F, Y500F, Y730F fue ~8 a 11 veces mayor que con el vector WT.

Las mutaciones en restos de tirosina expuestos en la superficie mejoran drásticamente la eficacia de la transducción de vectores AAV2 en hepatocitos murinos *in vivo*.

También se evaluó la eficacia de los vectores WT y mutantes en las tirosinas scAAV2-EFP en un modelo de ratón *in vivo*. La eficacia de la transducción de los vectores mutantes en las tirosinas fue significativamente mayor y varió entre 4-29 veces, en comparación con el vector WT. Cuando se recogieron otros tejidos, tales como corazón, pulmón, riñón, bazo, páncreas, tracto GI (yeyuno, colon), testículo, músculo esquelético y cerebro de ratones a los que se inyectaron 1×10^{10} partículas de los vectores mutados en las tirosinas y se analizaron, no se observaron pruebas de la expresión génica de EGFP. Por lo tanto, las mutaciones en los restos de tirosina expuestos en la superficie no parecieron alterar el tropismo hepático después de la inyección en la vena caudal de estos vectores *in vivo*.

El aumento de la eficacia de la transducción de los vectores mutantes en tirosina se debe a la falta de ubiquitinación y a un tráfico intracelular mejorado hacia el núcleo.

Para confirmar adicionalmente la hipótesis de que la fosforilación mediada por EGFR-PTK de las proteínas de la cápside en los restos de tirosina es un requisito previo para la ubiquitinación de las cápsides de AAV2 y que los viriones ubiquitinados son reconocidos y degradados por el proteasoma citoplasmático en su camino hacia el núcleo,

lo que ocasiona un transporte nuclear ineficaz, se llevaron a cabo como se expone a continuación una serie de experimentos.

En el primer estudio, Se infectaron de manera simulada o con los vectores WT, Y444F o Y730F scAAV2-EGFP células HeLa C12 que portaban los genes inducibles por adenovirus AAV2 *rep* y *cap*. Mientras que las células infectadas de manera simulada no mostraron fluorescencia verde y se transdujeron ~15 % de las células con los vectores WT scAAV2-EGFP en ausencia de coinfección con adenovirus, la eficacia de la transducción de los vectores Y444F y Y730F scAAV2-EGFP aumentó en ~9 y ~18 veces, respectivamente, en comparación con el vector WT. De forma interesante, mientras que la coinfección con adenovirus proporcionó un aumento de ~11 veces, la eficacia de la transducción de los vectores Y444F y Y730F scAAV2-EGFP no se mejoró adicionalmente mediante la coinfección con adenovirus. Ya que el adenovirus puede mejorar el transporte nuclear del vector AAV2 en células HeLa, estos datos sugieren que los restos de tirosina expuestos en la superficie desempeñan un papel en el tráfico intracelular de AAV2 y su eliminación provoca un transporte nuclear eficaz de los vectores AAV2.

En un segundo estudio, se infectaron de manera simulada o con los vectores WT o Y730F scAAV2-EGFP células HeLa tratadas de manera simulada o tratadas con Tyr23, un inhibidor de EGFP-PTK o con MG132, un inhibidor del proteasoma, pero que se sabe que aumenta la eficacia de la transducción de vectores AAV. Mientras que las células infectadas de manera simulada no mostraron fluorescencia verde y se transdujeron ~5 % de las células con los vectores WT scAAV2-EGFP en células tratadas de manera simulada, el pretratamiento con Tyr23 o MG132 provocó un aumento de ~9 veces y ~6 veces en la eficacia de la transducción, respectivamente. Aunque la eficacia de la transducción de los vectores Y730F scAAV2-EGFP aumentó ~14 veces en comparación con los vectores WT, no se mejoró adicionalmente mediante el pretratamiento con Tyr23 o MG132. Estos datos sugieren que la ausencia de restos de tirosina expuestos en la superficie, que impidió la fosforilación de los vectores mutantes, probablemente impidió la ubiquitinación de las proteínas de la cápside y estos vectores no pudieron reconocerse en su camino hacia el núcleo y degradarse por el proteasoma, lo que ocasionó su eficiente translocación nuclear.

En un tercer estudio, se infectaron de manera simulada o se infectaron con los vectores WT, Y730F o Y444F scAAV2-EGFP células HeLa tratadas de manera simulada o tratadas con MG132. Se prepararon WCL 4 h después de la infección y se inmunoprecipitaron cantidades equivalentes de proteínas en primer lugar con anticuerpo anti-cápside de AAV2 (A20), seguido de análisis de transferencia de Western con anticuerpo monoclonal anti-UB. Mientras que las proteínas de la cápside de AAV2 ubiquitinadas (Ub-AAV2 Cap) eran indetectables en las células infectadas de manera simulada, la señal de proteínas de la cápside de AAV2 ubiquitinadas fue más débil en las células no tratadas y se produjo una acumulación significativa de proteínas de la cápside de AAV2 ubiquitinadas después del tratamiento con MG132. De forma interesante, las infecciones con los vectores Y730F o Y444F redujeron drásticamente el alcance de la acumulación de proteínas de la cápside de AAV2 ubiquitinadas inducida por MG132. Estos resultados determinan que la mutación en los restos de tirosina esquiva la degradación mediada por el proteasoma de los vectores.

En un cuarto estudio, se determinó en células HeLa el destino del ADN vírico del vector WT, Y444F e Y730F introducido. Los análisis de transferencia de Southern de muestras de ADN de baja Mr, aisladas de las fracciones citoplasmáticas [C] y nucleares [N] y el barrido densitométrico de autorradiografías, reveló que ~36 % del ADN de scAAV2 introducido estaba presente en la fracción nuclear en células infectadas con el vector WT. De forma interesante, sin embargo, la cantidad de ADN del vector Y730F e Y444F scAAV2 en la fracción nuclear aumentó a ~12 % y ~10 %, respectivamente. Estos resultados documentaron además que las mutaciones en los restos de tirosina expuestos en la superficie previenen la ubiquitinación de las cápsides de AAV2, dando como resultado una reducción en la degradación mediada por el proteasoma y a su vez, facilitan el transporte nuclear de vectores AAV2.

Los vectores con mutaciones en tirosina expresan niveles terapéuticos de la proteína factor IX humana con una dosis de vector reducida ~10 veces en ratones. Fue importante examinar si los vectores AAV2 con mutaciones de tirosina eran capaces de suministrar de manera eficaz un gen terapéutico a una dosis reducida del vector *in vivo*. Para este fin, se encapsidó un casete de expresión monocatenario de factor IX humano (h.FIX) específico para hepatocitos en el vector Y730F y se evaluó la eficacia de este vector en tres estirpes de ratones diferentes (BALB/c, C3H/HeJ y C57BL/6). De manera consistente en las tres estirpes, el vector Y730F logró niveles circulantes de h.FIX ~10 veces mayores en comparación con el vector WT después de su administración por la vena caudal o la vena porta, siendo la última la ruta más eficaz. Estos resultados indicaron claramente que los vectores Y730F expresaron niveles terapéuticos de la proteína F.IX humana (~50 ng/ml) a una dosis del vector reducida ~10 veces (10^{10} partículas/ratón) en ratones C57BL/6 mediante inyección en la vena porta. Cabe detectar que la transferencia génica vírica hepática en los ratones C57BL/6 es generalmente más eficaz que en las otras dos estirpes.

Estos resultados aquí mostrados son coherentes con la interpretación de que la fosforilación de tirosina inducida por EGFR-PTK de las proteínas de la cápside de AAV2 promueve la ubiquitinación y la degradación de AAV2, ocasionando de este modo un deterioro del transporte nuclear vírico y una reducción en la eficacia de la transducción. Los análisis mutacionales de cada uno de los siete restos de tirosina expuestos en la superficie proporcionan vectores AAV2 con una eficacia de transducción significativamente aumentada *in vitro* así como *in vivo*. Específicamente, los vectores mutantes Y444F e Y730F esquivan la etapa de ubiquitinación, que da como

resultado un tráfico intracelular y un suministro significativamente mejorado del genoma vírico al núcleo.

A pesar de la expresión terapéutica a largo plazo lograda en los modelos preclínicos mediante los vectores AAV2 formados por las proteínas de la cápside WT, en un ensayo de terapia génica reciente, dos pacientes con hemofilia B grave desarrollaron transaminitis dependiente de la dosis del vector, lo que limitó la duración de la expresión de hF.IX derivado de hepatocitos a <8 semanas. Análisis posteriores demostraron la presencia de linfocitos T CD8⁺ de memoria contra las cápsides de AAV en seres humanos y una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para la cápside restringida a MHC I en uno de los pacientes con hemofilia B, que imitó el transcurso temporal de la transaminitis. Se llegó a la conclusión de que esta respuesta de linfocitos T CD8⁺ contra la cápside introducida eliminó a los hepatocitos transducidos con AAV2. Estos datos demuestran que una menor dosis de antígeno de la cápside es suficiente para una transferencia génica eficaz con el vector Y730F y muestran una ubiquitinación muy reducida de AAV-Y730F en comparación con la cápside WT, in requisito previo para la presentación al MHC I. Por lo tanto, la respuesta de linfocitos T a la cápside de AAV2 (un gran problema para la transferencia génica terapéutica en el hígado), puede evitarse usando los vectores AAV2 mutados en las tirosinas expuestas en la superficie.

También se ha observado una eficacia de la transducción drásticamente mejorada de los vectores con tirosinas mutadas en células madre neuronales y hematopoyéticas humanas primarias *in vitro* y en varios tejidos y órganos en ratones *in vivo*. También se han construido mutantes de tirosina dobles, triples y cuádruples para examinar si dichos mutantes múltiples son viables y si puede aumentarse adicionalmente la eficacia de transducción de estos vectores. Es destacable que con unas pocas excepciones (Y444 posicionada de manera equivalente a una glicina en AAV4 y arginina en AAV5; Y700 posicionada de manera equivalente a fenilalanina en AAV4 y AAV5; e Y704 posicionada de manera equivalente a una fenilalanina en AAV7), estos restos de tirosina se encuentran altamente conservados en los serotipos 1 a 10 de AAV.

EJEMPLO 2 - ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE NF-KB MEDIANTE VECTORES RAAV

Ya que el análisis *in silico* con la base de datos de factores de transcripción humanos demostró la presencia de varios sitios de unión para NF-κB, un regulador central de las respuestas inmunitarias e inflamatorias celulares, en el genoma de virus adenoasociado (AAV), el presente ejemplo investiga si AAV utiliza NF-κB durante su ciclo vital. Se usaron moduladores de molécula pequeña de NF-κB en células HeLa transducidas con vectores AAV recombinantes. VP16, un activador de NF-κB, aumentó la expresión del transgén mediada por vector AAV hasta 25 veces. De los dos inhibidores de NF-κB (Bay11) que bloquean las vías de NF-κB tanto canónicas como no canónicas, suprimieron completamente la expresión del transgén, mientras que el ditiocarbamato de pirrolidona (PDTC), que interfiere con la vía de NF-κB clásica, no tuvo efecto. Los análisis de transferencia de Western confirmaron la abundancia del componente de la proteína p52 nuclear en la vía de NF-κB no canónica en presencia de VP 16, que se suprimió mediante Bay11, lo que sugiere que la vía de NF-κB no canónica se activa durante la infección con AAV. Se obtuvieron resultados similares con células dendríticas (DC) humanas primarias *in vitro*, en las que la expresión inducida por citocinas de los marcadores de maduración de DC, CD83 y CD86, también se inhibió mediante Bay 11. La administración de Bay11 antes de la transferencia génica en ratones C57BL/6 normales *in vivo* dio como resultado una reducción de hasta 7 veces en la producción inducida por vector AAV de citocinas y quimioquinas proinflamatorias, tales como, IL-1β, IL-6, TNFα, IL-12β, KC y RANTES. Estos estudios sugirieron que la inmunosupresión transitoria con inhibidores de NF-κB antes de la transducción con vectores AAV ocasiona una respuesta inmunitaria deteriorada, lo que tiene implicaciones significativas en el uso óptimo de vectores AAV en la terapia génica en humanos.

Estudios recientes han comenzado a definir las señales de activación iniciales resultantes de la transferencia génica de AAV. Un estudio observó que la señalización inducida por AAV por la vía del receptor 9 de tipo Toll (TLR9)-factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) induce una respuesta de interferón de tipo I en células dendríticas plasmacitoides (pDC), dirigiendo de este modo las respuestas inmunitarias adaptativas al vector y al producto del transgén tras la transferencia génica al músculo esquelético murino (Zhu *et al.*, 2009). Estos datos indican la percepción del genoma de ADN por el receptor TLR9 endosómico en las pDC. No se hallaron pruebas de la inducción de citocinas proinflamatorias después del pulsado *in vitro* de las DC o macrófagos con AAV. Aun así, informes previos demostraron una rápida aunque altamente transitoria respuesta innata dependiente de células de Kupffer contra vectores AAV en el hígado, lo que incluyó la expresión de varias citocinas inflamatorias (Zaiss y Muruve, 2008; Zaiss *et al.*, 2008; Zaiss y Muruve, 2005; Zaiss *et al.*, 2002).

De forma interesante, no se ha estudiado previamente en el ciclo de vida de AAV el papel de NF-κB, una respuesta celular clave a diversas señales procedentes de estrés y patógenos y un regulador de la expresión de citocinas proinflamatorias (Hayden y Ghosh, 2004; Hiscott *et al.*, 2006; Li y Verma, 2002). En este ejemplo, se demuestra que la infección de células humanas con AAV puede provocar la activación de la vía de NF-κB no canónica. Además, la activación de NF-κB aumenta sustancialmente la expresión de transgenes (incluyendo en DC), mientras que la inhibición de NF-κB reduce la expresión. La prevención de la inducción de citocinas inflamatorias mediante la inhibición transitoria de NF-κB revela un papel para NF-κB en la respuesta innata a AAV *in vivo* y de manera importante, no interfiere con la expresión a largo plazo del transgén.

RESULTADOS

Los AAV-ITR contienen sitios de unión para factores de transcripción de respuesta a NF-κB. Se ha descrito con anterioridad la existencia de una proteína celular que interactúa específicamente con la secuencia D[-] monocatenaria en la repetición terminal invertida (ITR) izquierda del genoma de AAV2 (Qing *et al.*, 1997). Ya que la secuencia ssD[+] en la ITR derecha es complementaria a la secuencia ssD[-] en la ITR izquierda, se razonó que también puede existir una proteína celular putativa y que interactúe con la secuencia ssD[+] en la ITR derecha. En ensayos de cambio de movilidad electroforética, usando la sonda de secuencia ssD[+], se detectó, de hecho una proteína celular distinta, que se denominó proteína de unión a secuencia ssD[+] (ssD[+]-BP) (Qing *et al.*, 1997). Después de la purificación y espectrometría de masas, se observó que ssD[+]-BP tenía una homología de aminoácidos parcial respecto de un factor represor de NF-κB celular, un regulador negativo de la transcripción. Un análisis *in silico* adicional con la base de datos de factores de transcripción humanos demostró la presencia de varios sitios de unión para cofactores de unión a NF-κB, tales como p300, TFIIB y Sp1. Uno de estos es el factor de transcripción p300/CREB, que se ha demostrado recientemente que está asociado con el genoma de AAV (Dean *et al.*, 2009). Aunque se desconoce que la señalización de NF-κB se activa por la unión de AAV a los receptores/correceptores de la superficie celular, estudios recientes han demostrado que la respuesta inmune innata puede activarse a) mediante la vía de receptor 9 de tipo toll (TLR9)-factor de diferenciación mieloide 88 (MYD88) o b) mediante la activación del ligando CD40 en la superficie celular en modelos de ratón *in vivo* (Zhu *et al.*, 2009; Mays *et al.*, 2009). Se sabe que estos dos ligandos interactúan aguas abajo con factores de transcripción de NF-κB durante su activación biológica (Mineva *et al.*, 2007; Loiarro *et al.*, 2005). Los siguientes datos demuestran que NF-κB está implicado en el ciclo vital de AAV.

La infección con AAV activa la vía de NF-κB no canónica en células humanas. Se usaron activadores e inhibidores de molécula pequeña de la señalización de NF-κB en células HeLa transducidas con un vector de serotipo 2 autocomplementario que expresa EGFP (scAAV-EGFP). VP16, un activador de NF-κB (Wu y Miyamoto, 2008) aumentó la expresión de EGFP en ~25 veces (FIG. 1A y FIG. 1B). Entre los dos inhibidores evaluados, Bay11, que bloquea la actividad tanto de IKKα como de IKKβ, suprimió completamente la expresión de EGFP, mientras que PDTC, que inhibe la degradación de IκB mediante el bloqueo de la IκB ubiquitina ligasa en la vía clásica (Cuzzocrea *et al.*, 2002), no tuvo un efecto perceptible en la expresión de EGFP (FIG. 1A y FIG. 1B). Asimismo, se suprimió completamente la expresión aumentada de transgén mediada por VP16 mediante Bay11, pero no por PDTC (FIG. 6A). Se obtuvieron resultados similares con ambos vectores scAAV (FIG. 6B) y con el vector scAAV triple mutante en tirosina (Y730+500+444F; TM-AAV), que se describieron en los ejemplos anteriores (Markusic *et al.*, 2010) (FIG. 6C). Se llegó a la conclusión, por lo tanto, de que la expresión transgénica del vector AAV estaba regulada por la vía alternativa (no canónica) de NF-κB. Esta conclusión se confirmó mediante análisis de transferencia de Western (FIG. 6D y FIG. 6E), que reveló un aumento en p100 citosólica y los componentes de la proteína p52 nuclear de la vía de NF-κB no canónica en ~3 a 6 veces en presencia de VP 16. Por otra parte, la transducción con el vector AAV solo (es decir, en ausencia de activador) aumentó p100 y p52 (FIG. 1C), lo que indica que la infección de la célula activó la vía alternativa de NF-κB. Este aumento se suprimió mediante el tratamiento con Bay11, mientras que p65, el marcador usado para la vía clásica de NF-κB, no se vio afectado (FIG. 1C).

La vía de NF-κB es operativa en células presentadoras de antígenos humanas primarias, después de la infección con AAV.

En las células dendríticas humanas primarias (DC), por otro lado, aunque se aumentó nuevamente de manera sustancial la expresión transgénica con el activador de NF-κB (FIG. 2A), la infección por AAV en sí no activó a NF-κB (FIG. 2B). En presencia de VP16, se observó un aumento de ~20 veces en la expresión de EGFP en comparación con DC transducidas con vector scAAV. El tratamiento con citocinas (TNF-α, IL-6, IL-1β, PGE2), conocido por activar la vía de NF-κB, provocó un aumento adicional en la expresión transgénica de ~26 %, que se redujo a ~12 % después del tratamiento con Bay11 (FIG. 2A). Los análisis por transferencia de Western de las fracciones nucleares corroboraron adicionalmente que la vía alternativa de activación NF-κB (acumulación de proteínas p52) estaba operativa (FIG. 2B). Se obtuvieron resultados similares después del suministro génico mediado por vector scAAV a hígados murinos *in vivo* (FIG. 7). Los inventores también evaluaron la capacidad de los moduladores de NF-κB para inducir cambios fenotípicos en DC. Los análisis por citometría de flujo de dos marcadores de maduración de DC, CD83 y CD86 indicaron que VP16 solo no era capaz de inducir maduración o potenciar la expresión de moléculas coestimuladoras cuando se usó junto con el cóctel de citocinas. Sin embargo, el tratamiento con Bay11 provocó la inhibición de la maduración mediada por citocinas de APC, lo que implica adicionalmente la vinculación de NF-κB (tabla 2). Esta reducción de los marcadores de maduración reduce la función principal de las DC para procesar material antigénico y reduce la activación y proliferación de linfocitos T. Por lo tanto, se barajó la hipótesis de que la supresión de la activación de NF-κB antes de la activación del vector puede provocar una respuesta inmunitaria innata deteriorada contra AAV.

TABLA 2
ANÁLISIS FACS DE MARCADORES DE MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS PRIMARIAS

Grupo	Medias geométricas que expresan niveles de expresión en células	
	CD83	CD86

DC inmaduras	10,38	7,04
DC - Sin complemento de maduración	18,08	13,63
DC maduras + Citocinas	20,60	26,80
DC + AAV	18,29	12,65
DC + VP16	16,48	13,70
DC maduras + AAV + Citocinas	24,25	23,75
DC maduras + AAV + Citocinas + VP16	19,92	21,92
DC maduras + AAV + Citocinas + Bay11	16,88	10,11

Se muestran datos de un experimento representativo ($n = 3$).

La inhibición de la activación de NF- κ B provoca la supresión de la producción de citocinas proinflamatorias antes de la transferencia génica mediada por vector AAV en ratones *in vivo*. En estudios *in vivo*, se administró por vía intraperitoneal (i.p.) una sola dosis de Bay11 a razón de 20 mg/kg de peso corporal 12 h antes de la administración del vector en ratones C57BL/6. Se midieron niveles de transcrito de homogeneizados de hígado de mediadores inmunitarios (FIG. 3A) o para la activación de NF- κ B (FIG. 3B) a partir de los grupos a los que se inyectó Bay11 y vector y se comparó con ratones a los que se inyectó placebo. Estos datos revelaron que 2 h después de la administración del vector, los ratones a los que se administró Bay11+AAV tenían niveles significativamente reducidos de citocinas o quimiocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1 α , IL-6, TNF α , IL-12 α , KC y RANTES, en comparación con los animales a los que se inyectó placebo y vector AAV (FIG. 3A) y además, se impidió la regulación positiva del perfil de expresión génica de NF- κ B (FIG. 3B). Se observó una tendencia de regulación negativa similar de estos marcadores de respuesta inmunitaria en ratones a los que se inyectó el vector AAV triple mutante en tirosina (Y730+500+444F; TM-AAV). La regulación positiva de la expresión de interferón de tipo I por vectores AAV tanto de tipo silvestre (WT-AAV) como TM-AAV no se vio afectada por Bay11 (FIG. 8A, FIG. 8B, FIG. 8C, FIG. 8D, FIG. 8E y FIG. 8F). La administración de Bay11 también redujo significativamente la respuesta de anticuerpo anti-AAV2 en estos ratones (FIG. 9). La suma de estos resultados implica que la respuesta transitoria de citocinas inflamatorias, observada normalmente durante la transferencia génica hepática de AAV *in vivo*, está mediada por la activación de NF- κ B.

Expresión transgénica mediada por vector AAV en hepatocitos murinos. En vista de la observación de que Bay11 inhibe fuertemente la expresión transgénica mediada por AAV en células HeLa *in vitro* 48 h después de la transducción (FIG. 1A y FIG. 1B), que pudo ser contraproducente para lograr la expresión transgénica a largo plazo *in vivo*, fue importante examinar el efecto de Bay11 en ratones. Como puede observarse en la FIG. 4A, los animales a los que se inyectó o no Bay11 tuvieron niveles similares de expresión de EGFP de cualquier vector cuando se analizaron 2 semanas después de la transferencia génica. La eficacia de la transducción del vector TM-AAV fue ~12 veces mayor que la del vector WT-AAV (FIG. 4B), coherente con los estudios recientemente publicados (Markusic *et al.*, 2010). Estos datos sugieren que la administración de Bay11 podría regular negativamente de manera segura y eficaz los mediadores de la respuesta inmunitaria innata sin comprometer la expresión transgénica a largo plazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vectores AAV recombinantes. Se generaron reservas altamente purificadas de vectores (sc) AAV2 autocomplementarios que contenían el plásmido de tipo silvestre (WT) o el triple mutante de tirosina (TM; Y730+500+444F) y el gen de proteína verde fluorescente (EGFP) dirigido por el promotor de β -actina (CBA) de pollo (WT-scAAV2-EGFP, TM-scAAV2-EGFP) mediante la triple transfección de células HEK-293. Después, se purificaron los vectores mediante centrifugación de gradiente de CsCl₁, se esterilizaron por filtración y se cuantificaron mediante hibridación por transferencia de ranura como se ha descrito (Liu *et al.*, 2003; Kube y Srivastava, 1997). El plásmido mutante para tirosina pACG2-Y730+500+444F-Rep/Cap se ha descrito recientemente (Markusic *et al.*, 2010).

Ensayos de transducción de vectores AAV recombinantes *in vitro*. Se determinó la concentración óptima de compuestos moduladores de NF- κ B mediante un ensayo de viabilidad celular con diluciones de factor diez a partir de la CI₅₀ o se usaron como se ha descrito con anterioridad (Wu y Miyamoto, 2008; Kumar *et al.*, 2008). Se usaron VP16 o Bay11 (10 o 5 μ M, concentración final), y PDTC (50 o 25 μ M, concentración final) solos o en combinaciones de activador/inhibidor. Para los experimentos de transducción, se pretrataron aproximadamente 1×10^5 células HeLa con estos compuestos 24 h antes de la infección con el vector. Las células se transdujeron con 500 o 2.000 genomas de vector (vgs) por célula de los vectores WT-AAV o TM-AAV que codifican el transgén de EGFP como se ha descrito con anterioridad (Markusic *et al.*, 2010). Después de 7 días de cultivo, se transdujeron células dendríticas humanas primarias con vectores AAV a razón de 2000 vgs/célula y se incubaron durante 48 h. La expresión del transgén se determinó como el área total de fluorescencia (pixel²) por campo visual (media $\pm$ DT) o mediante citometría de flujo. Se usó análisis de la varianza (ANOVA) para comparar entre los resultados del ensayo y el

control y se determinó que eran estadísticamente significativos.

Estudios de transducción de vectores AAV recombinantes in vivo. Se administró por vía intraperitoneal a grupos de ratones C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EE. UU.) normales de 6 semanas de edad, una sola dosis (20 mg/kg) del inhibidor de NF- κ B Bay11, en un volumen de 200 μ l diluido en DMSO (día 0). Los animales a los que se inyectó únicamente el disolvente portador de DMSO se consideró el grupo basal (simulado) ($n = 75$) y a los animales a los que se inyectó Bay11 fueron el grupo de ensayo ($n = 75$). En este punto, se asignaron de manera aleatoria los animales de los grupos simulado y de Bay11 a recibir suero salino tamponado (PBS, pH 7,4) o los vectores WT-AAV o TM-AAV ($n = 25$ ratones cada grupo). En el día 1, se administraron $\sim 1 \times 10^{11}$ partículas de genoma vírico (vg) de los vectores WT-AAV2-EGFP o TM-AAV2-EGFP o PBS por vía intravenosa a través de la vena caudal. Para medir la modulación de la respuesta inmunitaria frente a AAV, se sacrificó a 5 animales de cada uno de los grupos a los que se inyectó PBS o vector WT-AAV o TM-AAV mediante inhalación de dióxido de carbono en diferentes instantes después de la administración del vector (2, 6, 10, 24 h y día 10). Se recogieron los lóbulos hepáticos, se seccionaron transversalmente y se montaron sobre portaobjetos para estudiar el efecto de Bay11 en la expresión de EGFP mediada por AAV (de los ratones del día 10). Todos los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las guías del comité institucional de cuidado y uso de animales.

Análisis de expresión génica de la respuesta inmunitaria innata mediante ensayo de RT-PCR. Se administró por vía intraperitoneal a grupos de ratones C57BL/6J normales de 6 semanas de edad, una sola dosis (20 mg/kg) del inhibidor de NF- κ B, Bay11, en un volumen de 200 μ l diluido en DMSO (día 0). En el día 1, se inyectó a los ratones suero salino tamponado con fosfato (PBS, pH 7,4) o $\sim 1 \times 10^{11}$ vgs de los vectores de tipo silvestre (WT) AAV-EGFP o de los vectores triples mutantes de tirosina (TM) AAV-EGFP por vía intravenosa a través de la vena caudal ($n = 5$ ratones cada grupo). A las 2 h después de la administración del vector, se efectuó un perfil de expresión de la respuesta inmunitaria que incluyó los receptores 1-9 de tipo Toll, MyD88, MIP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-12 α , IL6, KC, TNF α , RANTES, MCP-1, IFN α , IFN β e IP-10. Se recogieron los datos y se analizaron usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7500 con el programa informático v 1.1 (Applied Biosystems). El punto de referencia se determinó automáticamente para el ARNr de 18S y para otros genes. Se determinaron manualmente los umbrales para todos los genes. La expresión génica se midió mediante el método comparativo de ciclo umbral (Ct). Se definió el parámetro de ciclo umbral (Ct) como el número del ciclo en el cual la fluorescencia indicadora generada mediante la escisión de la sonda sobrepasó un umbral fijo por encima del punto de referencia. Se normalizó la expresión génica de citocinas usando el gen de ARNr de 18S de referencia endógeno y el ARN murino de los infectados de manera simulada se usó como muestra de referencia. Se determinó la expresión génica relativa para cada grupo de animales tratados y no tratados y se consideraron los valores $> 2,6$ y $< 0,38$ como regulaciones positivas y negativas significativas entre los grupos y se calculó evaluando la variabilidad en las placas de 96 pocillos usadas para medir la expresión génica específica.

Células, anticuerpos y compuestos químicos. Se obtuvieron células HeLa de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD, EE. UU.) y se mantuvieron como cultivos en monocapa en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, Invitrogen Carlsbad, CA, EE. UU.) complementado con suero de ternero neonato al 10 % (NCS) (Lonza, Inc., Basilea, Suiza) y antibióticos. Se resuspendieron PBMC procedentes de leucaféresis en medio AIM-V asérico (Lonza) y se incubaron las fracciones de células semiadherentes en medio AIM-V asérico complementado con IL-4 humana recombinante (500 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml) (R&D Systems, MN, EE.UU.). Las células se trataron con moduladores de NF- κ B (VP16 10 mM o Bay11 10 mM) y cóctel de citocinas que incluía 10 ng/ml de TNF- α , 10 ng/ml de IL-1, 10 ng/ml de IL-6, 1 mg/ml de PGE2 (R&D Systems) durante 20 h. Se recogieron las células, se caracterizaron para asegurarse de que cumplieren con el fenotipo típico de las DC maduras (CD83, RPE, IgG1 murina, CD86, FITC, IgG1 murina; Invitrogen). Todos los anticuerpos primarios y secundarios se adquirieron de Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, EE. UU.) o Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, EE. UU.). Los activadores de NF- κ B [Etopósido (VP16), afidicolina, hidroxurea (HU)] y los inhibidores de NF- κ B [Bay 11-7082 (Bay11), ditiocarbamato de pirrolidina (PDTc)] se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE. UU.). Estos compuestos se resuspendieron en DMSO (Sigma Aldrich) o en agua estéril sin DNasas y sin RNasas (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de transferencia Western. Para la preparación de muestras, se usaron lisados homogeneizados de los sedimentos celulares de $\sim 2 \times 10^6$ células HeLa o DC, tratadas de manera simulada o pretratadas con la concentración óptima de activadores o inhibidores de NF- κ B. Se aislaron proteínas de células completas usando el tampón de lisis RIPA (Sigma-Aldrich) y se extrajeron las proteínas citoplasmáticas y nucleares usando un kit comercial (kit de reactivos de extracción NE-PER, Pierce Biotech, Rockford, IL, EE. UU.) según el protocolo del fabricante en presencia de un cóctel inhibidor de proteasas (kit de cóctel inhibidor de proteasas Halt™, Pierce Biotech). Los extractos de proteína se hirvieron durante 5 min en condiciones reductoras [tampón de muestra de SDS que contenía Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8 a 25 °C), SDS al 2 % p/v, glicerol al 10 %, DTT 50 mM, azul de bromofenol al 0,01 % (p/v) (Cell Signaling Technology, Inc.)] y se almacenaron a -86 °C hasta su análisis posterior. Se ejecutaron volúmenes iguales de muestras en SDS-PAGE al 4-15 % (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ m (Bio-Rad) y normalmente se incubaron durante una noche con una dilución 1:1000 de anticuerpos primarios [p100/52, p65, cinasa inhibidora-I κ B κ , gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Lamina B (Cell Signaling Technology, Inc.), β -actina (Santa Cruz Biotechnology)]. Al día siguiente, se incubaron las transferencias con 1:2.000-1:5.000 del anticuerpo secundario IgG marcado con

HRP anti-idiotípico adecuado (Santa Cruz Biotechnology). La detección de inmunotransferencia se llevó a cabo usando el kit de detección de transferencia de Western ECL plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE.UU.). Se midió la intensidad de las bandas de proteínas con el programa informático Adobe Photoshop CS3® y se normalizó a los niveles de proteínas de los productos génicos constitutivos usados como controles de carga.

La base para el presente estudio fue el hallazgo de que el NF- κ B celular del hospedador se une a la secuencia D de 20 pb presente en las repeticiones terminales invertidas (ITR) del AAV (Qing *et al.*, 1997), que se identificó mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética mediante espectrometría de masas (FIG. 10A y FIG. 10B). Los datos presentados en este ejemplo proporcionan la primera prueba de la implicación de NF- κ B en la infección por AAV. Usando varios moduladores farmacológicos, que se han usado ampliamente por otros investigadores (Wu y Miyamoto, 2008; Kumar *et al.*, 2008) para estudiar la vía de señalización de NF- κ B, se demostró que la vía de NF- κ B no canónica está regulada positivamente después de la infección por AAV. Esto es significativo, teniendo en consideración que la activación del programa transcripcional de NF- κ B es una etapa temprana inmediata fundamental de la activación inflamatoria e inmunitaria (Li y Verma, 2002) y la señalización de NF- κ B representa un candidato principal para la susceptibilidad o interferencia vírica (Hiscott *et al.*, 2006). Se ha demostrado que los virus que activan NF- κ B son susceptibles a la respuesta inmunitaria innata mediante una respuesta de interferón (virus de la estomatitis vesicular, virus del sarampión) (Hiscott *et al.*, 2003), la vía de señalización dependiente de receptor de tipo Toll (TLR) (virus del Ébola, virus sincitial respiratorio) (Okumura *et al.*, 2010; Lizundia *et al.*, 2008), y la vía independiente de TLR (citomegalovirus, virus de la hepatitis C) (Castanier *et al.*, 2010; Gourzi *et al.*, 2007). Por otro lado, muchos virus alteran las respuestas inmunitarias innatas y de NF- κ B usando proteínas señuelo víricas multifuncionales que se dirigen a aspectos específicos de la vía de NF- κ B. Los virus, incluyendo el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I (VIH-I), el virus de la leucemia de linfocitos T humana de tipo 1 (HTLV-1), el herpesvirus 8 humano (HHV8) y el virus de Epstein-Barr (VEB), tienen incorporados aspectos de la señalización de NF- κ B en su ciclo vital y patogenicidad y por tanto, utilizan la activación de NF- κ B para promover su supervivencia (Hiscott *et al.*, 2006).

Por el contrario, parece razonable que la vía no canónica de NF- κ B se activa después de la infección por AAV porque se sabe que la activación de NF- κ B no canónica es importante para la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Gillmore, 2006) y los vectores AAV carecen de elementos genéticos estructurales complejos necesarios para desarrollar cualquier proteína señuelo similar a NF- κ B. La activación exacerbada de la vía no canónica se ha asociado con una gran variedad de trastornos inflamatorios, tales como la artritis reumatoide, colitis ulcerosa o linfomas de linfocitos B (Dejardin, 2006). Monarch-1, una proteína que contiene pirina expresada exclusivamente en células de linaje mieloide, suprime las citocinas y quimiocinas proinflamatorias mediante la inhibición de cinasa inductora de NF- κ B (NIK) necesaria para activar la vía de NF- κ B no canónica (Linch *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la activación de la vía de activación de NF- κ B no canónica da como resultado la maduración y la actividad de cebado de linfocitos T de DC que sobreexpresan un I κ B mutado que bloquea la vía clásica (Lind *et al.*, 2008). En ratones con amiloplasia (Aly) deficientes para NIK, se ve afectado el cebado cruzado de linfocitos T CD8+ para antígenos exógenos en DC, lo que sugiere la importancia de esta vía en la inmunidad adaptativa (Lind *et al.*, 2008). Los ratones deficientes para los componentes de la vía no canónica también son deficientes en el desarrollo y la homeostasia de órganos linfoides secundarios (Guo *et al.*, 2008). Se desconoce si la unión de AAV activa la señalización de NF- κ B a un receptor de la superficie celular. Estudios recientes han demostrado que puede desencadenarse la respuesta inmunitaria innata contra AAV a través de la vía de TLR9-MYD88 o mediante la activación del ligando CD40 en la superficie celular en modelos murinos *in vivo* (Zhu *et al.*, 2009; Mays *et al.*, 2009). Es interesante observar que aunque ambos se basan en la señalización aguas abajo de NF- κ B para montar una respuesta inmunitaria innata (Mineva *et al.*, 2007; Loiarro *et al.*, 2005), la activación de los receptores de la superfamilia de TNF, tales como CD40L, puede activar la vía de NF- κ B no canónica (Qing *et al.*, 2005).

Basándose en las pruebas de que la primera "señal de peligro" o "desencadenante" para la vigilancia inmunitaria dirigida contra vectores AAV puede ser la activación de la vía de señalización de NF- κ B alternativa, se razonó que el bloqueo transitorio de NF- κ B durante la administración del vector AAV podría deteriorar la respuesta inmunitaria del hospedador. Una posible estrategia para negar el cebado de NF- κ B mediante AAV es generar mutaciones dirigidas contra los sitios de unión a factor de transcripción sensibles a NF- κ B en las ITR de AAV. Sin embargo, dadas las funciones pleiotrópicas de las proteínas NF- κ B en la fisiología celular (Hayden y Ghosh, 2004), es posible que puedan encontrarse operativos factores de transcripción de unión a promotor de citocinas sensibles a NF- κ B en diferentes tipos celulares. Como alternativa, puede ser aplicable de manera universal un protocolo de inmunosupresión transitoria dirigido a la vía de NF- κ B. El inhibidor selectivo de NF- κ B, Bay11, puede reducir notablemente los marcadores de inflamación y la respuesta inmunitaria innata a los vectores AAV sin embargo no afecta a su expresión transgénica *in vivo*. Bay11 fue capaz de regular negativamente la actividad de varios reguladores clave, a saber, IL-1 α , IL-6, TNF α , IL-12 α , KC y RANTES, lo que sugiere el beneficio de usar este modulador farmacológico para regular negativamente de manera selectiva la respuesta inmunitaria inflamatoria e innata contra los vectores AAV. De forma interesante, NIK, que es crítico para la activación de la vía de NF- κ B no canónica, también se conoce por inducir la activación de IL-1 α , IL-6, IL-12 α , TNF α y RANTES en respuesta a varias infecciones víricas (DiPaolo *et al.*, 2009; Yanagawa y Onoe, 2006; Andreacos *et al.*, 2006; Habib *et al.*, 2001). Además, está de sobra reconocido que NIK es crucial para la activación y la función de las células presentadoras de antígenos profesionales quiescentes, las DC, cuya actividad es crítica para el cebado de los linfocitos T CD4+ colaboradores específicos de antígeno, lo que provoca respuestas inmunitarias contra dianas relevantes, tales como

el vector de suministro (Andreaskos *et al.*, 2006; Habib *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003; Brown y Lillicrap, 2002). *In vitro*, NIK aumenta la presentación de antígenos por DC activando potentemente a NF- κ B y por consiguiente, regulando positivamente la expresión de citocinas (TNF α , IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18), quimiocinas (IL-8, RANTES, proteína inflamatoria de macrófagos-1 α , proteína quimioatrayente de monocitos-1 y proteína quimioatrayente de monocitos-3), moléculas presentadoras de antígeno del MHC (clase I y II) y moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) (Andreaskos *et al.*, 2006). *In vivo*, NIK potencia las respuestas inmunitarias contra un antígeno codificado por un vector y los desvía hacia una respuesta inmunitaria T colaborador 1 con niveles aumentados de IgG2a, proliferación de linfocitos T, producción de IFN- γ y respuestas de linfocitos T citotóxicos con mayor potencia que el adyuvante completo de Freund (Andreaskos *et al.*, 2006). Bay11, usado en este estudio, previene la actividad de IKK α y β , que son los sustratos para NIK en la vía no canónica (Pierce *et al.*, 1997). Estos datos indican la elevada especificidad de Bay11 para dirigirse a la vía de NF- κ B no canónica, así como su capacidad para prevenir la activación de moduladores importantes de la respuesta inmunitaria.

Podría ser aplicable un protocolo de inmunosupresión transitoria dirigido a la vía de NF- κ B para limitar las toxicidades inmunológicas. De hecho, un informe reciente demostró la presentación de antígenos de la cápside de AAV mediante el uso de un inhibidor del proteasoma, Bortezomib [Velcade®] (Finn *et al.*, 2010). Bortezomib tiene una eficacia contra mielomas considerable (Kube y Srivastava, 1997) que se debe en gran medida a la represión de la señalización de NF- κ B. Por lo tanto puede ser posible bloquear de manera simultánea la presentación por el MHC I de señales de la cápside e inflamatorias o usar terapias dirigidas a NF- κ B más selectivas, tales como Bay11 en este estudio o los nuevos inhibidores de IKK a fin de potenciar adicionalmente la seguridad y la eficacia terapéutica de los vectores AAV.

EJEMPLO 3 - DESARROLLO DE VECTORES DE SEROTIPO AAV3 OPTIMIZADOS

El virus adenoasociado 2 (AAV2), un parvovirus humano no patógeno, contiene un genoma de ADN monocatenario y posee un amplio tropismo celular que trasciende a la barrera de especie (Muzyczka, 1992). Los vectores AAV2 recombinantes ha llamado la atención como sistema de vector prometedor para una terapia génica potencial de varias enfermedades humanas y en la actualidad se una en una serie de ensayos clínicos de terapia génica (Daya y Berns, 2008). Más recientemente, se han aislado varios serotipos de AAV adicionales y se ha demostrado que transducen eficazmente tipos celulares específicos (Muramatsu *et al.*, 1996; Chiorini *et al.*, 1997; Chiorini *et al.*, 1999; Rutledge *et al.*, 1998; Gao GP *et al.*, 2002; Vandenberghe *et al.*, 2004). Aunque se comprenden razonablemente bien las diversas etapas en el ciclo vital de AAV2 (Summerford y Samulski, 1998; Qing *et al.*, 1999; Summerford *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001; Sanlioglu *et al.*, 2000; Douar *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1996; Qing *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2008; McCarty *et al.*, 2004; Bainbridge *et al.*, 2008), se sabe menos acerca de los otros serotipos.

De los 10 serotipos de AAV comúnmente usados, se ha comunicado que AAV3 transduce escasamente células y tejidos (Zincarelli *et al.*; Zincarelli *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios recientes revelaron que los vectores AAV3 transducen líneas celulares establecidas de hepatoblastoma (HB) humano y de carcinoma hepatocelular (CHC) humano, así como hepatocitos humanos con una extremada eficacia (Glushakova *et al.*, 2009). Posteriormente, se documentó que la infección por AAV3 se inhibía fuertemente por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el ARNip específico para receptor de HGF (HGFR) y anticuerpos anti-HGFR, lo que sugiere que AAV3 utiliza HGFR como receptor/correceptor celular para la entrada vírica (Ling *et al.*, 2010).

La vía de ubiquitina-proteasoma desempeña un papel crucial en el tráfico intracelular de vectores AAV (Douar *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2000). Las cápsides de AAV2 intactas pueden fosforilarse en los restos de tirosina mediante la proteína tirosina cinasa receptora de factor de crecimiento epidérmico (EGFR-PTK) y la fosforilación de tirosinas de las cápsides de AAV afecta negativamente al tráfico intracelular y la expresión transgénica. Estas observaciones indujeron a sugerir que la fosforilación de tirosinas es una señal para la ubiquitinación de las cápsides de AAV, seguido de la degradación mediada por el proteasoma (Duan *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2008). Esto indujo a barajar la hipótesis de que las mutaciones de los restos de tirosina (Y) expuestos en la superficie a fenilalanina (F) podría permitir a los vectores esquivar la fosforilación, la ubiquitinación y la degradación mediada por el proteasoma. De hecho, las mutaciones de los restos de tirosina expuestos en la superficie en los vectores AAV2 ocasionó una transducción altamente eficiente a dosis menores tanto en células HeLa *in vitro* como en hepatocitos murinos *in vivo* (Zhong *et al.*, 2008). Se han obtenido niveles terapéuticos de expresión de factor IX humano en varias estirpes de ratón diferentes usando los vectores AAV2 mutantes de tirosina individuales y múltiples (Zhong *et al.*, 2008; Markusic *et al.*, 2010). Estudios adicionales han corroborado que mutaciones de Y a F similares en los serotipos de AAV 6, 8 y 9 también provocan una expresión aumentada del transgén (Petrus-Silva *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2010; Taylor y Ussher, 2010). Seis de los siete restos de tirosina expuestos en la superficie en AAV2 también se encuentran conservados en AAV3, pero su implicación en la transducción mediada por AAV3 no se ha evaluado.

Este ejemplo demuestra que: (i) la transducción mediada por vector AAV3 se aumenta drásticamente en células T47D, una línea celular de cáncer de mama humano que expresa niveles indetectables del hHGFR endógeno (Abella *et al.*, 2005) después de la transfección estable y la sobreexpresión de hHGFR; (ii) la actividad tirosina cinasa

asociada con hHGFR afecta negativamente a la eficacia de transducción de vectores AAV3; (iii) el uso de inhibidores del proteasoma mejora significativamente la transducción mediada por el vector AAV3; (iv) la mutagénesis dirigida al sitio de tres restos de tirosina expuestos en la superficie de la cápside de AAV3 ocasiona una eficacia mejorada de la transducción; (v) una combinación específica de dos mutaciones de tirosina mejora adicionalmente el alcance de la expresión transgénica; y (vi) los vectores AAV3 transducen eficazmente los tumores de HB y CHC en un modelo de xenoinjerto murino *in vivo*, después de la administración tanto intratumoral o sistémica. Estos vectores AAV3 optimizados proporcionan herramientas mejoradas para terapia génica y en particular, para la terapia del cáncer hepático en seres humanos.

10 MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y cultivos. Se adquirieron líneas celulares de cáncer de cuello de útero humano (HeLa) y de carcinoma hepatocelular (Huh7) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA, EE. UU.) y se mantuvieron en medio DMEM completo (Mediatech, Inc., Manassas, VA, EE. UU.) complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), penicilina y estreptomycin al 1 % (P/S, Lonza, Walkersville, MD, EE. UU.). Se mantuvo una línea celular de hepatoblastoma humano (Hep293TT) establecida (Chen *et al.*, 2009) en medio RPMI 1640 completo (Invitrogen, Camarillo, CA, EE. UU.) suplementado con FBS inactivado por calor al 15 % (Sigma-Aldrich), penicilina y estreptomycin al 1 % (P/S, Lonza, Walkersville, MD). Las células se cultivaron como cultivos adherentes en una atmósfera humidificada al 37 °C con CO₂ al 5 % y se subcultivaron tras el tratamiento con mezcla de tripsina-verseno (Lonza) durante 2-5 min a temperatura ambiente, se lavaron y se resuspendieron en medio completo. Una línea celular de cáncer de mama humana, T47D y células T47D transfectadas de manera estable con un plásmido de expresión de hHGFR (T47D+hHGFR), se mantuvieron en medio DMEM completo (Mediatech, Inc.) con o sin 600 µg/ml de G418, complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), penicilina y estreptomycin al 1 % (Lonza).

Plásmidos y vectores AAV recombinantes. El plásmido de empaquetado de AAV3 y el plásmido del vector AAV2-CBAp-EGFP recombinante fueron amablemente proporcionados, respectivamente, por los doctores R. Jude Samulski y Xiao Xiao, University of North Carolina en Chapel Hill, Chapel Hill, NC. Se empaquetaron reservas altamente purificadas de vectores scAAV2 y scAAV3 que contenían el gen de la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) dirigido por el promotor de β -actina de pollo (CHAp) mediante el protocolo de transfección de triple plásmido de fosfato de calcio (Wu *et al.*, 2007; Kube y Srivastava, 1997). Se determinaron los títulos de partículas físicas de las reservas de vector recombinante mediante análisis de transferencia en ranura de ADN cuantitativo (Kube y Srivastava, 1997).

Construcción de plásmidos de cápside de AAV3 mutantes en los restos de tirosina expuestos en la superficie.

Se llevó a cabo un procedimiento en dos etapas, basado en la mutagénesis dirigida al sitio QuikChange II® (Stratagene) usando el plásmido pAAV3 como se ha descrito anteriormente (Glushakova *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2010). Brevemente, en la etapa uno, se llevaron a cabo dos reacciones de extensión PCR en tubos separados para cada mutante. Un tubo contenía el cebador PCR directo y el otro contenía el cebador inverso (tabla 3).

En la etapa dos, se mezclaron las dos reacciones y se llevó a cabo la mutagénesis por la PCR convencional según las instrucciones del fabricante. Los cebadores de la PCR se diseñaron para introducir cambios de restos de tirosina a fenilalanina y un cambio silente para crear un nuevo sitio de endonucleasa de restricción con fines de exploración (tabla 3). Todos los mutantes se exploraron con la enzima de restricción adecuado y se secuenciaron antes de su uso.

TABLA 3
SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE LOS CEBADORES USADOS PARA LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA AL SITIO

Mutantes	Secuencias de cebador (5' a 3')
Y252F	ACCAGAACCTGGGCCTGCCCCACTTCAACAACCATCTCTACAAG (SEQ ID NO:11) - <i>ApaI</i> Tyr→Phe
Y272F	CAATCAGGAGCTTCAACGACAACCACTCTTTGGCTACAGCACC (SEQ ID NO:12) + <i>BstBI</i> Tyr→Phe
Y444F	CTTATGATCAGTATCTGTACTTCTCTGAACAGAACGCAAGGAACA (SEQ ID NO:13) + <i>ClaI</i> Tyr→Phe
F501Y	GCTAACGACAACAACAGTAACTATCCATGGACAGCGGCCAGCAAA (SEQ ID NO:14) Phe→Tyr + <i>NcoI</i>

Y701F TGG AATCCAGAGATT CAGTTCACCTCCA ACTACAACAAGTCTGTT (SEQ ID NO:15)
 Tyr→Phe +BmgBI

Y705F GAGATT CAGTACACCTCCA ACTTCAACAAGTCTGTTAATGTGGAC (SEQ ID NO:16)
 +A/I/III Tyr→Phe

Y731F GTGAACCTCGCCCTATTGGAACCCGGTTTCTCACACGAAACTTG (SEQ ID NO:17)
 Tyr→Phe

Los tripletes de codones se muestran en negrita; las fuentes en rojo indican las mutaciones de restos de tirosina a fenilalanina y las fuentes en verde indican las mutaciones silentes para eliminar/crear los sitios de enzimas de restricción (subrayados), que se usaron para identificar los clones deseados.

Ensayos de transducción de vector AAV. Se sembraron células Huh7 o HeLa en placas de 96 pocillos a una concentración de 5.000 células por pocillo en medio DMEM completo. Las infecciones con AAV se llevaron a cabo en medio DMEM aséptico y sin antibióticos. Se sembraron células Hep293TT en placas de 96 pocillos a una concentración de 10.000 células por pocillo en medio RPMI completo. Las infecciones se llevaron a cabo en medio RPMI aséptico y sin antibióticos. Se analizó la expresión de EGFP mediante obtención directa de imágenes de fluorescencia 72 h después de la transfección.

Análisis de transferencia Western. Se recogieron las células y se rompieron en un tampón de lisis de ensayo de radio-inmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, SDS al 0,1 %, NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,25 % y EDTA 1 mM con cóctel inhibidor de proteasa, NaF 1 mM y Na₃VO₄ 1 mM). Se midió la concentración de proteína total usando un reactivo de Bradford (Bio-Rad) y se resolvieron cantidades iguales (50 µg) de lisados de células completas mediante SDS-PAGE. Tras la electroforesis, se electrotransfirieron las muestras a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), se sondaron con anticuerpos primarios relevantes a 4 °C durante una noche, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.) y se detectaron con un sustrato quimioluminiscente potenciado (Amersham). Los anticuerpos contra fosfo-c-MET (Y1234/1235), c-Met total, fosfo-Akt (S473) y fosfo-ERK (T202/Y204) se adquirieron de Cell Signaling y el anticuerpo anti-β-actina (AC-74) se obtuvo de Sigma-Aldrich.

Estudios de transducción de vector AAV3 recombinante en modelos de xenoinjerto de ratón. Se inyectó a grupos de ratones NSG de 6 semanas de edad (Jackson Laboratories) por vía subcutánea 5 x 10⁶ células Hep293TT o Huh7. Cuatro semanas después de la inyección, se administraron los números indicados de genomas de vector AAV3 (vgs) tanto por vía intratumoral como a través de la vena caudal. Cuatro días después de la administración del vector, se reseccionaron los tumores, se seccionaron transversalmente y se evaluó su expresión de EGFP usando un microscopio de fluorescencia. También se tiñeron las secciones con DAPI para visualizar el núcleo celular. Todos los estudios animales se llevaron a cabo de acuerdo con las guías institucionales aprobadas.

Análisis Estadístico. Los resultados se presentan como media ± desviación típica (DT). Se identificaron las diferencias entre grupos usando una distribución de dos colas agrupadas-desemparejadas de la prueba de la T de Student. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

HGFR humano es necesario para la infectividad de AAV3. AAV3 utiliza el receptor de factor de crecimiento de hepatocitos humano (HGFR) como correceptor celular (Ling *et al.*, 2010). Para corroborar este hallazgo de manera inequívoca, se usó una línea celular de cáncer de mama humana, T47D, que expresa niveles indetectables de hHGFR (Abella *et al.*, 2005), así como células T47D transfectadas de manera estable con plásmidos de expresión de hHGFR (T47D+hHGFR) (Abella *et al.*, 2005). Se confirmó la expresión de la proteína hHGFR en la línea celular T47D+hHGFR establecida mediante análisis de transferencia de Western (véase la FIG. 12C). Se transdujeron números equivalentes de células T47D y T47D+hHGFR con diferentes multiplicidades de la infección (MOI) de vectores autocomplementarios (sc) AAV3-CBAp-EGFP en condiciones idénticas y la expresión del transgén se determinó 72 h después de la transducción. Estos resultados, mostrados en la FIG. 11A, documentan que la eficacia de transducción de vectores AAV3 es ~8-13 veces mayor en células que expresan hHGFR que en aquellas que no. La transducción mediada por vector AAV3 de células T47D+hHGFR puede bloquearse completamente en presencia de 5 µg/ml de hHGF (FIG. 11B). En conjunto, estos datos proporcionan pruebas definitivas de que la expresión en la superficie celular de hHGFR es necesaria para una transducción exitosa mediante vectores AAV3.

La inhibición de la actividad proteína tirosina cinasa de HGFR potencia la eficacia de la transducción de vectores AAV3. Para examinar si además del dominio extracelular, el dominio intracelular de HGFR, que contiene actividad de proteína tirosina cinasa, también está implicado en la infección de AAV3, se llevó a cabo un estudio adicional. La unión de su ligando, HGF, da como resultado la dimerización del receptor y la transfosforilación intermolecular de múltiples restos de tirosina en el dominio intracelular (Nguyen *et al.*, 1997). Se trataron células

T47D+hHGFR durante dos horas con concentraciones crecientes de un inhibidor de HGFR cinasa específico, BMS-77760707 (BMS) (Schroeder *et al.*, 2009; Dai y Siemann, 2010). Después, se infectaron las células con vectores scAAV3 a razón de 2.000 vgs/célula. Estos resultados se muestran en la FIG. 12A. Resulta evidente que el tratamiento con BMS-777607 produjo un aumento de ~2 veces en la eficacia de transducción de AAV3. Aunque el valor de p es mayor cuando se usó BMS-777607 a la concentración más elevada de 10 μ M, en comparación con la concentración menor de 1 μ M, este cambio se debe con total probabilidad a la toxicidad del fármaco. En estudios anteriores, se comunicó que el tratamiento con BMS-77760707 no tuvo un efecto significativo en el crecimiento celular a dosis de $\leq$ 1 μ M. Sin embargo, las dosis de 10 μ M dieron como resultado una reducción significativa en la proliferación celular, lo que sugiere que esta concentración es tóxica para las células (Dai y Siemann, 2010). En el experimento a continuación, a fin de descartar cualquier naturaleza no específica posible de este fármaco, se incluyeron como control las células T47D progenitoras. Se trató a ambos tipos celulares con BMS-777607 1 μ M durante 2 h y después se infectaron con vectores scAAV3 a 10.000 vg/célula. Los resultados, mostrados en la FIG. 12B, indican que aunque el tratamiento con BMS-77760707 potenció significativamente la infectividad de AAV3 en células T47D+hHGFR, no tuvo efecto en células T47D que carecen de expresión de hHGFR.

Para examinar si la inhibición de la HGFR cinasa provocó alteraciones en el estado de fosforilación de proteínas celulares específicas implicadas en la vía de señalización aguas abajo, se determinaron los niveles totales y de fosforilación de la proteína HGFR en lisados tanto de T47D como de T47D+hHGFR después de un periodo de incubación de 2 h. La activación de vías de señalización aguas abajo de HGFR cinasa, ERK1/2 y Akt, se analizaron usando anticuerpos específicos de fosforilación. Estos resultados, mostrados en la FIG. 12C, confirmaron que aunque se produce poca expresión de hHGFR en células T47D, el nivel de expresión es significativamente mayor en células T47D+hHGFR tanto para HGFR total como para HGFR fosforilado, lo que es coherente con los informes publicados con anterioridad (Abella *et al.*, 2005). El tratamiento de células T47D+hHGFR con BMS-777607 bloqueó completamente la fosforilación de HGFR, pero no el HGFR total. Además, el tratamiento con BMS-777607 no tuvo efecto en la expresión de AKT y ERK1/2 fosforiladas. Estos resultados sugieren que la potenciación de la infectividad del vector AAV3 mediante el tratamiento con BMS-777607 se debe a la inhibición de HGFR cinasa.

Hasta la fecha, solo se ha comunicado que AAV2 emplea hHGFR como correceptor (Yan *et al.*, 2002). Se desconocen los papeles del inhibidor de hHGFR y hHGFR cinasa en otros serotipos de AAV. Para descartar cualquier potenciación o transducción no específica mediante BMS-777607, se comparó la eficacia de transducción de otros serotipos de AAV, que no dependen de HGFR, así como vectores AAV2, después del tratamiento de células con BMS-777607. Estos resultados, mostrados en la FIG. 13, indican que mientras que los vectores AAV2 y AAV3 pueden transducir eficazmente células T47D+hHGFR, otros serotipos (AAV4-AAV9) solo pueden transducir estas células con una eficacia muy baja. Este resultado sugiere que hHGFR no está implicado en el ciclo vital de estos serotipos de AAV. El tratamiento de las células con BMS-777607 aumentó significativamente la eficacia de transducción de los vectores tanto AAV2 como AAV3, pero no otros serotipos de AAV, lo que sugirió que el efecto del tratamiento con BMS-777607 es específico para el serotipo de AAV.

Los inhibidores del proteasoma aumentan la eficacia de la transducción de vectores AAV3. Se ha demostrado en estudios previos que los inhibidores del proteasoma, tales como MG132, pueden mejorar significativamente la eficacia de transducción de los vectores AAV2, facilitando el tráfico intracelular (Zhong *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2002). Para evaluar si MG132 también puede mejorar el tráfico de AAV3 en células diana, se trató de manera simulada o con concentraciones crecientes de MG132 a células Huh7, una línea celular de carcinoma hepatocelular humano bien establecida (Nakabayashi *et al.*, 1982) y a células Hep293TT, una línea celular de hepatoblastoma humano recientemente establecida (Chen *et al.*, 2009). Después de un tratamiento de dos horas, se infectó a las células con vectores scAAV3-EGFP. Como control positivo, se incluyeron células HeLa tratadas con MG132 5 μ M y transducidas con vectores scAAV2. La expresión del transgén se determinó mediante microscopía de fluorescencia 72 h después de la transducción. Estos datos se muestran en la FIG. 14A y la FIG. 14B. Tal como se puede observar, el pretratamiento con MG132 aumentó significativamente la eficacia de transducción de los vectores scAAV2 en células HeLa, lo que es coherente con resultados anteriores (Zhong *et al.*, 2008). De forma interesante, se produjo un aumento dependiente de la dosis en la eficacia de la transducción de los vectores scAAV3 en células tanto Huh7 como Hep293TT después del tratamiento con MG132, lo que sugiere que los vectores AAV3 también sufren ubiquitinación, seguida de degradación mediada por el proteasoma.

Estudios previos también han demostrado que la inhibición de la señalización de EGFR-PTK mediante Tirfostin 23 (Tyr23), un inhibidor específico de EGFR-PTK (May *et al.*, 1998), modula la vía de Ub/proteasoma, lo que a su vez, facilita el tráfico intracelular y la expresión de transgénica mediada por vectores AAV2 (Zhong *et al.*, 2007). Se trató de manera simulada o con Tyr23 a células Hep293TT durante 2 h y se transdujeron con vectores scAAV3. Como controles adecuados, se incluyeron células HeLa pretratadas con Tyr23 y transducidas con vectores scAAV2. La expresión del transgén se determinó 72 h después de la transducción. Estos resultados, mostrados en la FIG. 14C y la FIG. 14D, indican que el tratamiento con Tyr23 provocó un aumento significativo en la eficacia de la transducción de vectores tanto scAAV2 como scAAV3. La expresión aumentada del transgén fue independiente de la entrada del vector, ya que no hubo diferencias significativas en las cantidades de ADN vírico internalizado en presencia o ausencia de MG132 o Tyr23. Estos resultados también corroboran además la implicación de la maquinaria de Ub/proteasoma de la célula hospedadora en el ciclo vital de los vectores AAV3.

La mutagénesis dirigida al sitio de los restos de Tyr expuestos en la superficie mejora significativamente la eficacia de la transducción de vectores scAAV3. En los ejemplos anteriores, los inventores han demostrado que hay siete restos de tirosina expuestos en la superficie (Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704 e Y730) en las cápsides de AAV2 que se fosforilan por EGFR-PTK y afectan negativamente a la eficacia de la transducción de vectores AAV2 (Zhong *et al.*, 2008). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cápsides de AAV2 y AAV3 indicó que seis de los siete restos de tirosina (Y252, Y272, Y444, Y701, Y705 e Y731) se encuentran conservados en la cápside de AAV3 (tabla 4).

TABLA 4
RESTOS DE TYR EXPUESTOS EN LA SUPERFICIE EN LAS CÁPSIDES DE AAV, Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA AL SITIO PARA CONVERTIRLOS EN RESTOS DE FENILALANINA

AAV2	AAV3
Y252	Y252→F
Y272	Y272→F
Y444	Y444→F
Y500	F501
Y700	Y701→F
Y704	Y705→F
Y730	Y731→F

Se muestran los restos de tirosina (Y) expuestos en la superficie en las cápsides de AAV2 y AAV3; las flechas indican las mutagénesis dirigidas al sitio de restos de Y a fenilalanina (F) en las cápsides de AAV3.

Un resto de tirosina, Y500 en AAV2, está presente como F501 en AAV3. Ya que se ha demostrado que las mutaciones de Y a F en varios serotipos de AAV potencian la expresión transgénica esquivando la ubiquitinación y la degradación mediada por el proteasoma (Zhong *et al.*, 2008; Petrs-Silva *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2010; Taylor and Ussher *et al.*, 2010), se razonó que la mutación de F501 de vuelta a un resto de tirosina podría reducir la eficacia de la transducción de vectores AAV3. Se comprobó esta hipótesis generando un vector AAV3 mutante en el que se sustituyó el resto de fenilalanina por un resto de tirosina (F501Y). Se comparó la eficacia de la transducción en el vector mutante con su homólogo de tipo silvestre (WT) AAV3 usando células Huh7 en condiciones idénticas. Como puede observarse en la FIG. 15A, se redujo el alcance de la expresión de transgén mediada por el vector mutante F501Y en ~50 %, en comparación con el vector WT AAV3.

Para comprobar adicionalmente la hipótesis de que las mutaciones de tirosina en las cápsides de AAV3 podrían provocar una reducción de la fosforilación mediada por EGFR-PTK, seguida de una ubiquitinación reducida y una degradación mediada por el proteasoma deteriorada que da como resultado una expresión transgénica aumentada, se modificaron los seis restos de tirosina expuestos en la superficie en las cápsides de AAV3 y se sustituyeron con restos de fenilalanina (tirosina-fenilalanina, Y-F). Cada uno de los vectores mutantes individuales que encapsidaban los genomas de scAAV2-CBAp-EGFP se pudieron empaquetar con éxito. Se determinaron los títulos de vector de los mutantes tanto por transferencias de ranura de ADN cuantitativas como por qPCR y no se observaron diferencias significativas en la eficacia de empaquetado. Se analizó la eficacia de transducción de cada uno de los vectores mutantes en las tirosinas y se comparó con el vector WT scAAV3-CBAp-EGFP en células tanto Huh7 (FIG. 15B) como Hep293TT (FIG. 15C) en condiciones idénticas. A partir de estos resultados, resulta evidente que la eficacia de la transducción de los tres vectores mutantes en las tirosinas (Y701F, Y705F y Y731F) es significativamente mayor con el vector WT scAAV3. Específicamente, la eficacia de la transducción del vector Y731F fue ~8 veces mayor que la del vector WT, seguido de los vectores Y705F (~3 veces) y Y701F (~2 veces).

Múltiples mutaciones en los restos de tirosina expuestos en la superficie mejoran adicionalmente la eficacia de la transducción de vectores AAV3.

En los ejemplos anteriores que implicaban vectores AAV2 con mutaciones Y-F, se observó que combinaciones específicas de las mutaciones individuales más eficaces de los restos de tirosina expuestos en la superficie aumentaron adicionalmente la eficacia de la transducción de vectores AAV2 (Markusic *et al.*, 2010). Para examinar si se puede lograr una mejora similar con vectores AAV3, se construyeron los siguientes vectores AAV3 dobles y triples mutantes: Y701+731F, Y705+731F e Y701+705+731F. Cada uno de estos vectores mutantes se empaquetó con títulos similares, según se determinó tanto con transferencias de ADN en ranura cuantitativas como con la qPCR. La eficacia de transducción de estos mutantes múltiples se comparó con los vectores WT y mutante individual Y731F AAV3 en células Huh7 en condiciones idénticas. Estos resultados se muestran en la FIG. 16A. Tal como se puede observar, mientras que la mutación Y731F aumentó significativamente la eficacia de transducción de vectores

AAV3, como se había observado anteriormente, solo una de las dobles mutaciones (Y705+731F) provocó un aumento significativo adicional en la expresión transgénica. De forma interesante, la eficacia de transducción tanto de los vectores dobles mutantes (Y701+731F) y los triples mutantes (Y701+705+731F) se redujo a niveles similares a los del vector WT AAV3. Después, se evaluó la transducción en células T47D y T74D+hHGFR de los mutantes de

Para examinar la posibilidad de si la eficacia de la transducción potenciada de los vectores mutantes Y-F se debía a la mejora de una o más funciones de receptor/correceptor celular putativo adicional, se usaron vectores WT, Y731F y Y705+731F scAAV3-CBAp-EGFP mutantes para transducir células Huh7 en ausencia o presencia de 5 µg/ml de hHGF en condiciones idénticas. Estos resultados se muestran en la FIG. 16C. Como resulta evidente, la presencia de hHGF inhibió drásticamente la eficacia de la transducción y de la expresión transgénica de los tres vectores AAV3, lo que es coherente con la interpretación de que los vectores mutantes en tirosina también utilizan hHGFR como receptor/correceptor celular para la entrada vírica.

Los vectores AAV3 transducen a tumores hepáticos humanos en modelos de xenoinjerto murinos. Para demostrar que los vectores AAV3 también pueden transducir tumores de HB y CHC humanos en un modelo de ratón de xenoinjerto *in vivo*, se inyectaron por vía subcutánea ~5 x 10⁶ células de CHC (Huh7) o HB (Hep293TT) en ratones NOD/Scid gamma (NSG). Cuatro semanas después, cuando los tumores eran claramente visibles y palpables en ambos grupos de animales, se inyectaron ~2 x 10¹⁰ vgs de vectores scAAV3-CBAp-EGFP directamente en los tumores. Cuatro días después de las inyecciones de vector, se extirparon los tumores y se examinaron secciones finas bajo un microscopio de fluorescencia. Estos resultados indicaron que los vectores AAV3 eran eficaces para transducir tumores tanto CHC (FIG. 17A) como HB (FIG. 17B) humanos *in vivo*. De manera coherente con los datos *in vitro*, la eficacia de la transducción de los vectores AAV3 fue mayor en tumores derivados de células Hep293TT que en los tumores derivados de células Huh7.

Los vectores AAV3 mutantes en tirosina optimizados son altamente eficaces para transducir tumores hepáticos humanos en xenoinjertos murinos. A continuación, se evaluaron *in vivo* adicionalmente los vectores AAV3 dobles mutantes en tirosina con mejor rendimiento para la transferencia génica en xenoinjertos de tumores hepáticos humanos. En el primer conjunto de estudios, se inyectaron por vía intratumoral ~5 x 10¹⁰ vgs de los vectores de tipo silvestre (WT) scAAV3 o Y705+731F-AAV3-CBAp-EGFP en ratones NSG que portaban tumores de HB (Hep293TT) humanos. Cuatro días después de las inyecciones de vector, se extirparon los tumores y se examinaron secciones finas bajo un microscopio de fluorescencia (FIG. 17C). Tal como se puede observar, los tumores a los que se inyectaron los vectores WT-AAV3 mostraron niveles detectables de expresión de EGFP. La eficacia de la transducción de los vectores AAV3 dobles mutantes en tirosina fue significativamente mayor, en comparación con los vectores WT AAV3, lo que es coherente con los datos *in vitro*.

En el segundo conjunto de estudios, se inyectaron a través de la vena caudal ~5 x 10¹¹ vgs del vector WT-scAAV3-CBAp-EGFP o del vector Y705+731F-scAAV3-CBAp-EGFP en ratones NSG que portaban tumores de HB humanos (Hep293TT). Como control adecuado se usaron inyecciones de suero salino tamponado con fosfato (PBS). Mientras que se produjo poca expresión transgénica en los tumores de ratones a los que se inyectó PBS (FIG. 18A), se pudo lograr un direccionamiento directo al tumor después de la administración sistémica de los vectores AAV3. Esta eficacia de la transducción de los vectores AAV3 mutantes en tirosina optimizados (FIG. 18C), nuevamente, fue significativamente mayor que la de los vectores WT AAV3 (FIG. 18B). Estos datos sugieren que el aumento de la eficacia de la transducción de los vectores AAV3 mutantes en la tirosina era independiente de la vía de administración del virus.

HGFR es una tirosina cinasa receptora transmembrana y la unión de su ligando, HGF, da como resultado la dimerización del receptor y la transfosforilación intermolecular de múltiples restos de tirosina en el dominio intracelular. (Liu *et al.*, 2008). Aunque es evidente que la cápside de AAV3 interactúa con el dominio extracelular de hHGFR, no es tan obvio si la unión de AAV3 a hHGFR también provoca la activación y fosforilación de las proteínas diana aguas abajo. De hecho, los datos demuestran que la supresión de la actividad de hHGFR-PTK provoca un modesto aumento en la expresión transgénica mediada por el vector AAV3. En este contexto, es interesante destacar que la eficacia de la transducción de los vectores AAV3 es significativamente mayor en una línea celular de hepatoblastoma humano (HB) recientemente establecida, Hep293TT, en comparación con la misma en una línea celular de HB, Huh6, que se estableció hace aproximadamente tres décadas. Aunque pueden existir diferencias sutiles entre las dos líneas celulares, se han identificado mutaciones específicas en el dominio de tirosina cinasa de hHGFR en las células Hep293TT, que la hace inactiva y que el inhibidor de cinasa específico de hHGFR, BMS-777607, que aumenta la eficacia de la transducción en células Huh6, tiene poco efecto en la eficacia de la transducción de AAV3 en células Hep293TT.

A pesar del uso de dos receptores de factor de crecimiento distintos como correceptores por AAV2 (hFGFR1) y AAV3 (hHGFR), los dos serotipos parecen compartir ciertas vías de entrada y tráfico intracelular después del receptor. Por ejemplo, ambas cápsides se fosforilan en los restos de tirosina por EGFR-PTK, posiblemente en los endosomas tardíos, seguido de ubiquitinación, lo que provoca la degradación mediada por el proteasoma. (Zhong *et*

al., 2008). Sin embargo, aunque 6 de las 7 tirosinas expuestas en la superficie en AAV2 se encuentran conservadas en AAV3, los patrones de comportamiento de los mutantes de Y-F correspondientes son hasta cierto punto divergentes. Por ejemplo, Y730F (para AAV2) e Y731F (para AAV3) son los mutantes individuales más eficaces, seguidos de Y444F (para AAV2) e Y705F (para AAV3), la eficacia de la transducción de Y444F (para AAV3) permanece inalterada. De manera similar, aunque la eficacia de la transducción del doble mutante Y730+444F (para AAV2) no es significativamente diferente a la de Y730F, la eficacia de la transducción del doble mutante Y705+731F (para AAV3) es significativamente mayor que la de Y731F. Asimismo, el triple mutante Y730+500+444F (para AAV2) es el más eficaz, el triple mutante Y731+501+705F (para AAV3) es el más eficaz, habiéndose ya mutado el resto Y501 en la cápside de WT AAV3. De forma interesante, incluso los vectores WT AAV3 fueron capaces de transducir tumores hepáticos humanos razonablemente bien en un modelo de xenoinjerto en ratones *in vivo* después de la inyección intratumoral. Sin embargo, se han aportado pruebas de que el vector mutante en la tirosina dio como resultado una mayor eficacia de transferencia génica *in vivo*.

El cáncer de hígado humano, especialmente el carcinoma hepatocelular, es uno de los tumores malignos más agresivos. El principal obstáculo para la supervivencia con CHC es la recurrencia tras la resección del CHC (Tang, 2005). Por lo tanto, es deseable la transducción del 100 % de las células a fin de eliminar completamente el tumor. En estudios previos, se observó que la melitina, un péptido tóxico procedente del veneno de abeja, inhibe la viabilidad y motilidad de las células de CHC tanto *in vitro* como *in vivo* mediante la supresión de la vía dependiente de Rac1 (Liu *et al.*, 2008) y la regulación positiva de la proteína de la membrana mitocondrial 7A6 (Zhang *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la melitina induce la apoptosis de células de CHC, potencialmente mediante la activación de la vía de señalización de CaMKII/TAK1/JNK/p38 (Wang *et al.*, 2009).

Basándose en estudios anteriores con vectores adenovíricos que contienen el gen para melitina dirigido por un promotor específico de células de cáncer de hígado tanto *in vitro* como *in vivo* (Ling *et al.*, 2005), este ejemplo proporciona vectores de AAV3-melitina mutantes en tirosina optimizados bajo el control de un promotor específico de células de cáncer de hígado que puede usarse para dirigirse de manera específica al cáncer de hígado tanto primario como metastásico.

EJEMPLO 4 - TRANSDUCCIÓN DE ALTA EFICACIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PROCEDENTES DE MONOCITOS HUMANOS MEDIANTE VECTORES AAV2 RECOMBINANTES CON LA CÁPSIDE MODIFICADA

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígenos (APC), que desempeñan un papel crucial en la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Las DC son APC únicas y se han denominado APC "profesionales", ya que la principal función de las DC es presentar antígenos y debido a que únicamente las DC tienen la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria primaria en los linfocitos T vírgenes quiescentes (Banchereau y Steinman, 1998). Aunque puede detectarse una respuesta inmunitaria antitumoral de origen natural en los pacientes, esta respuesta no logra controlar el crecimiento tumoral. Por otro lado, las DC procedentes de monocitos (moDC) generadas *ex vivo* en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4) poseen la capacidad de estimular a los linfocitos T específicos de antígeno tras la expresión endógena de los antígenos. (Chapuis *et al.*, 1997; den Brok *et al.*, 2005). Por este motivo, se han estudiado exhaustivamente las DC genéticamente modificadas y se han iniciado numerosos ensayos clínicos de fase I y II que evalúan la eficacia de las DC en pacientes con cáncer. (Figdor *et al.*, 2004; Palucka *et al.*, 2011). Sin embargo, los métodos actuales para la carga de DC son inadecuados en cuanto a la viabilidad celular, la incertidumbre relativa a la longevidad de la presentación de antígenos y a las restricciones por el haplotipo del paciente. (Palucka *et al.*, 2011).

La posibilidad de manipular los genomas víricos mediante técnicas biotecnológicas, junto con la reciente identificación de diversos antígenos asociados a tumores (TAA), ha despertado el interés en el uso de virus recombinantes para expresar TAA con la esperanza de inducir una respuesta inmunitaria antitumoral protectora en los pacientes. (Liu, 2010; Robert-Guroff, 2007). Entre los diferentes métodos para el suministro de genes, los vectores basados en el parvovirus humano, el virus adenoasociado de serotipo 2 (AAV2), han atraído gran atención principalmente debido a la naturaleza no patógena de este virus y a su capacidad para mediar la expresión génica terapéutica sostenida a largo plazo. (Daya y Berns, 2008; Mueller y Flotte, 2008; Srivastava, 2008). Se ha demostrado la transducción exitosa de diferentes subconjuntos de DC por diferentes serotipos de uso común de vectores AAV y se ha analizado la potencial ventaja de una vacuna antitumoral a base de AAV. (Pannazhagan *et al.*, 2001; Veron *et al.*, 2007; Mahadevan *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2008; Taylor y Ussher, 2010). Sin embargo, se necesitan mejoras adicionales en la transferencia génica mediante vectores AAV recombinantes a las DC en cuanto a la especificidad y la eficacia de la transducción para lograr un impacto significativo cuando se usan como vacuna antitumoral.

La proteína tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico celular (EGFR-PTK) tiene un impacto negativo en el transporte nuclear y la consiguiente expresión transgénica mediante vectores AAV2 recombinantes debido a la fosforilación de las cápsides en los restos de tirosina de la superficie. (Zhong *et al.*, 2007). Estos estudios dieron como resultado el desarrollo de vectores AAV2 recombinantes punteros que contenían mutaciones puntuales en los restos de tirosina expuestos en la superficie que transducen a diversas células y tejidos con una alta eficacia a dosis menores en comparación con el vector de tipo silvestre (WT). (Zhong *et al.*, 2008). Sin embargo, dichos vectores

mutantes en la tirosina individuales o múltiples no lograron aumentar la eficacia de la transducción de las DC procedentes de monocitos (moDC) en más de 2 veces, probablemente debido a los niveles de expresión y/o actividad más bajos de EGFR-PTK, en comparación con los de las células HeLa o los hepatocitos. (Taylor y Ussher, 2010).

Las serina/treonina proteína cinasas están implicadas en una gran variedad de procesos celulares, tales como la diferenciación, la regulación de la transcripción y el desarrollo de diversos tipos celulares, incluyendo las células inmunitarias. Dichas cinasas también pueden regular negativamente la eficacia de la transferencia génica mediada por vectores AAV recombinantes mediante la fosforilación de los restos de serina y/o treonina expuestos en la superficie de la cápside vírica y la redirección de los vectores hacia la degradación mediada por el proteasoma. En el presente ejemplo, se documentó lo siguiente: (i) La mutagénesis dirigida al sitio de los 15 restos serina (S) expuestos en la superficie de la cápside de AAV2 a restos de valina (V) ocasiona una eficacia mejorada de la transducción de los vectores mutantes S458V, S492V y S662V en comparación con el vector WT AAV2; (ii) El vector mutante S662V transduce de manera eficaz a las células dendríticas procedentes de monocitos humanos (moDC), un tipo celular no fácilmente susceptible a la transducción mediante los vectores AAV convencionales; (iii) La alta eficacia de transducción de moDC mediante el mutante S662V no induce cambio fenotípico alguno en estas células; y (iv) los vectores S662V recombinantes que codifican un gen de telomerasa humano truncado (hTERT), usado para transducir las DC, da como resultado una rápida proliferación clonal de linfocitos T específicos y la generación de CTL robustos, lo que provoca una lisis celular específica de células K562.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y anticuerpos. Se obtuvieron células HEK293, HeLa y NIH3T3 de la Colección Americana de Cultivos Tipo y se mantuvieron en forma de cultivos de monocapa en DMEM (Invitrogen) complementado con FBS al 10 % (Sigma) y antibióticos (Lonza). Las células mononucleares de sangre periférica procedentes de leucaféresis (PBMC) (AllCells) se purificaron en Ficoll-Paque (GE Healthcare), se resuspendieron en medio AIM-V asérico (Lonza) y se incubaron las fracciones de células semiadherentes durante 7 días con IL-4 humana recombinante (500 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml) (R&D Systems). La maduración de las células se inició con una mezcla de citocinas que incluía 10ng/ml de TNF- α , 10ng/ml de IL-1, 10 ng/ml de IL-6 y 1 mg/ml de PGE2 (R&D Systems) durante 48 h. Antes de la expresión de EGFP, se caracterizó la expresión de moléculas coestimuladoras de las células para asegurarse de que cumplieren con el fenotipo típico de las células dendríticas maduras (mDC) (CD80, RPE, IgG1 murina; CD83, RPE, IgG1 murina; CD86, FITC, IgG1 murina; Invitrogen). (Jayandharan *et al.*, 2011)

Mutagénesis dirigida al sitio. Se llevó a cabo una PCR en dos etapas con el plásmido pACG2 como se ha descrito anteriormente (Wang y Malcolm, 1999) usando Turbo *Pfu* Polimerasa (Stratagene). Brevemente, en la etapa uno, se llevaron a cabo dos reacciones de extensión PCR en tubos separados para el cebador de PCR directo e inverso durante 3 ciclos. En la etapa dos, se mezclaron las dos reacciones y se llevó a cabo una reacción PCR durante 15 ciclos adicionales, seguida de digestión con *DpnI* durante 1 h. Se diseñaron cebadores para introducir cambios de serina (TCA o AGC) a valina (GTA o GTC) para cada uno de los restos mutados.

Producción de vectores AAV recombinantes. Se generaron vectores AAV2 recombinantes que contenían el gen de EGFP dirigido por el promotor de β -actina de pollo, como se ha descrito anteriormente (Zologukhin *et al.*, 2002). Brevemente, se transfectaron células HEK293 usando polietilenimina (PEI, lineal, PM 25.000, Polysciences, Inc.). Setenta y dos horas después de la transfección, se recogieron las células y se purificaron los vectores mediante centrifugación de gradiente de iodixanol (Sigma) y cromatografía en columna de intercambio iónico (HiTrap Sp Hp 5 ml, GE Healthcare). Después, se concentró el virus y se intercambió el tampón en tres ciclos a solución de Ringer lactada usando concentradores por centrifugación (Apollo, corte de 150 kDa, 20 ml de capacidad, CLP) (Cheng *et al.*, 2011). Se trataron diez μ l del virus purificado con DNasa I (Invitrogen) durante 2 h a 37 °C, después, 2 h más con proteinasa K (Invitrogen) a 56 °C. La mezcla de reacción se purificó con fenol/cloroformo, seguido de tratamiento con cloroformo. El ADN empaquetado se precipitó con etanol en presencia de 20 μ g de glucógeno (Invitrogen). Se determinaron los títulos de partículas de AAV resistentes a DNasa I mediante RT-PCR con el siguiente par de cebadores, específicos para el promotor de CBA:

Directo 5'-TCCCATAGTAACGCCAATAGG-3' (SEQ ID NO: 18),
Inverso 5'-CTTGGCATATGATACACTTGATG-3' (SEQ ID NO: 19)
y mezcla maestra para PCR SYBR Green (Invitrogen) (Aslanidi *et al.*, 2009).

Ensayos de transducción de vectores AAV recombinantes in vitro. Se transdujeron células HEK293 o dendríticas procedentes de monocitos (moDC) con vectores AAV2 con 1.000 vgs/célula o 2.000 vgs/célula, respectivamente y se incubaron durante 48 h. Como alternativa, se pretrató a las células con 50 μ M de los inhibidores selectivos de serina/treonina cinasa, *terc*-butil éster-9 isopurina del ácido 2-(2-hidroxietilamino)-6-aminohexilcarbámico (para CaMK-II), antra[1,9-cd]pirazol-6(2H)-ona, 1,9-pirazoloantrona (para JNK) y 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol (para MAPK) (CK59, inhibidor 2 de JNK, PD 98059, Calbiochem), 1 h antes de la transducción. La expresión transgénica se evaluó como el área total de fluorescencia verde (pixel²) por campo visual (media $\pm$ DT) como se ha descrito con anterioridad (Markusic *et al.*, 2011; Jayandharan *et al.*, 2011). Se usó análisis de la varianza para comparar los resultados del ensayo y el control, que

se determinaron como estadísticamente significativos.

Análisis de transferencia de Western. Se llevó a cabo análisis de transferencia de Western como se ha descrito anteriormente. (Akache *et al.*, 2006). Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis que contenía TrisHCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 120 mM, Nonidet P-40 al 1 %, glicerol al 10 %, Na₄P₂O₇ 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF), EDTA 1 mM y EGTA 1 mM complementado con mezcla de inhibidores de proteasa y fosfatasa (Conjunto 2 y 3, Calbiochem). La suspensión se incubó sobre hielo durante 1 h y se aclaró por centrifugación durante 30 min a 14.000 rpm a 4 °C. Después de la normalización respecto de la concentración de proteína, se separaron las muestras usando electroforesis en poliacrilamida al 12 %/SDS, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpos primarios, mAb de conejo anti-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), mAb de conejo anti-p38 MAPK total y mAb de conejo anti-GAPDH (1:1000, CellSignaling), seguidos de anticuerpos secundarios ligados a peroxidasa de rábano picante (1:1000, CellSignaling).

Generación de linfocitos T citotóxicos específicos y ensayo de citotoxicidad. Se generaron células dendríticas procedentes de monocitos (moDC) como se ha descrito anteriormente. Las DC inmaduras se infectaron con vectores AAV2-S662V que codifican el ADNc de telomerasa humana, separado en dos ORF solapantes, hTERT838-2229 y hTERT2042-3454, a una MOI de 2.000 vgs/célula de cada uno. Después, se dejó que las células sufriesen estimulación con suplementos para inducir la maduración. Después de 48 h, se recogieron las DC maduras que expresaban hTERT y se mezclaron con las PBMC a una relación de 20:1. Las CTL se cultivaron en medio AIM-V que contenía IL-15 humana recombinante (20 UI/ml) e IL-7 (20ng/ml) a razón de 20 x 10⁶ células en matraces de 25 cm². Se añadieron citocinas frescas cada 2 días. 7 días después del cebado, se recogieron las células y se usaron para ensayos de eliminación (Heiser *et al.*, 2002). Se generó una curva de eliminación y se determinó la lisis celular específica mediante análisis FACS de las proporciones de células vivas/muertas como se ha descrito anteriormente (Mattis *et al.*, 1997). Como diana, se usó la línea celular de leucemia mielógena humana inmortalizada, K562.

Análisis Estadístico. Los resultados se presentan como la media $\pm$ DT. Se identificaron las diferencias entre grupos usando una distribución de dos colas agrupadas-desemparejadas de la prueba de la T de Student. Los valores de p < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La inhibición de serina/treonina cinasa celular específica aumenta la eficacia de la transducción de los vectores rAAV2. En estudios previos, se demostró que la inhibición de la actividad de proteína tirosina cinasa receptora del factor de crecimiento epidérmico celular (EGFR-PTK) y la mutagénesis dirigida al sitio de los 7 restos de tirosina expuestos en la superficie aumentaba significativamente la eficacia de la transducción de los vectores AAV2 impidiendo la fosforilación de estos restos, esquivando de este modo la ubiquitinación y la posterior degradación mediada por el proteasoma de los vectores (Zhong *et al.*, 2008). Sin embargo, las cápsides de AAV2 también contienen 15 restos de serina expuestos en la superficie, que potencialmente pueden fosforilarse por las serina/treonina cinasas celulares ampliamente expresadas en diversos tipos celulares y tejidos. Para contrastar la hipótesis de que la inhibición de dicha actividad cinasa puede impedir la fosforilación de los restos de serina expuestos en la superficie y de este modo mejorar el tráfico intracelular y el transporte nuclear de los vectores AAV2, se usaron varios inhibidores específicos disponibles comercialmente de serina/treonina cinasas celulares, incluyendo la proteína cinasa II dependiente de calmodulina (CamK-II), la cinasa N-terminal c-Jun (JNK); y la proteína cinasa activada por mitógeno (p38 MAPK). Se pretrataron células HEK293 con inhibidores específicos, tales como *terc*-butil éster-9 isopurina del ácido 2-(2-hidroxietilamino)-6-aminohexilcarbámico (para CamK-II), antra[1,9-cd]pirazol-6(2H)-ona, 1,9-pirazoloantrona (para JNK) y 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol (para p38 MAPK) durante 1 h a diversas concentraciones. Posteriormente, se transdujeron las células con vectores AAV2 tanto monocatenarios (ss) como autocomplementarios (Sc) a razón de 1.000 genomas de vector (vgs) por célula. Estos resultados indicaron que todos los inhibidores, a una concentración óptima de 50 μ M, aumentaron significativamente la eficacia de transducción de los vectores ssAAV2 y scAAV2, siendo el inhibidor de p38 MAPK el más eficaz (FIG. 19A y FIG. 19B). Esta observación sugiere, aunque no demuestra, que el aumento en la eficacia de la transducción se debía más probablemente a la prevención de la fosforilación de las cápsides del vector en lugar de a una síntesis de ADN mejorada de la segunda hebra vírica.

La mutagénesis dirigida al sitio de los restos de serina expuestos en la superficie en la cápside de AAV2 mejora la expresión transgénica mediada por vector de AAV2. La cápside de AAV2 contiene 50 restos de serina (S) en la región común de la proteína vírica 3 (VP3) de las tres VP de la cápside, de las cuales 15 (S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707, S721) se encuentran expuestas en la superficie. (Xie *et al.*, 2002). Cada uno de los 15 restos de S se substituyó por valina (V) mediante mutagénesis dirigida al sitio del modo descrito (Zhong *et al.*, 2008). La mayoría de los mutantes pudieron generarse a títulos similares a los de los vectores WT AAV2, con la excepción de S261V, S276V y S658V, que se produjeron con títulos ~10 veces menores y S267V y S668V, que no produjeron niveles detectables de partículas de vector resistentes a DNasa I. Los títulos de los mutantes de S468V y S384V fueron ~3-5 veces mayores que los de los vectores WT AAV2. Se evaluó la eficacia de transducción en células HEK293 de cada uno de los vectores mutantes de S-V. Estos resultados,

mostrados en la FIG. 20, indican que de los 15 mutantes, el mutante S662V transdujo a células HEK293 de un modo ~20 veces más eficaz que su homólogo WT. La eficacia de la transducción de los vectores mutantes S458V y S492V aumentó en ~4 y 2 veces, respectivamente. Las posiciones de estos tres restos de serina expuestos en la superficie críticos en la cápside de AAV2 se muestran en la FIG. 21A y la FIG. 21B. No se observó un aumento adicional en la eficacia de la transducción con los dobles mutantes (S458+662V y S492+662V) o el triple mutante (S458+492+662V), lo que indica que a diferencia de algunos de los mutantes de tirosina, la combinación de múltiples mutaciones en los restos de serina no era ni aditiva ni sinérgica. De forma interesante, la eficacia de la transducción de los mutantes S468V y S384V, que se produjeron a títulos mayores que los vectores WT AAV2, permaneció sin cambios (S468V) o se redujo ~10 veces (S384V) a la misma multiplicidad de infección (MOI). Estos datos se resumen en la FIG. 34.

La sustitución de S662 con diferentes aminoácidos tiene diversos efectos en el ensamblaje de la cápside de AAV2 y en la expresión transgénica mediada por vector AAV2. Además de la sustitución de S a V en la posición 662, también se generaron los 7 mutantes a continuación con diferentes aminoácidos: S662→Alanina (A), S662→Asparagina (N), S662→Ácido aspártico (D), S662→Histidina (H), S662→Isoleucina (I), S662→Leucina (L) y S662→Fenilalanina (F) y se evaluó su eficacia de transducción en células 293. Estos resultados, mostrados en la FIG. 22 y resumidos en la FIG. 35, demuestran que la sustitución de S con V dio lugar a la producción del mutante más eficaz sin cambio alguno en los títulos de vector. El reemplazo de S con N, I, L o F redujo la eficacia del empaquetado ~10 veces, sin un efecto significativo en la eficacia de la transducción, mientras que la sustitución de D o H aumentó la eficacia de la transducción ~8 veces y ~4 veces, respectivamente, sin efecto en los títulos de vector. De forma interesante, la sustitución de S a A aumentó el título vírico hasta ~5 veces y mejoró la expresión transgénica ~3 veces en comparación con el vector WT AAV2. La variabilidad observada en los títulos y la infectividad de los mutantes de serina en la posición 662 sugiere el papel crítico que desempeña cada uno de los aminoácidos en la modulación tanto de la eficacia de empaquetado como en la actividad biológica de AAV2.

La eficacia de la transducción de los vectores S662V se correlaciona con la actividad de p38 MAPK. Ya que todos los datos de expresión transgénica mediada por el vector S662V hasta ahora procedían de células 293, se extendieron estos estudios para incluir los siguientes tipos celulares: (i) NIH3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón), (ii) H2.35 (hepatocitos fetales de ratón), (iii) HeLa (células procedentes de cáncer de cuello de útero humanas) y (iv) células dendríticas procedentes de monocitos humanos (moDC). Se transdujeron estos tipos celulares con los vectores WT scAAV2-EGFP o S662V scAAV2-EGFP a una MOI de 2.000 vgs por célula en condiciones idénticas. Se evaluó la expresión génica de EGFP 48 h después de la infección (p.i.) para HeLa, 293 y moDC y 5 días p.i. para células H2.35 y NIH3T3. Estos resultados se muestran en la FIG. 23A. Tal como se puede observar, aunque las diferencias absolutas en la eficacia de transducción entre los vectores WT y S662V mutantes varió de ~3 veces (en células H2.35) a ~20 veces (en células 293), el vector mutante fue consistentemente más eficaz en cada tipo celular ensayado. Ya que el pretratamiento de las células con un inhibidor de p38 MAPK celular fue el más eficaz para aumentar la eficacia de la transducción (FIG. 19A y FIG. 19B), los inventores examinaron si las diferencias observadas en la eficacia de la transducción de los vectores WT y mutantes se debía o no a variaciones en los niveles de expresión y/o la actividad de la p38 MAPK celular. Se analizaron lisados celulares preparados a partir de cada tipo celular en transferencias de Western sondadas con anticuerpos específicos para detectar los niveles tanto de p38 MAPK total como de fosfo-p38 MAPK. Como control de carga se usó GAPDH. Estos resultados, mostrados en la FIG. 23B, indican que aunque los niveles de proteína p38 MAPK eran similares, la actividad cinasa, determinada mediante el nivel de fosforilación, varió significativamente entre los diferentes tipos celulares y la eficacia de la transducción del vector mutante S662V se correlacionó vagamente con la actividad de p38 MAPK. Estas correlaciones aproximadas entre la actividad de p38 MAPK y la eficacia del vector mutante S662V pueden explicarse probablemente por las diferentes susceptibilidades celulares a la infección con AAV, al número general de partículas víricas que entraron en la célula después de la infección primaria. Sigue sin aclararse qué etapas concretas en el ciclo vital de AAV se modulan mediante la fosforilación mediada por p38 MAPK. También es posible que otras serina/treonina cinasas contribuyan a la diferencia en la eficacia de la transducción por los vectores S662V y WT. De forma interesante, sin embargo, la transducción por los vectores WT-AAV2 no provocó la regulación positiva de p38 MAPK en células 293 o en moDC, lo que respalda un informe previo de que AAV no induce cambios fenotípicos robustos en moDC (Markusic *et al.*, 2011).

La transducción mediada por el vector S662V de moDC humanas primarias no provoca alteraciones fenotípicas. Los miembros de la familia de MAPK desempeñan papeles importantes en el desarrollo y la maduración de las APC. Se trataron moDC aisladas de leucaféresis de donantes sanos con inhibidores de cinasa selectivos 50 µM como se ha descrito anteriormente y después se transdujeron con vectores WT scAAV2-EGFP. Dos horas p.i., se trató a las células con suplementos (TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE2) para inducir la maduración. La expresión transgénica de EGFP se evaluó 48 h p.i. mediante microscopía de fluorescencia. El pretratamiento de las moDC con inhibidores específicos de JNK y p38 MAPK aumentó los niveles de expresión de EGFP ~2 veces y ~3 veces, respectivamente y se mejoró la eficacia de la transducción ~5 veces con los vectores mutantes S662V (FIG. 24). Ya que se ha informado previamente que la inhibición de estas cinasas impide la maduración de las células dendríticas (Beislev *et al.*, 2005; Nakahara *et al.*, 2006; Nakahara *et al.*, 2004; Harley, 2008), también se evaluó la capacidad del mutante S662V para inducir cambios fenotípicos en DC. Se infectó a moDC con una MOI cada vez mayor de hasta 50.000 vgs por célula, se recogieron a las 48 h p.i. y se analizaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) respecto de la regulación positiva de moléculas coestimuladoras de la superficie.

Los análisis por citometría de flujo de los marcadores de maduración de DC, tales como CD80, CD83 y CD86 indicaron que, de manera similar a los vectores WT AAV2, los vectores mutantes S662V tampoco indujeron la maduración de las moDC (FIG. 24C). Esta observación respalda la baja inmunogenicidad anteriormente descrita de los vectores AAV. (Shin *et al.*, 2008; Jayandharan *et al.*, 2011).

Generación de CTL específicos para hTERT mediante moDC transducidas con vectores AAV2-S662V. Ya que la expresión transgénica mediada por el vector AAV2 mutante en serina en moDC se mejoró significativamente en comparación con los vectores WT-AAV2, se examinó la capacidad de las moDC cargadas con S662V para estimular la generación de linfocitos T citotóxicos y efectuar la eliminación específica de la célula diana. Dado que la telomerasa humana se reconoce como una diana anticáncer única (Harley, 2008; Beatty y Vonderheide, 2008) expresada comúnmente en la mayoría de células cancerosas, se clonó un gen truncado de telomerasa humana (hTERT) bajo el control del promotor de β -actina de pollo y se empaquetó el ADN en el mutante AAV2 S662V. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no adherentes que contenían hasta un 25 % de células CD8 positivas una vez con moDC/hTERT suministrado por el vector S662V. Una línea celular de leucemia mielógena inmortalizada, K562, se usó para un ensayo de fluorescencia de dos colores de citotoxicidad mediada por células para generar una curva de eliminación con la relación celular efectora a diana posteriormente reducida. Los resultados de estos experimentos, mostrados en la FIG. 25, sugieren que las moDC cargadas con hTERT pueden estimular de manera eficaz la proliferación clonal de linfocitos T específicos y la actividad de eliminación, en comparación con moDC que expresan GFP. Por lo tanto, ya que son esenciales estrategias de inmunización que generen respuestas efectoras rápidas y potentes para una inmunoterapia eficaz, estos resultados respaldan la eficacia de los métodos de suministro basados en AAV para estudios de vacunación.

ANÁLISIS

Aunque se ha demostrado en diversos ensayos clínicos la posibilidad de que las células dendríticas modificadas genéticamente estimulen una respuesta de linfocitos T citotóxicos antitumorales específicos, no se ha desarrollado anteriormente un método fiable para la carga del antígeno terapéutico, el control de la expresión y la presentación de antígenos (O'Neill y Bhardwaj, 2007; Tacken *et al.*, 2007). Desde los primeros intentos de transducir células dendríticas con vectores ssAAV convencionales hace aproximadamente una década (Pannazhagan *et al.*, 2001), se han hecho progresos significativos en el aumento de la eficacia de la transducción de estos vectores. Por ejemplo, el desarrollo de vectores AAV autocomplementarios (scAAV) ha evitado una importante etapa limitante de la velocidad de la síntesis de la segunda hebra de ADN vírico, lo que aumenta drásticamente los niveles de expresión transgénica en diferentes subconjuntos de células dendríticas. (Shin *et al.*, 2008; Aldrich *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003). El suministro de antígeno a base de vector AAV a células dendríticas se ha utilizado con éxito para varios modelos de cáncer. (Mahadevan *et al.*, 2007; Eisold *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008).

La flexibilidad estructural natural de AAV y los componentes víricos reguladores promueven una rápida evolución molecular y la formación de numerosos serotipos serológicos distintos (Gao *et al.*, 2003; Vandenberghe *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006). Varios estudios han demostrado que se puede aprovechar dicha plasticidad de AAV para generar nuevos vectores con diferente tropismo celular y tisular (Wu *et al.*, 2000; Girod *et al.*, 1999). Otros estudios revelaron que la sustitución de un solo aminoácido en la cápside vírica puede afectar gravemente al título vírico, la interacción con el receptor celular, el tropismo celular y el tráfico desde el endosoma hasta el núcleo (Zhong *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2006). Wu *et al.* (2006) han comunicado que el reemplazo de lisina a glutamina en la posición 531 (K531E) en la cápside de AAV6 reduce la transferencia génica a hepatocitos de ratón *in vivo* y la afinidad por la heparina. La retromutación (E531K) en la cápside de AAV1 aumentó la transducción en hígado y confirió unión a heparina.

Los datos con los vectores de serotipo AAV2 indican que una sola sustitución de tirosina a fenilalanina (Y→F) mejora drásticamente el tráfico vírico desde el endosoma hasta el nucléolo, impidiendo la fosforilación de la cápside, la posterior ubiquitinación y la degradación por medio del proteasoma (Zhong *et al.*, 2008). Estos estudios han dado lugar a la generación de una serie de vectores con una eficacia de transducción aumentada en diferentes tipos celulares y tejidos. Dichos vectores se usaron para mejorar la transferencia génica de F.IX a hepatocitos murinos para la corrección fenotípica de la hemofilia B (Markusic *et al.*, 2011). Estos vectores AAV mutantes de tirosina también provocaron una alta eficacia de la transducción de la retina de ratón para el tratamiento potencial de enfermedades oculares (Peters-Zilva *et al.*, 2009). Aunque el serotipo AAV6 ha demostrado una mayor eficacia de la transducción que AAV2 en células dendríticas (Veron *et al.*, 2007; Taylor y Ussher, 2010), estos estudios se han centrado en AAV2 debido a que estos vectores se han estudiado más exhaustivamente tanto en investigación básica como en situaciones clínicas, pero sin embargo, los vectores AAV6 pueden desarrollarse con una estrategia similar a la descrita en el presente documento.

Es evidente que la fosforilación de los restos de tirosina expuestos en la superficie en las cápsides de AAV2 tiene un impacto negativo en la eficacia de la transducción de estos vectores, que puede aumentarse drásticamente mediante el uso de inhibidores específicos de EGFR-PTK celular, que se sabe que fosforila a estos restos (Zhong *et al.*, 2008). En el presente ejemplo, se detalló más completamente el papel de la fosforilación de los restos de serina en el ciclo vital de los vectores AAV2.

De hecho, pudo aumentarse la eficacia de la transducción de los vectores tanto ssAAV como scAAV mediante el

pretratamiento de las células con inhibidores específicos de JNK y p38 MAPK, lo que implica que uno o más restos de serina y treonina expuestos en la superficie en la cápside de AAV2 se fosforilan en el interior de la célula hospedadora y que esta modificación es perjudicial para el tráfico de la cápside al núcleo.

- 5 A continuación, se mutó individualmente cada uno de los 15 restos de serina expuestos en la superficie, pero solo tres de estas mutaciones provocó un aumento en la eficacia de la transducción en diferentes tipos celulares, que varió de ~2 veces a ~20 veces. Sin embargo, a diferencia de los mutantes de tirosina (Markusic *et al.*, 2011), la combinación de múltiples mutaciones no aumentó la eficacia de transducción ni de los vectores AAV2 dobles mutantes (S458+662V y S492+662V) ni del triple mutante (S458+492+662V) *in vitro*. En este contexto, es
10 destacable que en un estudio de DiPrimio *et al.*, (DiPrimio *et al.*, 2008), en el que se caracterizó el bucle HI ubicado entre las hebras H e I del barril β central conservado y contiene el resto S662, tanto la mutagénesis dirigida al sitio como las sustituciones de péptido demostraron que esta región de la cápside desempeña un papel crucial en el ensamblaje de la cápside de AAV y en el empaquetado del genoma vírico (FIG. 22A y FIG. 22B) (Xie *et al.*, 2002). Aunque no se usó específicamente como diana el resto S662 en estos estudios, la eficacia de la transducción de la mayoría de estos mutantes o bien no cambió o se redujo en hasta 27 veces. Se ha propuesto que el bucle HI, que
15 forma interacciones entre VP relacionadas con la simetría quintuple icosaédrica y se encuentra en la base de la depresión que rodea a este eje, sufre una reorganización conformacional que abre el canal ubicado en el eje quintuple icosaédrico después de la unión de AAV2 a heparina (Levy *et al.*, 2009). Los restos S458 y 492 están ubicados adyacentes entre sí (contribuido por las VP relacionadas con la simetría) en la superficie externa de las proyecciones (que rodean a los ejes triples icosaédricos) encarando a la depresión en los dos ejes dobles. La mutación previa de los restos adyacentes a S458A, S492A y S492T no tuvo efecto en el ensamblaje de la cápside y no dio como resultado un efecto en la eficacia de la transducción (Lochrie *et al.*, 2006), lo que confirma el papel crítico que desempeñan aminoácidos particulares en la eficacia de empaquetado y la actividad biológica de AAV. Los análisis estructurales adicionales de estos datos revelaron lo siguiente: Para los tres mutantes con bajos
20 rendimientos, la cadena lateral de los restos interactúa con átomos de la cadena principal del mismo monómero de VP y S267V con un bajo título, interactúa con D269 del mismo monómero. Para otra cápside mutante, S668V, que está ubicada en el bucle HI y se ha demostrado que desempeña un papel en el ensamblaje de la cápside (DiPrimio *et al.*, 2008), no se observó con la sustitución una disrupción evidente de la interacción. De forma interesante, todos estos restos, independientemente del fenotipo de ensamblaje, se encuentran en posiciones de la interfaz, pero solo
30 458 y 492 están implicados en interacciones entre VP. Los otros restos están implicados únicamente en las interacciones intra-VP, si los hay. Por lo tanto, es posible que los cambios en los mutantes con baja producción de cápside o sin cápside de como resultado un mal plegamiento para sus VP o la formación de multímeros necesaria para el ensamblaje cuando se cambian a alanina.
- 35 En una situación de inmunoterapia tumoral, el tiempo de la activación de linfocitos T y la potencia y longevidad de las respuestas de linfocitos T CD8 son factores cruciales a la hora de determinar el resultado terapéutico. Por lo tanto, los investigadores evaluaron además si el aumento de la eficacia de la transducción de moDC mediante los vectores AAV2 mutados en serina se correlacionó con un cebado superior de linfocitos T. Se usó la telomerasa humana como una diana específica ya que se ha demostrado en numerosos estudios y ensayos clínicos que es un candidato
40 atractivo para un antígeno de rechazo ampliamente expresado por muchos pacientes con cáncer (Harley, 2008; Beatty y Vonderheide, 2008). Estos resultados sugieren que la modificación de la cápside de AAV2 puede ser beneficiosa en cuanto a la producción de vectores más específicos y eficaces para el suministro de genes.

También es importante que uno de los obstáculos principales, la inducción de inmunocompetencia en las respuestas
45 inmunitarias celulares contra los epítomos procedentes del vector y procedentes del transgén, puede superarse probablemente no solo mediante la deficiencia para replicación y ausencia de proteínas víricas expresadas por AAV2 recombinante, sino también por el hecho de que se generará menos cápside de las partículas víricas modificadas por los proteasomas del hospedador y por lo tanto, proporcionan menos cantidad de material para su presentación.

50 EJEMPLO 5 -- OPTIMIZACIÓN DE LA CÁPSIDE DE VECTORES RAAV2

En la actualidad se usan vectores de virus adenoasociados (AAV) en una serie de ensayos clínicos de fase I/II como vehículos de suministro para dirigirse a varios tejidos para lograr la expresión sostenida de genes terapéuticos (Daya y Berns, 2008; Mueller y Flotte 2008; Srivastava 2008; Asokan *et al.*, 2012; Flotte *et al.*, 2012). Sin embargo, se
55 necesitan grandes dosis de vector para lograr beneficios terapéuticos. La necesidad de cantidades suficientes del vector suponen un reto de producción, así como un riesgo de iniciar la respuesta inmunitaria del hospedador contra el vector (High y Aubourg, 2011; Mendell *et al.*, 2012; Mingozzi y High, 2011). Más específicamente, inicialmente se usaron vectores recombinantes basados en el serotipo AAV2 en un ensayo clínico para la terapia génica potencial de la hemofilia B, pero en este ensayo, no se logró un nivel de expresión terapéutico del factor IX humano (hF.IX) a
60 dosis más bajas del vector y a dosis mayores del vector, el nivel de expresión terapéutico de hF.IX tenía una vida corta debido a una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra las cápsides de AAV2 (Manno *et al.*, 2006; Mingozzi y High, 2007; Mingozzi *et al.*, 2007).

65 En un ensayo más reciente con vectores recombinantes basados en el serotipo AAV8, se lograron niveles terapéuticos de expresión de hF.IX, pero se observó una respuesta inmunitaria contra proteínas de la cápside de

AAV8 (Aslanidi *et al.*, 2012). Por lo tanto, resulta crucial desarrollar nuevos vectores AAV con una alta eficacia de la transducción que puedan usarse a dosis más bajas. La proteína tirosina cinasa receptora del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-PTK) afecta negativamente a la expresión transgénica a partir de vectores AAV2 recombinantes, debido principalmente a la fosforilación de las cápsides de AAV2 en los restos de tirosina y a que las cápsides fosforiladas en la tirosina se degradan posteriormente por la maquinaria proteasómica del hospedador (Zhong *et al.*, 2008; Markusic *et al.*, 2010). Los inhibidores selectivos de las serina/treonina cinasas JNK y p38 MAPK también mejoraron la eficacia de la transducción de los vectores AAV2, lo que sugiere que la fosforilación de ciertos restos de serina y/o treonina expuestos en la superficie también podría reducir la eficacia de la transducción de estos vectores. Estos estudios propiciaron el desarrollo de vectores AAV2 mutantes en tirosina y serina, que se ha demostrado que transducen varios tipos celulares con una eficacia significativamente mayor que los vectores WT. (Aslanidi *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2008; Markusic *et al.*, 2010; Petrs-Silva *et al.*, 2009). Además de los restos de tirosina y serina, la eliminación de restos de treonina expuestos en la superficie mediante mutagénesis dirigida al sitio también propició un aumento en la eficacia de la transducción a dosis más bajas del vector. En este ejemplo, se sustituyó cada uno de los 17 restos de treonina expuestos en la superficie por restos de valina (V) mediante mutagénesis de sitio dirigido y cuatro de estos mutantes, T455V, T491V, T550V, T659V, demostraron aumentar la eficacia de la transducción entre ~2-4 veces en células HEK293 humanas. Ya que el vector triple mutante de tirosina (Y730F+500+444F) transdujo a hepatocitos murinos de manera más eficaz que WT (Aslanidi *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2008; Markusic *et al.*, 2010; Petrs-Silva *et al.*, 2009), se combinaron posteriormente estas mutaciones con el mutante individual de serina con mejor rendimiento (S662V) y el mutante de treonina individual (T491V) para generar los siguientes vectores: dos cuádruples (Y444+500+730F+S662V; Y730+500+44F+T491V) y uno quintuple (Y444+500+730F+S662V+T491V). El vector cuádruple mutante (Y444+500+730F+T491V) transdujo de manera eficaz una línea celular de hepatocitos murinos *in vitro* así como hepatocitos murinos primarios *in vivo* a dosis reducidas, lo que implica que el uso de estos vectores en terapia génica en humanos en general y en la hemofilia en particular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células. Se obtuvieron la línea celular HEK293 de riñón embrionario humano y las células H2.35 de hepatocitos murinos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA, EE. UU.) y se mantuvieron como cultivos de monocapas en DMEM (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS; Sigma) y antibióticos (Lonza).

Producción de vectores recombinantes. Se generaron vectores AAV2 recombinantes que contenían o el gen de EGFP (scAAV2-GFP) o el de luciferasa de luciérnaga (Fluc) (ssAAV2-Fluc) dirigidos por el promotor de β -actina de pollo (CBA) como se ha descrito anteriormente (Aslanidi *et al.*, 2012; Aslanidi *et al.*, 2009; Zolotukhin *et al.*, 2002; Kohlbrenner *et al.*, 2005). Brevemente, se transfectaron células HEK293 usando polietilenimina (PEI, lineal, PM 25.000, Polysciences, Inc.). Setenta y dos horas después de la transfección, se recogieron las células y se purificaron los vectores mediante centrifugación de gradiente de iodixanol (Sigma) y cromatografía en columna de intercambio iónico (HiTrap Sp Hp 5 ml, GE Healthcare). Después, se concentró el virus y se intercambió el tampón en tres ciclos a solución de Ringer lactada usando concentradores por centrifugación (Apollo, corte de 150 kDa, 20 ml de capacidad, CLP). Para determinar los títulos de genoma, se incubaron diez μ l de virus purificado con DNasa I (Invitrogen) a 37 °C durante 2 h, después con proteinasa K (Invitrogen) a 55 °C durante 2 h adicionales. La mezcla de reacción se purificó mediante fenol/cloroformo, seguido de extracción con etanol. El ADN empaquetado se precipitó durante una noche con etanol en presencia de 20 μ g de glucógeno (Invitrogen). Se determinaron los títulos de partículas de AAV2 resistentes a DNasa I mediante qPCR con los siguientes pares de cebadores específicos para el promotor CBA:

Directo: 5'-TCCCATAGTAACGCCAATAGG-3' (SEQ ID NO: 20),
Inverso: 5'-CTTGGCATATGATACACTTGATG-3' (SEQ ID NO: 21),
y mezcla maestra para PCR SYBR GreenER (Invitrogen) (Aslanidi *et al.*, 2012; Aslanidi *et al.*, 2009).

Mutagénesis dirigida al sitio. Se llevó a cabo una PCR en dos etapas con el plásmido pACG2 como se ha descrito anteriormente (Aslanidi *et al.*, 2012; Wang y Malcolm, 1999) usando Turbo *Pfu* Polimerasa (Stratagene). Brevemente, en la etapa uno, se llevaron a cabo dos reacciones de extensión PCR en tubos separados para el cebador de PCR directo e inverso durante 3 ciclos. En la etapa dos, se mezclaron las dos reacciones y se llevó a cabo una reacción PCR durante 15 ciclos adicionales, seguida de digestión con *DpnI* durante 1 h. Se diseñaron cebadores para introducir cambios de treonina (ACA) a valina (GTA) para cada uno de los restos mutados.

Ensayos de transducción de vectores AAV recombinantes *in vitro*. Se transdujeron HEK293 humanas con 1×10^3 vgs/célula y las células H2.35 de hepatocitos humanos se transdujeron con 2×10^3 vgs/célula con vectores WT y mutantes scAAV2-GFP, respectivamente y se incubó durante 48 h. La expresión transgénica se evaluó como el área total de fluorescencia verde (pixel²) por campo visual (media $\pm$ DT) como se ha descrito con anterioridad (Aslanidi *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2008; Markusic *et al.*, 2010). Se usó análisis de la varianza para comparar los resultados del ensayo y el control, que se determinaron como estadísticamente significativos.

Análisis de la distribución genómica del vector en las fracciones citoplasmáticas y nucleares.

Se infectaron aproximadamente 1×10^6 células H2.35 con vectores WT o mutantes scAAV2-GFP con una MOI de 1×10^4 vgs/célula. Se recogieron células en diversos instantes mediante tratamiento con tripsina para retirar cualquier partícula vírica adsorbida o no adsorbida y después se lavaron exhaustivamente con PBS. Las fracciones nucleares y citoplasmáticas se separaron con el kit de reactivos de extracción nuclear y citoplasmática (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se extrajo el genoma vírico y se detectó mediante análisis de qPCR con los cebadores específicos para CBA descritos anteriormente. La diferencia en la cantidad de genoma vírico entre las fracciones citoplasmáticas y nucleares se determinó mediante la regla siguiente: Los valores de C_T para cada muestra de las células tratadas con virus se normalizaron al C_T correspondiente de las células tratadas de manera simulada (ΔC_T). Para cada conjunto de muestras emparejadas, se calculó el múltiplo de cambio en la presencia de genoma empaquetado como múltiplo de cambio = $2^{-(\Delta C_T\text{-citoplasma} - \Delta C_T\text{-núcleo})}$. Los datos de tres experimentos independientes se presentaron como porcentaje de la cantidad total de genoma empaquetado en las fracciones nucleares y citoplasmáticas.

Obtención de imágenes de bioluminiscencia in vivo. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según las políticas institucionales y los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios de la National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Se hizo todo lo posible para minimizar el sufrimiento. Se inyectó por vía intravenosa a ratones C57BL/6 macho de diez semanas de edad (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 1×10^{10} vgs/animal de vectores WT y mutantes ssAAV2-Fluc ($n = 3$). La actividad de luciferasa se analizó dos semanas después de la inyección usando un sistema Xenogen IVIS Lumina (Caliper Life Sciences). Brevemente, se anestesió a los ratones con isoflurano al 2 % y se les inyectó sustrato de luciferina por vía intraperitoneal (luciferina de escarabajo, Caliper Life Sciences) a una dosis de 150 µg/g de peso corporal. Se colocó a los ratones en una cámara de luz y se recogieron imágenes a los 5 min después de la inyección de sustrato. Las imágenes se analizaron mediante el programa informático Living Image 3.2 (Caliper Life Sciences) para determinar la intensidad relativa de la señal.

Visualización de la posición de los restos mutantes en la cápside de AAV2. Se descargaron las coordenadas atómicas para la estructura cristalina de VP3 de AAV2 (restos 217 a 735, numeración de VP1) (n° de referencia de Protein Data Bank (PDB) 11p3; [Xie *et al.*, 2002]) y se usaron para generar un modelo completo de la cápside usando la aplicación de generador de oligómero en VIPERdb (Carrillo-Trip *et al.*, 2009). Esto genera 60 copias de VP3 para crear la cápside icosaédrica $T = 1$ mediante multiplicación de la matriz. La estructura se visualizó con el programa COOT (Xie *et al.*, 2002) y se generaron las figuras usando cualquiera de los dos programas informáticos, PyMOL (Schrodinger, LLC) y RIVEM (Xiao y Rossman, 2007).

Análisis Estadístico. Los resultados se presentan como la media $\pm$ DT. Se identificaron las diferencias entre grupos usando una distribución de dos colas agrupadas-desemparejadas de la prueba de la t de Student. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Mutagénesis dirigida al sitio de restos de treonina expuestos en la superficie de la cápside de AAV2. La cápside de AAV2 contiene 45 restos de treonina (T) en la región común de la proteína vírica 3 (VP3) de la cápside de las tres VP de la cápside, VP1, VP2 y VP3. Diecisiete de estas (251, 329, 330, 454, 455, 503, 550, 592, 581, 597, 491, 671, 659, 660, 701, 713, 716) se encuentran expuestas en la superficie. (Xie *et al.*, 2002). Cada uno de los 17 restos de T se sustituyó por valina (V) mediante mutagénesis dirigida al sitio del modo descrito anteriormente (Aslanidi *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2008). La mayoría de los mutantes pudieron generarse a títulos similares a los de los vectores WT AAV2, con la excepción de T329V y T330V, que se produjeron con títulos ~ 10 veces menores y T713V y T716V, que no produjeron niveles detectables de partículas de vector resistentes a DNasa I. Se evaluó la eficacia de transducción en células HEK293 de cada uno de los vectores mutantes de T-V. Estos resultados, mostrados en la FIG. 26A y la FIG. 26B, indican que de los 17 mutantes, el mutante T491V transdujo a células HEK293 de un modo ~ 4 veces más eficaz que su homólogo WT. La eficacia de la transducción de los vectores mutantes T455V, T550V, T659V aumentó ~ 2 veces. Estos datos indicaron que la fosforilación de restos específicos de tirosina, serina y treonina en la cápside de AAV2 por cinasas celulares es un determinante crítico de la eficacia de la transducción de estos vectores.

Múltiples mutaciones de los restos de treonina expuestos en la superficie mejoran adicionalmente la eficacia de transducción de los vectores AAV2. Para evaluar si podía mejorarse adicionalmente la eficacia de la transducción de los vectores AAV2 mutantes en treonina, se generaron los siguientes vectores múltiples mutantes a continuación: tres dobles mutantes (T455+491V; T550+491V; T659+491V), dos triples mutantes (T455+491+550V; T491+550+659V) y un cuádruple mutante (T455+491+550+659V). Cada uno de los vectores mutantes múltiples empaquetó títulos de genomas similares a los vectores WT AAV2. En comparaciones de lado a lado, se demostró que cada uno de los vectores mutantes múltiples transducen a HEK293 de manera más eficaz que los vectores WT y el mutante de treonina individual AAV2 (FIG. 27A y FIG. 27B). Se identificó que el vector con mejor rendimiento era el mutante triple (T491+550+659V) con una eficacia de la transducción ~ 10 veces mayor que el vector WT y ~ 3 veces mayor que el mejor vector mutante individual (T491V). Estos datos confirmaron que la combinación de varias mutaciones de treonina en una sola cápside vírica ocasionó un efecto sinérgico en el aumento de la eficacia de la

transducción.

Los vectores AAV2 mutantes en treonina optimizados transducen de manera eficaz hepatocitos murinos *in vitro*. Se ha demostrado que el vector triple mutante de tirosina (Y444+550+730F) descrito en los ejemplos anteriores es eficaz para transducir hepatocitos murinos en una comparación de vectores que contiene hasta 7 cambios en la superficie de tirosina a fenilalanina (Markusic *et al.* 2010; Jayandharan *et al.*, 2011). Por lo tanto, resultó interesante evaluar si la combinación de las mutaciones con mejor rendimiento de serina individual (S662V) y de treonina individual (T491V) podía aumentar adicionalmente la eficacia de la transducción de estos vectores para producir vectores de expresión mejorados adicionalmente de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Para ese fin, se generaron como se expone a continuación varios mutantes múltiples: dos vectores mutantes cuádruples (Y444+500+730F+T491V; Y444+500+730F+S662V) y uno quintuple (Y444+500+730F+T491V+S662V). La comparación de la eficacia de transducción de estos mutantes con los vectores AAV2 WT y triple mutantes de tirosina en células H2.35 demostró que el nivel de expresión del mutante Y444+500+730F+T491V era ~2-3 veces mayor que para el vector AAV2 triple mutante de tirosina y ~24 veces mayor que el vector WT AAV2 (FIG. 28A y FIG. 28B). De forma interesante, la combinación de la mutación S662V con el vector triple mutante de tirosina o con el vector cuádruple mutante de tirosina-treonina, afectó negativamente a su eficacia de transducción. La adición de varias mutaciones de treonina diferentes, tales como T550V y T659V, tampoco aumentó la eficacia de la transducción del vector AAV2 cuádruple mutante Y444+500+730F+T491V. Se requieren estudios adicionales para lograr una mejor comprensión de las complejas interacciones entre estos restos de Y, S y T expuestos en la superficie, así como de su estado de fosforilación.

Múltiples mutaciones potencian el tráfico intracelular y la traslocación nuclear de los vectores AAV2. La prevención de la fosforilación de los restos de tirosina expuestos en la superficie en la cápside de AAV2 mejoró el tráfico intracelular de los vectores mutantes en tirosina y aumenta el número de los genomas víricos traslocados al núcleo (Zhong *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2008). En este ejemplo, se asignó la adición del mutante T491V al vector triple mutante de tirosina por su capacidad para aumentar esta eficacia de transducción aumentando adicionalmente el transporte nuclear de estos vectores. Para este fin, se evaluó la cinética de la expresión transgénica en células H2.35 mediada por el cuádruple mutante Y444+500+730F+T491V y se comparó con los vectores triples mutantes Y444+500+730F y WT AAV2. Estos resultados se muestran en la FIG. 29A y la FIG. 29B. Tal como se puede observar, la expresión de EGFP a partir del vector cuádruple mutante de tirosina-treonina fue ~2-3 veces mayor en cada punto de tiempo ensayado y se pudo detectar tan temprano como a las 16 h después de la infección. Estos resultados sugirieron que el inicio temprano de la expresión transgénica a partir de los vectores cuádruples mutantes podía deberse a un transporte nuclear más eficaz de estos vectores. Para probar experimentalmente esta posibilidad, se usó análisis qPCR para cuantificar los genomas de vector en las fracciones citoplasmáticas y nucleares de células H2.35 infectadas con los vectores WT y los dos mutantes AAV2 en diferentes puntos de tiempo. Las relaciones de genoma de vector en las dos fracciones celulares se muestran en la FIG. 30A y la FIG. 30B. Mientras que ~20 % de los genomas de los vectores WT AAV2 y ~45 % de los genomas de los vectores triples mutantes se detectaron en la fracción nuclear 16 h después de la infección, más de un 70 % de los genomas del vector del cuádruple mutante se detectaron en el mismo punto de tiempo. De manera similar, solo ~45 % de los genomas de los vectores WT AAV2 se detectaron en la fracción nuclear 48 h después de la infección, ~80 % de los genomas de los vectores triples mutantes y ~90 % de los genomas del vector cuádruple mutante se detectaron en la fracción nuclear en el mismo punto de tiempo. Por lo tanto, estos datos corroboraron la hipótesis de que la combinación de la mutación de treonina (T491V) con el vector triple mutante de tirosina (Y444+500+730F) provoca una mejora modesta en la translocación nuclear de estos vectores, que se correlacionó con una aparición más rápida de la expresión génica y la mejora observada en la eficacia de la transducción.

Los vectores AAV2 optimizados son altamente eficaces para transducir hepatocitos murinos *in vivo*. Se evaluó la eficacia de transducción de los vectores AAV2 optimizados en un modelo murino *in vivo*. Cada uno de los vectores mutantes múltiples se empaquetó con un solo genoma de AAV2 de luciferasa de luciérnaga monocatenario (Fluc) y se inyectaron ~1 x 10¹⁰ vgs de cada vector por vía intravenosa en ratones C57BL/6 (n = 3 para cada grupo). Los niveles de expresión del gen Fluc, evaluado dos semanas después de la inyección mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia, demostró que la expresión del vector cuádruple mutante Y444+500+730F+T491V fue ~3 veces mayor que el del vector triple mutante de tirosina. Se presenta un animal representativo de cada grupo y la cuantificación de estos datos en la FIG. 31A y la FIG. 31B. De manera coherente con los datos obtenidos *in vitro*, la adición de la mutación S662V tuvo un efecto negativo en la eficacia de la transducción de los vectores tanto triples mutantes de tirosina como cuádruples mutantes de tirosina-treonina. Las mutaciones individuales y múltiples de las proteínas de la cápside a modo de ejemplo de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las ilustradas en la tabla 5:

TABLA 5
RESUMEN DE LAS MUTACIONES A MODO DE EJEMPLO DE LOS RESTOS DE TIROSINA (Y), SERINA (S) Y
TREONINA (T) EXPUESTOS EN LA SUPERFICIE DE LA CÁPSIDE DE AAV2

Mutaciones individuales	Mutaciones dobles	Mutaciones triples	Mutaciones múltiples
Y252F	Y252F+Y730F	Y444+500+730F	Y272+444+500+730F
Y272F	Y272F+Y730F	Y730F+S662V+T491V	Y272+444+500+730F
Y444F	Y444F+Y730F	S458+492+662V	Y272+444+500+730F
Y500F	Y500F+Y730F	T455+550+491V	Y272+444+500+700+730F
Y700F	Y700F+Y730F	T550+659+491V	Y272+444+500+704+730F
Y704F	Y704F+Y730F		Y252+272+444+500+704+730F
Y730F	Y444F+T550F		Y272+444+500+700+704+730F
S261V	S458V+S492V		Y252+272+444+500+700+704+730F
S264V	S458V+S662V		Y444+500+730F+T491V
S267V	S492V+S662V		Y444+500+730F+S458V
S276V	T455+T491V		Y444+500+730F+S662V+T491V
S384V	T550+T491V		Y444+500+730F+T550+T491V
S458V	T659+T491V		Y444+500+730F+T659+T491V
S468V	T671+T491V		
S492V	Y730F+T491V		
S498V	S662V+T491V		
S578V	Y730F+S662V		
S658V			
S662V			
S662A			
S662D			
S662F			
S662H			
S662N			
S662L			
S662I			
S668V			
S707V			
S721V			
T251V			
T329V			
T330V			
T454V			
T455V			
T491V			
T503V			
T550V			
T592V			

T597V

T581V

T671V

T659V

T660V

T701V

T713V

T716V

La primera letra corresponde al aminoácido en la cápside de AAV2 de tipo silvestre, el número es la posición de aminoácido de VP3 que se mutó y la última letra es el aminoácido mutante.

5 ANÁLISIS

Los vectores basados en AAV recombinante son vehículos de suministro atractivos para la terapia de reemplazo génico como un tratamiento potencial para varios trastornos genéticos. Aunque se han usado con éxito vectores AAV en muchos modelos animales y recientemente han demostrado eficacia en varios ensayos clínicos, una serie de etapas en el ciclo vital de AAV continúan pareciendo limitar la eficacia de estos vectores en terapia génica. Algunas de estas etapas incluyen el tráfico intracelular, el transporte nuclear, la desvoltura y la síntesis de la segunda hebra de ADN vírico (Ding *et al.*, 2005; Harbison *et al.*, 2005; Nonnenmacher y Weber, 2012).

La organización sencilla y la plasticidad natural de los componentes estructurales y reguladores de AAV proporcionan una oportunidad única para manipular la cápside y el genoma víricos para desarrollar vectores recombinantes personalizados con características distintivas. Se han hecho progresos significativos en la última década para mejorar la especificidad y la eficacia de la transducción de los vectores AAV recombinantes. Por ejemplo, las mutaciones específicas en las secuencias de repetición terminal invertida vírica (ITR) han dado lugar al desarrollo de vectores AAV autocomplementarios (scAAV), que superan la etapa limitante de la velocidad de la síntesis de ADN de la segunda hebra vírica y aumentan drásticamente los niveles de expresión transgénica en varios tipos de las células y tejidos (McCarty *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Los estudios adicionales en los análisis de la estructura de la cápside, combinados con una gran cantidad de información proveniente de los estudios de mutagénesis en los genes de la cápside, han propiciado la identificación de regiones específicas que desempeñan un papel crucial en la encapsidación del vector, el tropismo tisular y el tráfico intracelular de estos vectores (Lochire *et al.*, 2006; Muzyczka y Warrington, 2005; Wu *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2003; Vandenberghe *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006).

En los ejemplos previos, se demostró que la sustitución de restos de tirosina (Y) y serina (S) específicos expuestos en la superficie en las cápsides de AAV2 aumentaron significativamente la eficacia de transducción de estos vectores, tanto *in vitro* como *in vivo*, posiblemente debido a la prevención de la fosforilación, la ubiquitinación posterior y la degradación mediada por el proteasoma. Ya que probablemente se espera que los restos de treonina (T) específicos expuestos en la superficie de las cápsides de AAV2 sufran fosforilación, en este ejemplo se mutagenizó sistemáticamente cada uno de los 17 restos de T expuestos en la superficie y se identificaron varios vectores que podrían aumentar la eficacia de la transducción hasta 4 veces. Las combinaciones de múltiples mutaciones de T en una sola cápside identificaron mutaciones que aumentaron adicionalmente la eficacia de la transducción hasta ~10 veces, en comparación con el vector WT AAV2 en células HEK293.

Dos grupos independientes han comunicado anteriormente mutaciones de restos de T específicos en las cápsides de AAV2. Por ejemplo, Lochrie *et al.*, 2006, usó como diana los restos de T en las posiciones 330, 454, 455, 491, 503 y 550 en una demostración de fuerza para identificar regiones superficiales que se unen a anticuerpos y DiPrimio *et al.* (2008), usaron como diana el resto de T en la posición 659 en un esfuerzo para identificar regiones críticas para el ensamblaje de la cápside y el empaquetado de la cápside. En ambos estudios, se sustituyeron los restos de T con restos de alanina (A), serina (S) o lisina (K) o mediante sustitución de péptidos. Sin embargo, no se observó un aumento en la eficacia de transducción de ninguno de los vectores mutantes. Por el contrario, en el ejemplo, se sustituyeron los restos de T expuestos en la superficie por restos de valina. Esto corrobora adicionalmente la reciente observación para el papel crítico desempeñado por tipos de aminoácidos específicos en la modulación de la actividad biológica de vectores AAV (Aslanidi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

Cuando se combinó la mutación de treonina más eficaz (T491V) con una mutación triple de tirosina previamente comunicada (Y444+500+730F) (Markusic *et al.* 2010) para generar un vector cuádruple mutante Y-T (Y444+500+730F+T491V), la eficacia de la transducción de este vector fue ~2-3 veces mayor que la del vector triple mutante de tirosina en hepatocitos murinos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, la combinación de la mutación de S más eficiente (S662V) (Aslanidi *et al.*, 2012) con la triple mutación de tirosina afectó a la eficacia de

transducción del vector cuádruple mutante de Y-S (Y444+500+730F+S662V) así como del vector quintuple mutante de Y-S-T (Y444+500+730F+S662V+T491V). Aunque varias combinaciones diferentes mostraron una mayor eficacia de la transducción en comparación con el vector WT AAV2, ni la combinación de mutaciones similares (mutantes cuádruples, quintuples o séxtuples de tirosina y mutantes triples y cuádruples de treonina), ni la combinación de las mutaciones YST con mejor rendimiento alcanzaron el nivel de expresión del vector triple mutante de tirosina. En vista del gran número de combinaciones de mutaciones evaluados, solo se caracterizaron con detalle en este caso las mutaciones que aumentaron significativamente la eficacia de la transducción por encima del vector triple mutante de tirosina.

Los 17 restos de treonina expuestos en la superficie de AAV2 están dispersos por toda la cápside. Cuatro de las mutaciones (T329V, T330V, T713V y T716V) dieron como resultado defectos significativos en el ensamblaje y la producción de vector y no pudieron caracterizarse adicionalmente. Los restos 329 y 330 están ubicados en el bucle superficial α (bucle DE) ubicado entre las hebras β D y β E del barril β central de la estructura de VP3 de AAV2 (Xie *et al.*, 2002). Cinco de estos bucles, procedentes de VP3 relacionadas por simetría quintuple icosaédrica, se ensamblan en un canal en este eje que conecta las superficies interiores y exteriores de la cápside (FIG. 32A). Como se observó en un estudio anterior (Bleker *et al.*, 2006), los títulos de estos mutantes se redujeron significativamente, de manera coherente con el papel para el canal en el empaquetado del genoma. Los restos 713 y 716 se encuentran ubicados en la región de pared/cápside elevada entre las depresiones en y que rodean a los ejes dobles y quintuples icosaédricos, respectivamente (FIG. 32A y FIG. 32B). Sus cadenas laterales participan en interacciones polares con monómeros de VP3 relacionados por simetría y es probable que las mutaciones den como resultado un defecto en el ensamblaje de la cápside. El papel en el ensamblaje de la cápside para los restos ubicados en el eje doble icosaédrico es coherente con un informe reciente en el que se observa que los restos de AAV2 que median la interacción con la proteína activadora del ensamblaje (AAP) se ubicaron en esta región de la cápside (Naumer *et al.*, 2012).

Los restos T455, T491, T550 y T659, que muestran un fenotipo de transducción aumentada cuando se mutan a valina o alanina, se encuentran ubicados en las protrusiones que rodean el eje triple icosaédrico (T455, T491 y T550) o en el bucle HI (entre β H y β I del barril β central) (T659) que se encuentra en la depresión que rodea al canal en el eje quintuple icosaédrico de la cápside de AAV2. Los restos en la protrusión, una característica prominente en la cápside ensamblada a partir de dos monómeros de VP3, se encuentran ubicados en la parte superior (455) que encara a la depresión doble (491) y encaran lateralmente la depresión que rodea a la quintuple (550), respectivamente, de las protrusiones. Esta región de AAV contiene la mayor variabilidad en secuencia y estructura y con la excepción del resto 659, los otros tres restos de treonina se ubican para definir las regiones variables de VP3 (VR) (Govindasamy *et al.*, 2006). Junto con T659, estos restos forman una huella en la superficie de la cápside que se extiende por la parte superior de la protrusión hacia la depresión que rodea el eje quintuple icosaédrico (FIG. 32A y FIG. 32B). Su exposición en la superficie es coherente con el potencial de interactuar con las moléculas del hospedador, que pueden incluir cinasas. De forma interesante, esta huella está flanqueada por los restos en el triple mutante de tirosina, Y444, Y500 y Y730, con T491 ubicado próximo al resto de tirosina Y730 en una representación de los aminoácidos de la superficie de la cápside (FIG. 32B). Este resto, que se encuentra en la depresión en el eje icosaédrico de la cápside, demostró el mayor aumento en la transducción en comparación con WT AAV2 cuando se mutó parte de las siete tirosinas expuestas en la superficie a restos de fenilalanina (Zhong *et al.*, 2008). De manera significativa, se observa que la región de cápside doble sufre transiciones estructurales mediadas por el pH cuando se examinó el AAV8 homólogo en las condiciones encontradas durante el tráfico en la vía endocítica (Nam *et al.*, 2011). Es posible que las mutaciones del AAV2 mejoren la eficacia de la transducción mediante mecanismos de unión al receptor alterados. Los restos que median la interacción de AAV2 y AAV6 con los receptores de heparán sulfato, R585 y R588 y K531 (estructuralmente equivalente a E530 en AAV2), respectivamente, se encuentran próximos a esta huella (FIG. 26B) y los restos 491 y 500, en VRV, se encuentran ubicados en una de dos grandes regiones en la superficie de la cápside de AAV2 que se han vinculado en la unión al receptor LamR en AAV8 (Akache *et al.*, 2006). Los aminoácidos en VRV también desempeñan un papel en la unión de la cápside de AAV9 a su receptor de glucano, galactosa.

El fenotipo de eficacia de transducción reducida de los mutantes que contienen las mutaciones S662V es difícil de explicar, dada la ubicación de este resto dentro de la huella delineada por los restos que potencian la transducción cuando se mutan para eliminar la fosforilación potencial (FIG. 32A y FIG. 32B). Además, se ha demostrado que una mutación de este resto a valina mejoró la transducción en relación con WT AAV2 (Aslanidi *et al.*, 2012). El resto S662, al igual que T659, se encuentra ubicado en el bucle HI que se extiende a lo largo de los monómeros de VP3 relacionados por simetría quintuple adyacentes y probablemente desempeña un papel en la estabilización de las subunidades pentaméricas. Sin embargo, la cadena lateral de serina no se encuentra acoplada en ninguna interacción entre o dentro de las subunidades y aunque se ha comunicado que el bucle HI es determinante para el ensamblaje de la cápside y el empaquetado del genoma (DiPrimio *et al.*, 2008), toleró la sustitución de un solo aminoácido (Aslanidi *et al.*, 2012). Por lo tanto, este efecto se debe probablemente a la supresión de una interacción de la cápside que utiliza la huella que contiene los restos triples mutantes de tirosina en T491. De manera significativa, los fenotipos para las mutaciones en los aminoácidos cercanos que forman el bucle HI, por ejemplo, el resto de aminoácido 664, sustituido con serina (mut45subSer14) o con un epítipo de FLAG (mut45SubFLAG10), no fueron infecciosos o no se ensamblaron en una cápside vírica (Wu *et al.*, 2000). Sin embargo, una inserción de HA en la misma posición produjo cápsides que eran parcialmente defectuosas, aunque seguían uniéndose a heparina

(Wu *et al.*, 2000).

Mientras que tan solo ~45 % de los genomas de vector suministrados por los vectores WT AAV2 estaban presentes en el núcleo a las 48 h después de la infección, >90 % de los genomas de vector suministrados por el vector

cuádruple mutante estaban presentes en el mismo punto de tiempo. Esto indica una cinética de tráfico mejorada para el mutante, que podría ser coherente con una redirección reducida al proteasoma. El aumento modesto (~2-3 veces) en la eficacia de la transducción de estos vectores en comparación con los vectores triples mutantes de tirosina es también coherente con el aumento de ~10 % en el suministro nuclear de genoma de vector, es decir ~90 % en comparación con ~80 %.

Las diversas combinaciones de modificaciones en la superficie de tirosina, serina y treonina demostraron claramente que existe una combinación óptima para lograr un aumento máximo. Estos estudios también destacaron la necesidad de tipos de resto específicos en las interacciones de AAV durante la infección y para mejorar la transducción. Es posible que las mutaciones individuales, que no mostraron un aumento significativo en la eficacia de la transducción como cambios individuales, pueden formar vectores superiores cuando se combinan en una sola cápside.

TABLA 6
COMPARACIÓN DE RESTOS DE TIROSINA EN SEROTIPOS DE AAV

(Los restos expuestos en la superficie se muestran con un "*" después de su posición de aminoácido)

AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAV	AAV	AAV
Y6	Y6	Y6	Y5	NA	Y6	Yfi	Y6	Y6	Y6	Y6	Yfi
Y50	Y50	Y50	Y49	Y49	Y50	Y50	Y50	Y50	Y50	Y50	Y50
Y52	Y52	Y52	Y51	Y51	Y52	Y52	Y52	Y52	Y52	Y52	Y52
Y79	Y79	Y79	Y78	Y78	Y79	Y79	Y79	Y79	Y79	Y79	Y79
Y90	Y90	Y90	Y89	Y89	Y90	Y90	Y90	Y90	Y90	Y90	Y90
Y93	Y93	Y93	Y92	Y92	Y93	Y93	Y93	Y93	Y93	Y93	Y93
Y252	Y252	Y252*	Y246*	Y242*	Y252*	Y253	Y253	Y252*	Y253	Y246	Y255
Y257	Y257	Y257	Y251	Y247	Y257	Y258	Y258	Y257	Y258	Y251	Y260
Y273*	Y272	Y272*	Y263*	Y263*	Y273*	Y274	Y275	Y274*	Y275	Y263	Y272
Y276	Y275	Y275	NA	Y266	Y276	Y277	Y278	Y277	Y278	NA	NA
Y282	Y281	Y281	Y272	Y272	Y282	Y283	Y284	Y283	Y284	Y272	Y281
NA	NA	NA	NA	Y294	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Y349	Y348	Y348	Y339	Y339	Y349	Y350	Y351	Y350	Y351	Y339	Y348
Y353	Y352	Y352	Y343	Y343	Y353	Y354	Y355	Y354	Y355	Y343	Y352
Y376	Y375	Y375	Y366	Y366	Y376	Y377	Y378	Y377	Y378	Y366	Y375
Y378	Y377	Y377	Y368	Y368	Y378	Y379	Y380	Y379	Y380	Y368	Y377
Y394	Y393	Y393	Y387	NA	Y394	Y395	Y396	Y395	Y396	Y386	Y395
Y398	Y397	Y397	Y391	Y390	Y398	Y399	Y400	Y399	Y400	Y390	Y399
Y414	Y413	Y413	Y407	Y406	Y414	Y415	Y416	Y415	Y416	Y406	Y415
Y425	Y424	Y424	Y418	NA	Y425	Y426	Y427	Y426	Y427	Y417	Y426
Y442*	Y441*	Y441*	Y435*	Y434*	Y442*	Y443*	Y444*	Y443*	Y444*	Y434*	Y443*
NA	NA	NA	NA	Y436	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Y444*	Y443*	Y443*	NA	NA	Y444*	Y445*	Y446*	Y445*	Y446*	NA	NA
Y445*	Y444*	Y444*	NA	NA	Y445*	Y446*	Y447*	Y446*	Y447*	NA	NA

NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y465
NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y466	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y457	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y475
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y467	Y476
NA	NA	NA	NA	Y461	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y478	NA	NA	NA
Y484	Y483	Y484	NA	NA	Y484	NA	Y486	Y484	Y486	NA	NA
NA	NA	NA	Y491*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y490*	Y499*
NA	Y500*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	Y504*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y503*	Y512*
Y509	Y508	Y509	NA	NA	Y509	Y511	Y511	NA	Y511	Y507	NA
NA	NA	NA	NA	Y502	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y521*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y542*	NA	NA	Y557	NA	Y557	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y563*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	Y576	Y577	NA	NA	NA	Y578	Y579	Y577	Y579	NA	NA
NA	NA	NA	NA	Y585*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Y613*	Y612*	Y613*	Y611*	Y602*	Y613*	Y614*	Y615*	Y613*	Y615*	Y610*	Y619*
NA	NA	NA	Y612	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y611	Y620
Y674*	Y673*	Y674*	Y672*	Y662*	Y674*	Y675*	Y676*	Y674*	Y676*	Y671*	Y680*
Y701	Y700	Y701	NA	Y689*	Y701*	Y702	Y703	Y701*	Y703	NA	NA
Y705*	Y704*	Y705*	Y703*	Y693*	Y705*	NA	Y707*	Y705*	Y707	Y702*	Y711*
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Y708	Y706	Y708	NA	NA
Y721	Y720	Y721	Y719	Y709	Y721	Y722	Y723	Y721	Y723	Y717	Y727
Y731*	Y730*	Y731*	Y729*	Y719*	Y731*	Y732*	Y733*	Y731*	Y733*	Y728*	NA

TABLA 7

COMPARACIÓN DE RESTOS DE LISINA EN SEROTIPOS DE AAV (Los restos expuestos en la superficie se muestran con un "*" después de su posición de aminoácido)											
AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAV10	AAV11	AAV12
NA	K24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K26	K26	K26	NA	NA	K26	K26	K26	K26	K26	K26	K26
K31	NA	NA	K30	K30	K31	K31	K31	NA	K31	K31	NA
K33	K33	K33	K32	K32	K33	K33	K33	K33	K33	K33	K33
K38	NA	NA	NA	NA	K38	K38	K38	NA	K38	K38	NA

ES 2 714 292 T3

NA	K39	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K51	K51	K51	K50	NA	K51	K51	K51	K51	K51	K51	K51
K61	K61	K61	K60	NA	K61	K61	K61	K61	K61	K61	K61
K77	K77	K77	K76	NA	K77	K77	K77	K77	K77	K77	K77
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K81
K84	NA	K84	K83	NA	K84	K84	NA	K84	K84	K84	NA
NA	K92	K92	K91	K91	NA	NA	NA	K92	NA	NA	K92
NA	NA	NA	NA	K102	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	K105	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K105	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K115	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K122	K122	K122	K121	K121	K122	K122	K122	K122	K122	K122	K122
K123	K123	K123	K122	K122	K123	K123	K123	K123	K123	K123	K123
K137	K137	K137	NA	K136	K137	K137	K137	K137	K137	K137	K137
K142	K142	K142	K141	NA	K142	K142	K142	K142	K142	K142	K142
K143	K143	K143	K142	K142	K143	K143	K143	K143	K143	K143	K142
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K148
NA	NA	NA	NA	K150	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K152	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K153	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K160
K161	K161	K161	K160	NA	K161	K162	K162	K161	K162	K160	K164
NA	NA	NA	K161	NA	NA	K163	K163	NA	K163	K161	K165
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K166
NA	NA	K164	K163	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K163	NA
NA	NA	NA	NA	K161	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K168
K168	NA	NA	K167	NA	K168	NA	NA	K168	K169	NA	NA
K169	K169	K169	K168	NA	K169	K170	K170	K169	K170	K168	NA
NA	NA	NA	K169	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K232 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K258*	K258	K258*	K252*	NA	K258*	K259*	K259*	K258*	K259*	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K251*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K310I	K309	K309 I	K300 I	NA	K310 I	K311 I	K312 I	K311 I	K312 I	K300 I	K309I
NA	NA	K310 I	NA	NA	NA	K312 I	NA	NA	NA	NA	NA
K315 I	K314	K314 I	K305 I	K305 I	K315 I	K316I	K317I	K316I	K317I	K305 I	K314I
K322 I	K321	K321 I	K312I	K312I	K322 I	K323 I	K324I	K323 I	K324I	K312 I	K321I
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K333*	K332*	K333*	NA	NA

ES 2 714 292 T3

NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K384I
NA	NA	NA	NA	K394I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	K411 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K410I	K419I
NA	NA	NA	NA	K425 I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K449*	NA	NA	NA
K459I	NA	NA	NA	NA	K459I	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K462*	NA	NA	NA
NA	NA	NA	K459I	K451 I	NA	NA	NA	NA	NA	K458 I	K467I
NA	NA	NA	K469I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K476I	NA	NA	K470I	K462 I	K476I	K478I	K478I	NA	K478I	K469I	K478I
NA	NA	NA	K479I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K478 I	K487I
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K490I
K491*	K490	K491*	K485*	NA	K491*	K493*	NA	NA	NA	K484*	K490
K493*	NA	NA	NA	NA	K493*	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	K492*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K491*	K493
NA	NA	NA	K503*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K502*	K511
K508*	K507	K508*	NA	NA	K508*	K510*	K510*	NA	K510*	NA	NA
K528*	K527	K528*	NA	NA	K528*	K530*	K530*	K528*	K530*	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	K531*	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K533*	K532	K533*	NA	NA	K533*	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	K532*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K545*	K544	K545*	NA	NA	K545*	K547*	K547*	K545*	K547*	NA	NA
NA	NA	NA	K544*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	K549	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	NA	K553*	NA	NA	NA	NA	NA
NA	K556	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K557*	NA	NA	NA
K567*-	NA	NA	NA	NA	K567*	NA	K569*	K567*	K569*	NA	NA
K621 I	K620	K621 I	K619I	K610I	K621 I	K622I	K623 I	K621 I	K623 I	K618I	K627I
K641 I	K640	K641 I	K639I	K630I	K641 I	K642I	K643 I	K641 I	K643 I	K638 I	K647I
K650I	K649	K650I	K648I	K639I	K650I	K651 I	K652 I	K650I	K652 I	K647I	K656I
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K664I	NA	NA	NA
K666*	K665	K666*	NA	NA	K666*	K667*	K668*	K666*	K668*	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K676I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K689I	K688	K689I	K687I	K677I	K689I	K690I	K691 I	K689I	K691 I	K686 I	K695I
K693 I	K692	K693 I	K691 I	K681 I	K693 I	K694I	K695 I	K693 I	K695 I	K690I	K699I
K707*	K706	K707*	NA	NA	K707*	K708*	K709*	K707*	K709*	NA	NA

NA	NA	NA	K718I	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K717I	NA
Los restos en negrita son lisinas asociadas con la superficie = * Los restos que están ubicados en el interior de la cápside = I Sin lisina homóloga en esta posición para ese serotipo = NA											

Los restos no visibles en la estructura cristalina de los AAV se somborean en gris; sin embargo, los datos bioquímicos sugieren que estos aminoácidos están localizados en el interior de la cápside de AAV hasta cierto punto en el ciclo vital del virus, cuando quedan externalizados.

5

Ejemplo 6 - Supresión de la tumorigénesis en hígado humano mediante vectores AAV3

El carcinoma hepatocelular (CHC) se clasifica como el quinto entre los cánceres sólidos con ~695.900 muertes anuales en todo el mundo (Thomas y Zhu, 2005; Jemal *et al.*, 2011). Durante las dos últimas décadas, la incidencia de CHC en los EE. UU. se ha triplicado, mientras que la tasa de supervivencia a 5 años se ha mantenido por debajo del 12 % (E1-Serag, 2011). Es incluso peor en Asia y África, con una incidencia anual de 1 por cada 3.000 en China (Chen, *et al.*, 2013). En la actualidad, la estadificación del CHC se considera crucial para planear una terapia óptima (Bruix *et al.*, 2005). Los pacientes con CHC temprano pueden beneficiarse de terapias radicales (curativas) y aquellos en un estadio intermedio pueden beneficiarse de tratamientos paliativos. Sin embargo, la recidiva es una complicación frecuente y las tasas de fracaso del tratamiento son elevadas. Para aquellos con CHC avanzado, lamentablemente, la única opción que queda es de cuidados paliativos (Verslype *et al.*, 2009). Sin embargo, hay una medicina, sorafenib, aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para el CHC avanzado, en un gran ensayo clínico de fase III, la mediana de la tasa de supervivencia aumentó de tan solo 7,9 a 10,7 meses (Llovet *et al.*, 2008).

20

Los vectores AAV han demostrado una eficacia notable en el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber (Bainbridge *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008; Cideciyan *et al.*, 2008; Cideciyan, 2010), la hemofilia B (Nathwani *et al.*, 2011) y la deficiencia de carboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (Hwu *et al.*, 2012). Glybera, un vector rAAV1 para tratar la deficiencia de lipoproteína lipasa, es el primer producto de terapia génica en las sociedades occidentales (Melchiorri *et al.*, 2013). A principios de los años 2000, se usaron vectores rAAV2 monocatenarios (sc) convencionales por investigadores para dirigirse al CHC *in vivo* (Su *et al.*, 2000). Desafortunadamente, debido a que la eficacia de la transducción de los vectores ssAAV2 es baja, no se observó transducción en tumores mayores de 2 mm mediante administración sistémica (Peng *et al.*, 2000). Más recientemente, se demostró que el suministro de miARN específicos en un modelo de CHC endógeno de ratón usando vectores rAAV8 da como resultado la inhibición de la proliferación de células cancerosas (Kota *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2012). Sin embargo, los vectores rAAV8 tienen un amplio tropismo hacia tejidos normales distintos del hígado en modelos murinos (Zincarelli *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005) y en primates no humanos (Nathwani, *et al.*, 2006; Nathwani *et al.*, 2007).

30

De forma interesante, los inventores han demostrado que los vectores rAAV3, que no logran transducir de manera eficaz cualquier tejido murino normal *in vivo*, (Zincarelli *et al.*, 2008; Palomeque *et al.*, 2007; Markakis *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010) transducen células de CHC humano con una elevada eficacia tanto *in vitro* (Ling *et al.*, 2010; Glushakova *et al.*, 2009) como *in vivo* (Cheng *et al.*, 2012). Aunque los vectores rAAV3 también transducen a hepatocitos humanos primarios, se pudo restringir la expresión del transgén a células malignas usando un promotor específico de CHC, el promotor de α -fetoproteína (AFPp). En estudios posteriores, los inventores observaron que los vectores rAAV3 utilizan el receptor de factor de crecimiento de hepatocitos humano (hHGFR, también denominado c-Met) como correceptor celular, (Ling *et al.*, 2010) lo que indica una oportunidad para aprovechar los vectores basados en rAAV3 para usar como diana cánceres de hígado humanos, ya que hHGFR se sobreexpresa en la mayoría de células de CHC (You *et al.*, 2011). Asimismo, ya que AAV3 tiene una menor incidencia de anticuerpos neutralizantes preexistentes en seres humanos en comparación con otros serotipos de AAV comúnmente usados (van der Marel *et al.*, 2011), tiene el potencial de desarrollarse como vector vírico selectivo para la terapia génica de cánceres de hígado humanos. El presente ejemplo demuestra que puede lograrse un aumento adicional de la eficacia de la transducción mediada por rAAV3 en células de cáncer de hígado humano mediante la eliminación de restos de tirosina (Y), serina (S) y treonina (T) específicos expuestos en la superficie de las cápsides víricas. No se asoció con estas modificaciones ninguna alteración significativa observada en la interacción con el receptor celular *in vitro* y el tropismo vírico *in vivo*. Asimismo, se logró una inhibición significativa de la tumorigénesis en un modelo de xenoinjerto de cáncer de hígado humano mediante la administración sistémica de vectores rAAV3 optimizados que portan un nuevo gen terapéutico procedente de la medicina tradicional china, *Tricosantina*.

45

50

MATERIALES Y MÉTODOS

55

Productos químicos, plásmidos y cebadores. Se adquirió sal sódica de heparina de grado I-A de Sigma Aldrich. Se adquirió hHGF recombinante de Life Technologies. Se adquirió el plásmido pHelper de Agilent Technologies. Los plásmidos pdsAAV-CBAp-EGFP y pAAV-CBAp-FLuc se obtuvieron del Dr. Xiao Xiao, University of North Carolina in Chapel Hill. El plásmido pdsAAV-AFPp-EGFP se ha descrito con anterioridad (Glushakova *et al.*, 2009). El gen TCS (Shaw *et al.*, 1994) se sintetizó por Life Technologies, basándose en la secuencia publicada (ARNm de tricosantina (TCS) de *T. kirilowii*, cds completo; GenBank: M34858.1) y se subclonó en el plásmido pdsAAV-AFPp-EGFP usando

60

los sitios de restricción de *Agel* y *HindIII*. Todos los plásmidos se secuenciaron antes de su uso.

Construcción de plásmidos rAAV3 con la cápside optimizada. Se llevó a cabo un procedimiento PCR en dos etapas usando Turbo *Pfu* Polimerasa (Stratagene) para introducir mutaciones dirigidas al sitio en la cápside de rAAV3, como se ha descrito anteriormente (Zhong *et al.*, 2008; Markusic *et al.*, 2010; Aslanidi *et al.*, 2013). Brevemente, en la etapa uno, se llevaron a cabo dos reacciones de extensión PCR en tubos separados para cada mutante. Un tubo contenía el cebador PCR directo y el otro contenía el cebador inverso. En la etapa dos, se mezclaron las dos reacciones y se llevó a cabo la mutagénesis por la PCR convencional según las instrucciones del fabricante. Todos los plásmidos mutantes se secuenciaron antes de su uso.

Líneas celulares y cultivos. Las células de carcinoma hepatocelular humano (Huh7) se han descrito anteriormente, (Ling *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2012) y se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco completo (C-DMEM, Mediatech, Inc.) complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS, Sigma-Aldrich), penicilina y estreptomina al 1 % (Lonza). Se obtuvo una línea celular de hepatoblastoma humano recientemente establecida (Hep293TT) del Dr. Gail E. Tomlinson (University of Texas Health Science Center en San Antonio) y se mantuvo en medio RPMI 1640 completo (Life Technologies) suplementado con FBS inactivado por calor al 15 % (Sigma-Aldrich) y P/S al 1 % (Lonza). Las células se cultivaron como cultivos adherentes en una atmósfera humidificada al 37 °C con CO₂ al 5 % y se subcultivaron tras el tratamiento con mezcla de tripsina-verseno (Lonza) durante 2-5 min a temperatura ambiente, se lavaron y se resuspendieron en medio completo.

Producción de vectores rAAV. Se generaron reservas altamente purificadas de vectores rAAV mediante el protocolo de transfección de triple plásmido. Brevemente, Se cotransfectaron células HEK293 con tres plásmidos usando polietilenimina (lineal, PM 25000, Polysciences, Inc.) y el medio se reemplazó seis horas después de la transfección. Las células se recogieron 72 h después de la transfección, se sometieron a tres rondas de congelación-descongelación y después se digirieron con benzonasa (Life Technology). Los vectores víricos se purificaron mediante ultracentrifugación de gradiente de iodixanol (Sigma-Aldrich) seguida de cromatografía de intercambio iónico usando HiTrap SP/Q HP (GE Healthcare), se lavaron con suero salino tamponado con fosfato (PBS, Mediatech, Inc.) y se concentraron mediante concentradores por centrifugación con un corte de peso molecular de 150 kDa (MWCO). Los títulos genómicos físicos de las reservas de vector recombinante se determinaron mediante transferencia en ranura de ADN cuantitativa y análisis de transferencia de Western.

Transducción de vectores rAAV in vitro. Se sembraron células en placas de 96 pocillos a razón de 5.000 o 10.000 células por pocillo en C-DMEM. Veinticuatro horas después, se trató a las células de manera simulada o con los agentes químicos indicados durante 2 h. Las infecciones con rAAV (MOI: 5×10^3) se llevaron a cabo posteriormente en medio DMEM aséptico y sin antibióticos durante 2 h, con o sin los agentes químicos indicados, seguido de lavados exhaustivos con PBS para retirar el inóculo de vector. La expresión transgénica se analizó mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo 72 h después de la transducción.

Ensayo de competición de hHGF. Se transdujeron células Huh7 con vectores scAAV3-CBAp-EGFP a una MOI de 5×10^3 vgs/célula. Los vectores se premezclaron con concentraciones crecientes de hHGF recombinante. Se analizaron los niveles de expresión de EGFP de las células 72 h después de la transducción.

Manejo de animales. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por las autoridades reguladoras adecuadas y se llevaron a cabo de acuerdo con guías específicas para el cuidado de animales. Se adquirieron de Jackson Laboratory ratones macho de seis a diez semanas de edad diabéticos no obesos/con inmunodeficiencia severa combinada, deficientes para IL-2 gamma (NSG).

Modelo de xenoinjerto de cáncer de hígado humano. Los ratones NSG de seis a diez semanas de edad recibieron una inyección subcutánea de 5×10^6 células Huh7 o Hep293TT en el lado ventral del cuello entre los omóplatos. Se mantuvo a los animales en jaulas estériles hasta el final del experimento.

Ensayos de FLuc in vitro. Los vectores rAAV se inyectaron por vía intravenosa a través de la vena caudal o se inyectaron directamente en los tumores en ratones NSG. Para la obtención de imágenes de FLuc *in vivo*, se pesó a los ratones para calcular el volumen de sustrato, sal de K⁺ de D-luciferina (Caliper Life Sciences), de acuerdo con la dosis de 4 mg/kg de peso corporal y se les anestesió. Se mezcló el volumen de 5 mg/ml calculado de la solución madre de sustrato con 100 µl de PBS y se inyectó por vía intraperitoneal. Se tomaron imágenes de bioluminiscencia *in vivo* inmediatamente a lo largo de un periodo de 5 min usando una máquina Xenogen equipada con un dispositivo de cámara cargada acoplada a enfriamiento (Xenogen). La intensidad de la señal se cuantificó usando el programa de control de la cámara, el programa informático Living Image y se presentó como fotones/segundo/cm²/esteridiano (p/s/cm²/sr).

Análisis estadístico. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación típica (DT). Las diferencias entre grupos se identificaron usando ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Sidak en el programa informático GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

Los vectores rAAV3 transducen de manera selectiva a tumores hepáticos humanos *in vivo*. En el primer conjunto de estudios, se comparó la eficacia de la transducción de vectores rAAV3 y rAAV8 en tumores de CHC humanos en un modelo de xenoinjerto murino *in vivo*. Se sometió a ratones diabéticos no obesos (NOD) con inmunodeficiencia severa combinada (*scid*), deficientes para interleucina 2 (IL2") (NSG), tanto macho como hembra ($n = 4$) a inyecciones subcutáneas en el lado ventral entre los omóplatos con 5×10^6 células Huh7 humanas, que formaron tumores. Cuatro semanas después, se inyectó a los ratones de manera simulada o a través de la vena caudal 1×10^{11} genomas virales (vgs)/ratón de vectores rAAV3 o rAAV8 que portaban el gen de luciferasa de luciérnaga (FLuc) bajo el control del potenciador de citomegalovirus (CMV)/promotor híbrido de β -actina de pollo (CBAp) (FIG. 40A). La obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo se llevó a cabo 3 días después de la administración del vector. Estos resultados se muestran en la FIG. 36A. Tal como se puede observar, en los ratones tanto macho como hembra a los que se inyectaron los vectores rAAV3, la expresión de FLuc se restringió al tumor, mientras que en los ratones a los que se inyectaron vectores rAAV8, la expresión de FLuc estaba relativamente más dispersa, pero localizada predominantemente en el hígado y la eficacia de la transducción de vectores rAAV8 fue significativamente mayor en ratones macho, una observación, coherente con los estudios publicados anteriormente (Davidoff *et al.*, 2003). Los datos cuantitativos demostraron además que la expresión transgénica mediada por el vector rAAV3 se restringió a los tumores y se detectó poca expresión transgénica en los hígados. Por el contrario, en los ratones a los que se inyectó el vector rAAV8, se produjo una expresión transgénica tan solo baja en los tumores, mientras que la expresión en el hígado fue significativamente mayor. Para corroborar adicionalmente estos resultados, en el segundo conjunto de experimentos, se usaron los vectores rAAV3 y rAAV8 en inyecciones intratumorales directas en ratones NSG macho que portaban tumores de Huh7 humanos ($n = 4$) a razón de 1×10^{11} vgs/ratón y se tomaron imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo 3 días después de las inyecciones de vector. Como puede observarse en la FIG. 36C, la expresión transgénica de alto nivel se localizó en el tumor en los ratones a los que se inyectaron los vectores rAAV3, mientras que además del tumor, también se detectó una expresión transgénica significativa en ratones a los que se inyectaron los vectores rAAV8. Por lo tanto, a diferencia de los vectores rAAV8, los vectores rAAV3 poseen un tropismo hacia tumores hepáticos humanos en este modelo experimental *in vivo*.

En experimentos preliminares, también se observó una reducción en la expresión transgénica en los tumores 5 días después de la administración del vector, que se debió al rápido crecimiento de los tumores de CHC. Por lo tanto, para corroborar adicionalmente estos resultados, en el siguiente conjunto de experimentos, se llevaron a cabo inyecciones intratumorales directas de vectores rAAV3 y rAAV8 a dosis bajas ($L = 1 \times 10^{11}$ vgs/ratón) y elevadas ($H = 1 \times 10^{12}$ vgs/ratón). Los datos de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo obtenidos en el día 3 y el día 7 se muestran en la FIG. 36D. Resultó evidente que, incluso a una dosis elevada, la expresión ectópica en el hígado en los ratones a los que se inyectó el vector rAAV3 fue mínima, mientras que la inyección intratumoral de vectores rAAV8 dio como resultado una fuerte expresión transgénica en el hígado de una manera dependiente de la dosis y el tiempo. En el día 7, después de las inyecciones de vector, se sacrificó a los ratones y se compararon los números de copias de genomas víricos que persisten en las muestras de tejido hepático. Estos resultados, mostrados en la FIG. 36E, indicaron que había presencia de una gran cantidad de genomas de vector rAAV8 en el hígado, mientras que el número de genomas de vector rAAV3 fue mínimo, corroborando los resultados previos. Estos estudios, junto con los resultados anteriores (Ling *et al.*, 2010; Glushakova *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2012; Ling *et al.*, 2011) proporcionan un razonamiento claro para emplear terapia génica mediada por vector rAAV3 para el CHC.

Puede lograrse un aumento adicional de la expresión transgénica mediada por el vector rAAV3 en células de cáncer de hígado humano *in vitro* mediante modificaciones de las cápsides víricas. Para potenciar adicionalmente la eficacia de la transducción de los vectores rAAV3, se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio de las cápsides de rAAV3. Además de la mutagénesis de restos de tirosina (Y) expuestos en la superficie a fenilalanina (F) (Cheng *et al.*, 2012), los restos de serina (S), treonina (T) y lisina (K) expuestos en la superficie también se mutagenizaron a restos de valina (V) y ácido glutámico (E) o arginina (R), respectivamente. Se dio prioridad a las posiciones que se encuentran conservadas entre diversos serotipos de AAV y se ha demostrado previamente que aumentan la eficacia de la transducción de vectores rAAV2 (Zhong *et al.*, 2008; Markusic *et al.*, 2010; Aslanidi *et al.*, 2013; Aslanidi *et al.*, 2012). Los vectores de tipo silvestre (WT) y todos los mutantes de rAAV3 que portaban el gen indicador de proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) dirigido por CBAp (FIG. 40A) se usaron para evaluar sus eficacias de transducción en una línea celular de CHC, Huh7, en condiciones idénticas. En la FIG. 41 se proporciona un resumen de estos datos. La eficacia de transducción de dos mutantes de K (K528E; K533E) se redujo >10 veces y la de varios mutantes de Y y T (Y272F; Y444F; T251V; Y705+731F+T492V) se redujo >2 veces. La eficacia de transducción del resto de los mutantes aumentó, variando entre <2 veces a > 10 veces. Los siete mejores mutantes, así como los vectores WT rAAV3 que portaban el gen indicador de FLuc dirigido por CBAp se usaron posteriormente para transducir células Huh7 en condiciones idénticas. Estos resultados (mostrados en la FIG. 37A) indicaron que la eficacia de transducción de los mutantes Y705+731F y S663V+T492V+K533R aumentó en ~10 veces y la de los mutantes S663V+T492V aumentó en ~15 veces, en comparación con los vectores WT rAAV3. Para validar adicionalmente la eficacia de la transducción aumentada de estos mutantes, se usaron los tres mejores vectores rAAV3 mutantes que portaban el gen indicador de EGFP dirigido por el promotor de CBAp para transducir una línea celular de CHC humano diferente, HepG2, en condiciones idénticas. Los resultados (mostrados en la FIG. 37B), demostraron que la eficacia de la transducción de los mutantes S663V+T492V+K533R e Y705+731F aumentó en ~2

y ~3 veces, respectivamente y la de los mutantes S663V+T492V aumentó ~5 veces, en comparación con los vectores WT rAAV3. La eficacia de la transducción del mejor mutante (S663V+T492V) también se evaluó en una línea celular establecida más recientemente de hepatoblastoma humano (HB), Hep293TT (Cheng *et al.*, 2012) (FIG. 37C). Por lo tanto, el vector rAAV3 optimizado puede demostrar utilidad en la terapia génica potencial del cáncer de hígado humano.

Las modificaciones de aminoácidos específicos en las cápsides de rAAV3 no alteran la interacción de virus-receptor celular. Debido a la incertidumbre acerca de los aminoácidos de la cápside vírica responsables de la interacción virus-receptores, los inventores también examinaron si el proteoglicano de heparán sulfato celular (HSPG) y el receptor de factor de crecimiento de hepatocitos humanos (hHGFR), identificados anteriormente como receptores (Rabinowitz *et al.*, 2004) y correceptores (Ling *et al.*, 2010) de los vectores WT rAAV3, estaban implicados en la transducción por los presentes vectores rAAV3 optimizados. Se llevaron a cabo los tres conjuntos de estudios a continuación. En primer lugar, se llevó a cabo la transducción de células Huh7 con vectores rAAV3-CBAp-EGFP o los dos mejores vectores mutantes en presencia de dosis bajas (100ng/ml) o elevadas (100 µg/ml) de heparina soluble. Estos resultados (mostrados en la FIG. 37D) indicaron que los mutantes tanto Y705+731F como S663V+T492V tuvieron un rendimiento similar al de los vectores WT rAAV3, en los que la dosis baja de heparina mejoró la eficacia de la transducción mediada por vector vírico, mientras que la dosis elevada la redujo drásticamente. En segundo lugar, se llevaron a cabo ensayos de transducción en presencia de 5 µg/ml de factor de crecimiento de hepatocitos humanos (hHGF), que se había demostrado anteriormente que inhibe significativamente la eficacia de la transducción de vectores WT rAAV3 (Ling *et al.*, 2010). Estos resultados, mostrados en la FIG. 37E, demostraron que la eficacia de la transducción de los vectores víricos tanto WT como mutantes se vio significativamente afectada. Y en tercer lugar, se usaron los vectores WT y los dos rAAV3 mutantes para transducir una línea celular de cáncer de mama humano, T47D, que expresa niveles indetectables de hHGFR endógeno, así como células T47D transfectadas de manera estable con un plásmido de expresión de hHGFR (T47D+hHGFR). Estos resultados, mostrados en la FIG. 37F, indicaron que los vectores tanto WT como rAAV3 mutantes transducen a células T47D+hHGFR de una manera más eficaz (>5 veces) que las células T47D progenitoras. En conjunto, estos datos confirmaron que los vectores rAAV3 optimizados también utilizan HSPG y hHGFR celular como receptor/correceptor para su transducción.

Las modificaciones de aminoácidos específicos en las cápsides de rAAV3 potencian adicionalmente la eficacia de transducción vírica in vivo después de la administración sistémica. A continuación, los inventores evaluaron la eficacia de la transducción de los dos vectores rAAV3 optimizados en un modelo de xenoinjerto murino *in vivo*. Para este fin, se usaron ratones NSG portadores de tumores humanos de Huh7 o Hep293TT (n = 4) y se suministró una dosis relativamente baja (5×10^{10} vgs/ratón) de los vectores rAAV3-Y705+731F-CBAp-FLuc o rAAV3-S663V+T492V-CBAp-FLuc a través de la vena caudal. La obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo se llevó a cabo 3 días después de las inyecciones del vector. A partir de los resultados mostrados en la FIG. 38A, resultó evidente que los tumores tanto de Huh7 como de Hep293TT se usaban como diana de manera eficaz mediante los vectores rAAV3 optimizados y que la expresión transgénica en ambos tipos de tumores se potenciaba significativamente mediante los vectores rAAV3-S663V+T492V (FIG. 38B), en comparación con los vectores rAAV3-Y705+731F, que se había demostrado previamente que eran significativamente más eficaces que los vectores WT rAAV3 *in vivo* (Cheng *et al.*, 2012). Tres días después de las inyecciones del vector, se sacrificó a los ratones y se recogieron el hígado y tejidos tumorales. Se aislaron muestras de ADN total tanto del hígado como de tejidos tumorales y se sometieron a análisis por qPCR para determinar los números de copias de genoma del vector. A partir de los datos mostrados en la FIG. 38C y la FIG. 38D, resultó evidente que los genomas de vector persistentes del mutante rAAV3-S663V+T492V en el tumor eran significativamente mayores que los del mutante rAAV3-Y705+731F (FIG. 38C), posiblemente debido al tráfico intracelular y la entrada nuclear más eficaz (Aslanidi *et al.*, 2013), lo que también se correlaciona bien con la expresión transgénica de FLuc (FIG. 38A y FIG. 38B). No se observó una diferencia significativa en los genomas de vector persistente de los dos vectores en el hígado, lo que también es comparable con lo comunicado anteriormente (Zincarelli *et al.*, 2008). Cabe destacar, sin embargo, que a pesar de la presencia de un número de copias del genoma del vector aproximadamente 5 veces mayor en el hígado, en comparación con el tumor, se detectó poca expresión transgénica en el hígado con cualquiera de los dos vectores rAAV3 optimizados.

Supresión de la tumorigénesis en el modelos de xenoinjerto de cáncer de hígado humano in vivo después de la administración sistémica de vectores rAAV3 optimizados que expresan un nuevo gen terapéutico. Todos los estudios descritos hasta ahora se llevaron a cabo con genes indicadores, que carecen de valor terapéutico. Por lo tanto, aunque se contempló el uso de una serie de genes proapoptóticos y de "suicidio" bien establecidos, los esfuerzos se centraron en un gen terapéutico recientemente identificado, que codifica tricostatina (TCS), una proteína activadora de ribosomas, aislado de una hierba medicinal tradicional china, *Trichosanthes kirilowii* (Sha *et al.*, 2013). Aunque se determinó la secuencia del gen TCS hace más de 20 años (Shaw *et al.*, 1994), nunca se ha intentado el suministro de un gen que codifica TCS en células. Se sintetizaron casetes de expresión del gen de TCS bajo el control del AFPp (detallado en la FIG. 40A) cuya expresión intracelular inhibió significativamente el crecimiento de líneas celulares de CHC *in vitro*.

ATGATCAGATTCTTAGTCTCTCTTTGCTAATTCTCACCTCTTCCTAACAACTCCTGCTGTGGAGGGCGATGTT
AGCTTCCGTTTATCAGGTGCAACAAGCAGTTCCCTATGGAGTTTTTCATTTCAAATCTGAGAAAAGCTCTTCCAAAT
GAAAGGAACTGTACGATATCCCTCTGTACGTTCTCTCTTCCAGGTTCTCAACGCTACGCATTGATCCATCTC
ACAAATTACGCCGATGAAACCATTTCAGTGGCCATAGACGTAACGAACGCTCTATATTATGGGATATCGCGCTGGC
GATACATCCTATTTTTTCAACGAGGCTTCTGCAACAGAAGCTGCAAAATATGTATTCAAAGACGCTATGCGAAAA
GTTACGCTTCCATATTCTGGCAATTACGAAAGGCTTCAAACGCTGCAGGCAAAATAAGGGAAAAATATTCCGCTT
GGACTCCCTGCTTTGGACAGTGCCATTACCACTTTGTTTTACTACAACGCCAATTCTGCTGCGTCGGCACTTATG
GTACTCATTCAGTCGACGCTCTGAGGCTGCGAGGTATAAATTTATTGAGCAACAAATTGGGAAGCGTGTGACAAA
ACCTTCTACCAAGTTTAGCAATTATAAGTTTGGAAAATAGTTGGTCTGCTCTCTCCAAGCAAATTCAGATAGCG
AGTACTAATAATGGACAGTTTGAAAGTCCTGTTGTGCTTATAAATGCTCAAAACCAACGAGTCACGATAACCAAT
GTTGATGCTGGAGTTGTAACCTCCAACATCGCGTTGCTGCTGAATAGAAACAATATGGCAGCCATGGATGACGAT
GTTCCATATGACACAGAGCTTTGGATGTGGAAGTTATGCTATTTAG (SEQ ID NO:26)

GAATTCATGATCAGATTCTTAGTCTCTCTTTGCTAATTCTCACCTCTTCCTAACAACTCCTGCTGTGGAGGGC
GATGTTAGCTTCCGTTTATCAGGTGCAACAAGCAGTTCCCTATGGAGTTTTTCATTTCAAATCTGAGAAAAGCTCTT
CCAAATGAAAGGAACTGTACGATATCCCTCTGTACGTTCTCTTCCAGGTTCTCAACGCTACGCATTGATC
CATCTCACAAATTACGCCGATGAAACCATTTCAGTGGCCATAGACGTAACGAACGCTCTATATTATGGGATATCGC
GCTGGCGATACATCCTATTTTTTCAACGAGGCTTCTGCAACAGAAGCTGCAAAATATGTATTCAAAGACGCTATG
CGAAAAGTTACGCTTCCATATTCTGGCAATTACGAAAGGCTTCAAACGCTGCAGGCAAAATAAGGGAAAAATATT
CCGCTTGGACTCCCTGCTTTGGACAGTGCCATTACCACTTTGTTTTACTACAACGCCAATTCTGCTGCGTCGGCA
CTTATGGTACTCATTCAGTCGACGCTCTGAGGCTGCGAGGTATAAATTTATTGAGCAACAAATTGGGAAGCGTGT
GACAAAACCTTCTACCAAGTTTAGCAATTATAAGTTTGGAAAATAGTTGGTCTGCTCTCTCCAAGCAAATTCAG
ATAGCGAGTACTAATAATGGACAGTTTGAAAGTCCTGTTGTGCTTATAAATGCTCAAAACCAACGAGTCACGATA
ACCAATGTTGATGCTGGAGTTGTAACCTCCAACATCGCGTTGCTGCTGAATAGAAACAATATGGCAGCCATGGAT
GACGATGTTCCATATGACACAGAGCTTTGGATGTGGAAGTTATGCTATTTCTCGAGGACTACAAGGATGACGATGAC
AAGGATTACAAAGACGACGATGATAAGGACTATAAGGATGATGACGACAAATAA (SEQ ID NO:27)

- 5 Después, se generaron vectores mutantes rAAV3-S663V+T492 que portaban este nuevo gen terapéutico. Además, para permitir el inicio del tratamiento en un punto de tiempo temprano, antes de que los tumores fuesen palpables, también se generó una línea celular de CHC humano genéticamente modificada, Huh7-FLuc, en la que se transfectó de manera estable el gen de FLuc bajo el control del promotor CBAP, que también permitió monitorizar el crecimiento tumoral mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo. Se inyectó a ratones
- 10 NSG ($n=10$) por vía subcutánea en el lado ventral entre los omóplatos 5×10^6 células Huh7-FLuc. Cuatro semanas de los xenoinjertos, se dividió a los ratones en 2 grupos y se inyectaron 5×10^{10} vgs de vectores rAAV3-S663V+T492V-AFPp-TCS a través de la vena caudal en el primer grupo (día 0). Al segundo grupo de ratones se le inyectaron 5×10^{10} vgs de vectores rAAV3-S663V+T492V-AFPp-EGFP para que sirviesen como controles adecuados. La obtención de imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo se llevó a cabo en el día 0, el día 3,
- 15 el día 8 y el día 11 después de la administración del vector. Estos resultados, mostrados en la FIG. 39A, documentan que mientras que los tumores de Huh7-FLuc crecieron de manera progresiva en ratones a los que se inyectaron vectores rAAV3-S663V+T492V-AFPp-EGFP, el crecimiento tumoral en ratones a los que se inyectaron los vectores rAAV3-S663V+T492V-AFPp-TCS se inhibió significativamente hasta el día 11 ($p < 0,05$), con una inhibición máxima del crecimiento en el día 8 ($p < 0,01$). Las imágenes de bioluminiscencia de cuerpo completo de los ratones llevadas
- 20 a cabo en el día 8 después de las administraciones del vector se muestran en la FIG. 39B. Por otra parte, en el día 11, se sacrificó a todos los ratones y se determinaron los niveles séricos de aspartato transaminasa (AST) y de alanina transaminasa (ALT). Lo se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con TCS y de control, lo que sugiere una escasa lesión hepática en los ratones (FIG. 39C).

25 ANÁLISIS

Como se ha indicado anteriormente, el CHC, que se clasifica como el quinto entre los tumores sólidos en seres humanos, provoca ~695.900 muertes anuales en todo el mundo. Aunque los pacientes con un diagnóstico temprano de CHC pueden beneficiarse de intervenciones quirúrgicas y/o quimioterapéuticas, se produce frecuentemente la

recidiva de la enfermedad y la frecuencia de fracaso del tratamiento es elevada. Para los pacientes a los que se diagnostica CHC avanzado, las opciones se limitan en gran medida a cuidados paliativos. Aunque la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado el uso de Sorafenib en pacientes con CHC avanzado, la mediana de supervivencia se aumenta tan solo en ~3 meses. Por lo tanto, resulta evidente que el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas se necesita urgentemente y la combinación de la terapia génica con la medicina tradicional china (TCM) es una opción prometedora. La medicina TCM, como medicina complementaria principal y alternativa, se ha convertido en un tratamiento comúnmente usado para el CHC en China (Zhai *et al.*, 2013). Recientemente, se ha comunicado que algunos compuestos monoméricos bioactivos extraídos de hierbas de la TCM tienen la capacidad de potenciar significativamente la eficacia terapéutica mediada por vectores rAAV (Zhang *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Ling *et al.*, 2014). En este caso, se desarrolló una nueva estrategia que combina la terapia génica con la administración de TCM, en la que se administra de manera sistémica un gen de suicidio terapéutico aislado de hierbas a células malignas *in vivo* mediante vectores rAAV.

La terapia génica mediada por vector AAV recombinante del CHC se ha probado en el pasado. Por ejemplo, se ha informado del uso de vectores rAAV2 monocatenarios (ss) convencionales para abordar el CHC *in vivo* (Su *et al.*, 2000), pero la eficacia de la transducción de estos vectores fue escasa. En estudios posteriores (Peng *et al.*, 2000), no se observó transducción en tumores mayores de 2 mm después de la administración sistémica. En estudios más recientes, se demostró que el uso de vectores rAAV δ para mediar el suministro de miARN-26A y miARN-122 específico en modelos de tumor de CHC endógeno de ratón daban como resultado la inhibición del crecimiento tumoral (Kota *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2012). Sin embargo, los vectores rAAV8 tienen un amplio tropismo hacia tejidos normales distintos del hígado en modelos murinos (Zincarelli *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005) y en primates no humanos (Nathwani, *et al.*, 2006; Nathwani *et al.*, 2007). Este ejemplo demuestra que el sobresaliente tropismo de los vectores rAAV3 hacia las células de cáncer de hígado humano *in vitro* también puede aprovecharse para lograr el suministro dirigido de estos vectores a tumores hepáticos humanos en un modelo de xenoinjerto de ratón *in vivo*. Además, la mutagénesis de sitio dirigido de restos de aminoácido específicos en la cápside de rAAV3 puede aumentar adicionalmente la eficacia de la transducción de vectores rAAV3. Asimismo, los vectores rAAV3 optimizados que expresan un nuevo gen terapéutico también pueden usarse para suprimir la tumorigénesis hepática en humanos en un modelo de xenoinjerto murino. Cabe destacar que estos estudios se llevaron a cabo con tumores bien establecidos y el uso deliberado de bajas dosis de vector para establecer el direccionamiento a tumores. Por lo tanto, es altamente probable que el uso de altas dosis de vector y/o una intervención más temprana, antes de que el tumor esté bien establecido, podría ser posible para lograr un punto final terapéutico más deseable. También es tentador especular que dependiendo de la finalización con éxito de estudios adicionales con xenoinjertos de tumores de hígado humano primarios, especialmente en el microambiente hepático y de seguridad y eficacia en modelos de animales grandes, los vectores rAAV3-S663V+T492V podrían resultar útiles en la terapia génica potencial de los cánceres de hígado humanos.

REFERENCIAS

Las siguientes referencias se proporcionan en la medida en que sean relevantes para la presente divulgación para proporcionar detalles procedimentales a modo de ejemplo u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento:

- Abella, JV *et al.*, "Met/hepatocyte growth factor receptor ubiquitination suppresses transformation and is required for Hrs phosphorylation," *Molec. Cell. Biol.*, 25:9632-9645 (2005).
- Akache, B *et al.*, "The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9," *J. Virol.*, 80:9831-9836 (2006).
- Aldrich, WA *et al.*, "Enhanced transduction of mouse bone marrow-derived dendritic cells by repetitive infection with self-complementary adeno-associated virus 6 combined with immunostimulatory ligands," *Gene Ther.*, 13(1):29-39 (2006).
- Andreaskos, E *et al.*, "Activation of NF- κ B by the intracellular expression of NF- κ B-inducing kinase acts as a powerful vaccine adjuvant," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 103(39): 14459-14464 (2006).
- Aslanidi, G *et al.*, "An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 106(13):5059-5064 (2009).
- Aslanidi, G *et al.*, "Ectopic expression of wnt10b decreases adiposity and improves glucose homeostasis in obese rats," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 293(3):E726-E736 (2007).
- Aslanidi, GV *et al.*, "Optimization of the capsid of recombinant adeno-associated virus 2 (AAV2) vectors: the final threshold?" *PLoS One*, 8:e59142 (2013).
- Aslanidi, GV *et al.*, "High-efficiency transduction of human monocyte-derived dendritic cells by capsid-modified recombinant AAV2 Vectors," *Vaccine*, 30:3908-3917 (2012).
- Asokan, A *et al.*, "The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads," *Mol. Ther.*, 20:699-708 (2012).
- Bainbridge, JW *et al.*, "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, 358(21):2231-2239 (2008).
- Banchereau, J y Steinman, RM, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature*, 392(6673):245-252 (1998).
- Beatty, GL y Vonderheide, RH, "Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines," *Exp. Rev. Vaccines*, 7(7):881-887 (2008).
- Bleker, S *et al.*, "Impact of capsid conformation and Rep-capsid interactions on adeno-associated virus type 2

genome packaging," *J. Virol.*, 80:810-820(2006).

Boislevé, F *et al.*, "Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF- α ," *Toxicology*, 206(2):233-244 (2005).

Boutin, S *et al.*, "Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors," *Hum. Gene Ther.*, 21:704-712 (2010).

Brantly, ML *et al.*, "Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 106(38): 16363-16368 (2009).

Brown, BD y Lillicrap, D, "Dangerous liaisons: the role of 'danger' signals in the immune response to gene therapy," *Blood*, 100(4): 1133-1140 (2002).

Bruix, J *et al.*, "Management of hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, 42:1208-1236 (2005).

Cao, O *et al.*, "Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic *in vivo* gene transfer," *Blood*, 110(4): 1132-1140 (2007).

Carrillo-Tripp, M *et al.*, "VIPERdb2: An enhanced and web API enabled relational database for structural virology," *Nucl. Acids Res.*, 37:D436-D442 (2009).

Castanier, C *et al.*, "Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway," *EMBO Rep.*, 11(2): 133-138 (2010).

Chapuis, F *et al.*, "Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*," *Eur. J. Immunol.*, 27(2):431-441 (1997).

Chen, TT *et al.*, "Establishment and characterization of a cancer cell line derived from an aggressive childhood liver tumor," *Ped. Blood Cancer*, 53:1040-1047 (2009).

Chen, WQ *et al.*, "Liver cancer incidence and mortality in China, 2009," *Chin. J. Cancer*, 32:162-169 (2013).

Cheng, B *et al.*, "Development of optimized AAV3 serotype vectors: mechanism of high-efficiency transduction of human liver cancer cells," *Gene Ther.*, 19(4):375-384 (2011).

Chiorini, JA *et al.*, "Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5," *J. Virol.*, 73:1309-1319 (1999).

Chiorini, JA *et al.*, "Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles," *J. Virol.*, 71:6823-6833 (1997).

Cideciyan, AV "Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy," *Prog. Retin. Eye Res.*, 29:398-427 (2010).

Cideciyan, AV *et al.*, "Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 105(39): 15112-15117 (2008).

Cohn, EF *et al.*, "Efficient induction of immune tolerance to coagulation factor DC following direct intramuscular gene transfer," *J. Thromb. Haemost.*, 5(6): 1227-1236 (2007).

Cuzzocrea, S *et al.*, "Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation," *Br. J. Pharmacol.*, 135(2):496-510 (2002).

Dai, Y y Siemann, DW, "BMS-777607, a small-molecule Met kinase inhibitor, suppresses hepatocyte growth factor-stimulated prostate cancer metastatic phenotype *in vitro*," *Molec. Cancer Therapeutics*, 9:1554-1561 (2010).

Davidoff, AM *et al.*, "Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway," *Blood*, 102:480-488 (2003).

Daya, S y Berns, KI, "Gene therapy using adeno-associated virus vectors," *Clin. Microbiol. Rev.*, 21(4):583-593 (2008).

Dean, J *et al.*, "Role of cyclic AMP-dependent kinase response element-binding protein in recombinant adeno-associated virus-mediated transduction of heart muscle cells," *Hum. Gene Ther.*, 20(9): 1005-1012 (2009).

Dejardin, E, "The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development," *Biochem. Pharmacol.*, 72(9): 1161-1179 (2006).

den Brok, MH *et al.*, "Dendritic cells: tools and targets for antitumor vaccination," *Exp. Rev. Vaccines*, 4(5):699-710 (2005).

Ding, W *et al.*, "Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors," *Gene Ther.*, 12:873-880 (2005).

DiPaolo, NC *et al.*, "Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response *in vivo*," *Immunity*, 31(1): 110-121 (2009).

DiPrimio, N *et al.*, "Surface loop dynamics in adeno-associated virus capsid assembly," *J. Virol.*, 82(11):5178-5189 (2008).

Dobrzynski, E *et al.*, "Induction of antigen-specific CD4⁺ T-cell anergy and deletion by *in vivo* viral gene transfer," *Blood*, 104(4):969-977 (2004).

Douar, AM *et al.*, "Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation," *J. Virol.*, 75:1824-1833 (2001).

Duan, D *et al.*, "Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus," *J. Clin. Invest.*, 105:1573-1587 (2000).

Eisold, S *et al.*, "Induction of an antitumoral immune response by wild-type adeno-associated virus type 2 in an *in vivo* model of pancreatic carcinoma," *Pancreas*, 35(1):63-72 (2007).

El-Serag, HB, "Hepatocellular carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, 365:1118-1127 (2011).

Emsley, P y Cowtan, K, "Coot: model-building tools for molecular graphics," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 60:2126-2132 (2004).

Ferrari, FK *et al.*, "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors," *J. Virol.*, 70:3227-3234 (1996).

- Figdor, CG *et al.*, "Dendritic cell immunotherapy: mapping the way," *Nat. Med.*, 10(5):475-480 (2004).
- Finn, JD *et al.*, "Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction," *Mol. Ther.*, 18(1): 135-142 (2010).
- Fisher, KJ *et al.*, "Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is Limited by leading-strand synthesis," *J. Virol.*, 70:520-532 (1996).
- Flotte, TR *et al.*, "Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing al-antitrypsin: interim results," *Hum. Gene Ther.*, 22:1239-1247 (2012).
- Gao, GP *et al.*, "Novel adeno-associated viruses from Rhesus monkeys as vectors for human gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 99:11854-11859 (2002).
- Gao, GP *et al.*, "Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 100(10):6081-6086 (2003).
- Gao, GP *et al.*, "Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues," *J. Virol.*, 78:6381-6388 (2004).
- Gilmore, TD, "Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives," *Oncogene*, 25(51):6680-6684 (2006).
- Girod, A *et al.*, "Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2," *Nature Med.*, 5(12): 1438 (1999).
- Glushakova, LG *et al.*, "AAV3-mediated transfer and expression of the pyruvate dehydrogenase E1 α subunit gene causes metabolic remodeling and apoptosis of human liver cancer cells," *Molec. Genet. Metabol.*, 98:289-299 (2009).
- Gotoh, A y Ohyashiki, K, "Role of bortezomib in the treatment of multiple myeloma," *Nippon Rinsho*, 65(12):2309-2314 (2007).
- Gourzi, P *et al.*, "Viral induction of AID is independent of the interferon and the Toll-like receptor signaling pathways but requires NF- κ B," *J. Exp. Med.*, 204(2):259-265 (2007).
- Govindasamy, L *et al.*, "Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4," *J. Virol.*, 80:11556-11570 (2006).
- Gray, SJ *et al.*, "Directed evolution of a novel adeno-associated virus (AAV) vector that crosses the seizure-compromised blood-brain barrier (BBB)," *Mol. Ther.*, 18(3):570-578 (2010).
- Guo, F *et al.*, "Lack of nuclear factor- κ B2/p100 causes a RelB-dependent block in early B lymphopoiesis," *Blood*, 112(3):551-559 (2008).
- Habib, AA *et al.*, "The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF- κ B)-inducing kinase to activate NF- κ B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome," *J. Biol. Chem.*, 276(12):8865-8874 (2001).
- Hansen, J *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts," *J. Virol.*, 75:4080-4090 (2001).
- Hansen, J *et al.*, "Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts," *J. Virol.*, 74:992-996(2000).
- Harbison, CE *et al.*, "The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus," *Trends Microbiol.*, 16:208-214 (2008).
- Harley, CB, "Telomerase and cancer therapeutics," *Nat. Rev. Cancer*, 8(3): 167-179 (2008).
- Hayden, MS y Ghosh, S, "Signaling to NF- κ B," *Genes Develop.*, 18(18):2195-2224 (2004).
- Heiser, A *et al.*, "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors," *J. Clin. Invest.*, 109(3):409-417 (2002).
- High, KA y Aubourg, P, "rAAV human trial experience," *Methods Mol. Biol.*, 807:429-457 (2011).
- Hiscott, J *et al.*, "Convergence of the NF- κ B and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1010:237-248 (2003).
- Hiscott, J *et al.*, "Manipulation of the nuclear factor- κ B pathway and the innate immune response by viruses," *Oncogene*, 25(51):6844-6867 (2006).
- Hsu, SH *et al.*, "Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver," *J. Clin. Invest.*, 122:2871-2883 (2012).
- Hwu, WL *et al.*, "Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency," *Sci. Transl. Med.*, 4:134ra161 (2012).
- Jayandharan, GR *et al.*, "Activation of the NF- κ B pathway by adeno-associated virus (AAV) vectors and its implications in immune response and gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 108(9):3743-3748 (2011).
- Jemal, A *et al.*, "Global cancer statistics," *CA Cancer J. Clin.*, 61:69-90 (2011).
- Jiang, H *et al.*, "Effects of transient immunosuppression on adeno associated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy," *Blood*, 108(10):3321 -3328 (2006).
- Kashiwakura, Y *et al.*, "Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection," *J. Virol.*, 79:609-614(2005).
- Keen-Rhinehart, E *et al.*, "AAV-mediated leptin receptor installation improves energy balance and the reproductive status of obese female Koletsky rats," *Peptides*, 26(12):2567-2578 (2005).
- Kohlbrenner, E *et al.*, "Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system," *Mol. Ther.*, 12:1217-1225 (2005).
- Kota, J *et al.*, "Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model," *Cell*, 137:1005-1017(2009).
- Kube, DM y Srivastava, A, "Quantitative DNA slot blot analysis: inhibition of DNA binding to membranes by magnesium ions," *Nucl. Acids Res.*, 25(16):3375-3376 (1997).

- Kumar, N *et al.*, "NF- κ B signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis," *J. Virol.*, 82(20):9880-9889 (2008).
- Levy, HC *et al.*, "Heparin binding induces conformational changes in adeno-associated virus serotype 2," *J. Struct. Biol.*, 165(3): 146-156 (2009).
- 5 Li, C *et al.*, "Cellular immune response to cryptic epitopes during therapeutic gene transfer," *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA*, 106(26): 10770-10774 (2009).
- Li, C *et al.*, "Single amino acid modification of adeno-associated virus capsid changes transduction and humoral immune profiles," *J. Virol.*, 86:7752-7759(2012).
- Li, Q y Verma, IM, "NF- κ B regulation in the immune system," *Nat. Rev. Immunol.*, 2(10):725-734 (2002).
- 10 Lich, JD *et al.*, "Monarch-1 suppresses non-canonical NF-kappaB activation and p52-dependent chemokine expression in monocytes," *J. Immunol.*, 178(3): 1256-1260 (2007).
- Lind, EF *et al.*, "Dendritic cells require the NF- κ B2 pathway for cross-presentation of soluble antigens," *J. Immunol.*, 181(l):354-363 (2008).
- Ling, C *et al.*, "High-efficiency transduction of liver cancer cells by recombinant adeno-associated virus serotype 3 vectors," *J. Vis. Exp.*, 49:Pii:2538, doi: 10.3791/2538 (2011).
- 15 Ling, C *et al.*, "Human hepatocyte growth factor receptor is a cellular co-receptor for AAV3," *Hum. Gene Ther.*, 21:1741-1747 (2010).
- Ling, CQ *et al.*, "The roles of traditional Chinese medicine in gene therapy," *J. Integr. Med.*, 12:67-75 (2014).
- Ling, CQ *et al.*, "Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying melittin gene on hepatocellular carcinoma," *Ann. Oncol.*, 16:109-115 (2005).
- 20 Lisowski, L *et al.*, "Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model," *Nature*, 506:382-386 (2014).
- Liu, MA, "Immunologic basis of vaccine vectors," *Immunity*, 33(4):504-515 (2010).
- Liu, S *et al.*, "Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway," *Hepatology (Baltimore, MD)*, 47:1964-1973 (2008).
- 25 Liu, X *et al.*, "Targeting the c-MET signaling pathway for cancer therapy," *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 17:997-1011 (2008).
- Liu, YL *et al.*, "Optimized production of high-titer recombinant adeno-associated virus in roller bottles," *Biotechniques*, 34(1): 184-189 (2003).
- 30 Lizundia, R *et al.*, "Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex," *Innate Immun.*, 14(4):223-231 (2008).
- Llovet, JM *et al.*, "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma," *N. Engl. J. Med.*, 359:378-390 (2008).
- Lochrie, MA *et al.*, "Mutations on the external surfaces of adeno-associated virus type 2 capsids that affect transduction and neutralization," *J. Virol.*, 80(2):821 -834 (2006).
- 35 LoDuca, PA *et al.*, "Hepatic gene transfer as a means of tolerance induction to transgene products," *Curr. Gene Ther.*, 9(2): 104-114 (2009).
- Loiarro, M *et al.*, "Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- κ B," *J. Biol. Chem.*, 280(16): 15809-15814 (2005).
- 40 Ma, H *et al.*, "Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice," *Hepatology (Baltimore, MD)*, 42:1355-1363 (2005).
- Madsen, D *et al.*, "AAV-2 induces cell mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP 1," *J. Gen. Virol.* 90(11):2622-2633 (2009).
- Maguire, AM *et al.*, "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, 358(21):2240-2248 (2008).
- 45 Mah, C *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression," *J. Virol.*, 72:9835-9843 (1998).
- Mahadevan, M *et al.*, "Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus," *Cancer Immunol. Immunother.*, 56(10): 1615-1624 (2007).
- 50 Malecki, M *et al.*, "Recombinant adeno-associated virus derived vectors (rAAV2) efficiently transduce ovarian and hepatocellular carcinoma cells—implications for cancer gene therapy," *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 66:93-99 (2009).
- Manno, CS *et al.*, "Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response," *Nat. Med.*, 12(3):342-347 (2006).
- 55 Markakis, EA *et al.*, "Comparative transduction efficiency of AAV vector serotypes 1-6 in the substantia nigra and striatum of the primate brain," *Mol. Ther.*, 18:588-593 (2010).
- Markusic, DM *et al.*, "High-efficiency transduction and correction of murine hemophilia B using AAV2 vectors devoid of multiple surface-exposed tyrosines," *Mol. Ther.*, 18(12):2048-2056 (2010).
- Marshall, E "Gene therapy. Viral vectors still pack surprises," *Science*, 294:1640 (2001).
- 60 Martin, E *et al.*, "Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10," *Immunity*, 18(1):155-167 (2003).
- Mattis, AE *et al.*, "Analyzing cytotoxic T lymphocyte activity: a simple and reliable flow cytometry-based assay," *J. Immunol. Methods*, 204(2): 135-142 (1997).
- Mays, LE *et al.*, "Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins," *J. Immunol.*, 182(10):6051-6060 (2009).
- 65 McCarty, DM *et al.*, "Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors," *Annu. Rev.*

Genet, 38:819-845 (2004).

McCarty, DM *et al.*, "Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*," *Gene Ther.*, 10:2112-2118 (2003).

Melchiorri, D *et al.*, "Regulatory evaluation of Glybera in Europe -two committees, one mission," *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12:719(2013).

Mendell, JR *et al.*, "Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy," *N. Engl. J. Med.*, 363:1429-1437 (2010).

Mendell, JR *et al.*, "Gene therapy for muscular dystrophy: lessons learned and path forward," *Neurosci. Lett.*, 12:341-355 (2012).

Mineva, ND *et al.*, "CD40 ligand-mediated activation of the *de novo* RelB NF- κ B synthesis pathway in transformed B cells promotes rescue from apoptosis," *J. Biol. Chem.*, 282(24):17475-17485 (2007).

Mingozi, F y High, KA, "Immune responses to AAV in clinical trials," *Curr. Gene Ther.*, 7(5):316-324 (2007).

Mingozi, F y High, KA, "Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges," *Nat. Rev. Genet.*, 12:341-355 (2011).

Mingozi, F *et al.*, "CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans," *Nat. Med.*, 13(4):419-422 (2007).

Mitchell, AM *et al.*, "Arsenic trioxide stabilizes accumulations of adeno-associated virus virions at the perinuclear region, increasing transduction *in vitro* and *in vivo*," *J. Virol.*, 87:4571-4583 (2013).

Mueller, C y Flotte, TR, "Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors," *Gene Ther.*, 15(II):858-863 (2008).

Muramatsu, S *et al.*, "Nucleotide sequencing and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3," *Virology*, 221:208-217 (1996).

Muruve, DA *et al.*, "The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response," *Nature*, 452(7183): 103-107 (2008).

Muzyczka, N y Warrington, KH, "Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism," *Hum. Gene Ther.*, 16:408-416 (2005).

Muzyczka, N, "Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:97-129 (1992).

Nakabayashi, H *et al.*, "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium," *Cancer Res.*, 42:3858-3863 (1982).

Nakahara, T *et al.*, "Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement," *J. Dermatol. Sci.*, 42(1): 1-11 (2006).

Nakahara, T *et al.*, "Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells," *Int. Immunol.*, 16(12): 1701-1709 (2004).

Nam, HJ *et al.*, "Structural studies of adeno-associated virus serotype 8 capsid transitions associated with endosomal trafficking," *J. Virol.*, 85:11791-11799 (2011).

Nathwani, AC *et al.*, "Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B," *N. Engl. J. Med.*, 365:2357-2365 (2011).

Nathwani, AC *et al.*, "Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates," *Blood*, 109:1414-1421 (2007).

Nathwani, AC *et al.*, "Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver," *Blood*, 107(7):2653-2661 (2006).

Naumer, M *et al.*, "Properties of the adeno-associated virus assembly-activating protein," *J. Virol.*, 86:13038-13048 (2012).

Nguyen, L *et al.*, "Association of the multisubstrate docking protein gabl with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356," *J. Biol. Chem.*, 272:20811-20819(1997).

Niemeyer, GP *et al.*, "Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy," *Blood*, 113(4):797-806 (2009).

Nonnenmacher, M y Weber, T, "Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors," *Gene Ther.*, 19:649-658 (2012).

Okumura, A *et al.*, "Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1," *J. Virol.*, 84(I):27-33 (2010).

O'Neill, DW y Bhardwaj, N, "Exploiting dendritic cells for active immunotherapy of cancer and chronic infections," *Mol. Biotechnol.*, 36(2): 131-141 (2007).

Opie, SR *et al.*, "Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding," *J. Virol.*, 77:6995-7006 (2003).

Owen, RT *et al.*, "Gene therapy for pyruvate dehydrogenase E1 alpha deficiency using recombinant adeno-associated virus 2 (rAAV2) vectors," *Mol. Ther.*, 6(3):394-399 (2002).

Palomeque, J *et al.*, "Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium *in vivo*," *Gene Ther.*, 14:989-997 (2007).

Palucka, K *et al.*, "Recent developments in cancer vaccines," *J. Immunol.*, 186(3): 1325-1331 (2011).

Pearson, WR y Lipman, DJ, "Improved tools for biological sequence comparison," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 85(8):2444-2448 (1988).

Peng, D *et al.*, "Transduction of hepatocellular carcinoma (HCC) using recombinant adeno-associated virus

- (rAAV): *in vitro* and *in vivo* effects of genotoxic agents," *J. Hepatol.*, 32:975-985 (2000).
- Petrs-Silva, H *et al.*, "High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors," *Mol. Ther.*, 17:463-471 (2009).
- Pierce, JW *et al.*, "Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*" *J. Biol. Chem.*, 272(34):21096-21103 (1997).
- Ponnazhagan, S *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of human monocyte-derived dendritic cells: implications for ex vivo immunotherapy," *J. Virol.*, 75(19):9493-9501 (2001).
- Qiao, C *et al.*, "AAV6 capsid tyrosine-to-phenylalanine mutations improve gene transfer to skeletal muscle," *Hum. Gene Ther.*, 21:1343-1348 (2010).
- Qing, G *et al.*, "Stabilization of basally translated NF-kappaB-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of processing of NF-kB2 p100," *J. Biol. Chem.*, 280(49):40578-40582 (2005).
- Qing, K *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression," *J. Virol.*, 75:8968-8976(2001).
- Qing, K *et al.*, "Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2," *Nature Med.*, 5:71-77 (1999).
- Qing, K *et al.*, "Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 94(20):10879-10884 (1997).
- Rabinowitz, JE *et al.*, "Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups," *J. Virol.*, 78:4421-4432 (2004).
- Robert-Guroff, M, "Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development," *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18(6):546-556 (2007).
- Ross, CJ *et al.*, "Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation," *Hum. Gene Ther.*, 17(5):487-499 (2006).
- Rutledge, EA *et al.*, "Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2," *J. Virol.*, 72:309-319(1998).
- Sanlioglu, S *et al.*, "Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by Rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation," *J. Virol.*, 74:9184-9196 (2000).
- Scallan, CD *et al.*, "Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector," *Blood*, 102(6):2031-2037 (2003).
- Schroeder, GM *et al.*, "Discovery of N-(4-(2-amino-3-chloropyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-4-ethoxy-1-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carboxamide (BMS-777607), a selective and orally efficacious inhibitor of the Met kinase superfamily," *J. Med. Chem.*, 52:1251-1254 (2009).
- Sha, O *et al.*, "Anti-tumor action of trichosanthin, a type 1 ribosome-inactivating protein, employed in traditional Chinese medicine: a mini review," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 71:1387-1393 (2013).
- Shaw, PC *et al.*, "Minireview: trichosanthin - a protein with multiple pharmacological properties," *Life Sci.*, 55:253-262(1994).
- Shin, O *et al.*, "Effective transduction by self-complementary adeno-associated viruses of human dendritic cells with no alteration of their natural characteristics," *J. Gene Med.*, 10(7):762-769 (2008).
- Snyder, RO *et al.*, "Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors," *Nature Med.*, 5(1):64-70 (1999).
- Song, S *et al.*, "Recombinant adeno-associated virus-mediated alpha-1 antitrypsin gene therapy prevents type I diabetes in NOD mice," *Gene Ther.*, 11(2): 181 -186 (2004).
- Srivastava, A, "Adeno-associated virus-mediated gene transfer," *J. Cell. Biochem.*, 105(1): 17-24 (2008).
- Su, H *et al.*, "Adeno-associated viral-mediated gene transfer to hepatoma: thymidine kinase/interleukin 2 is more effective in tumor killing in non-ganciclovir (GCV)-treated than in GCV-treated animals," *Mol. Ther.*, 1:509-515 (2000).
- Su, H *et al.*, "Selective killing of AFP-positive hepatocellular carcinoma cells by adeno-associated virus transfer of the Herpes simplex virus thymidine kinase gene," *Hum. Gene Ther.*, 7:463-470 (1996).
- Summerford, C y Samulski, RJ, "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions," *J. Virol.*, 72:1438-1445 (1998).
- Summerford, C *et al.*, "AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection," *Nature Med.*, 5:78-82(1999).
- Tacke, PJ *et al.*, "Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to *in vivo* targeting," *Nat. Rev. Immunol.*, 7(10):790-802 (2007).
- Tang, ZY, "Hepatocellular carcinoma surgery—review of the past and prospects for the 21st century," *J. Surg. Oncol.*, 91:95-96 (2005).
- Taylor, J y Ussher, JE, "Optimized transduction of human monocyte-derived dendritic cells by recombinant adeno-associated virus serotype 6 (rAAV6)" *Hum. Gene Ther.*, 21:1675-1686 (2010).
- Thomas, CE *et al.*, "Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors," *J. Virol.*, 78:3110-3122 (2004).
- Thomas, MB y Zhu, AX, "Hepatocellular carcinoma: the need for progress," *J. Clin. Oncol.* 23:2892-2899 (2005).
- Tse, LY *et al.*, "Adeno-associated virus-mediated expression of Kallistatin suppresses local and remote hepatocellular carcinomas," *J. GeneMed.*, 10:508-517(2008).
- van der Marel, S *et al.*, "Neutralizing antibodies against adeno-associated viruses in inflammatory bowel disease patients: implications for gene therapy," *Inflamm. Bowel Dis.*, 17:2436-2442 (2011).
- Vandenberghe, LH y Wilson, JM "AAV as an immunogen," *Curr. Gene Ther.*, 7(5):325-333 (2007).

- Vandenbergh, LH *et al.*, "Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy," *Gene Ther.*, 16(3):311-319 (2009).
- Veron, P *et al.*, "Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2," *J. Virol.*, 81(10):5385-5394 (2007).
- 5 Verslype, C *et al.*, "The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2008," *Ann. Oncol.*, 20(Supl 7):vii1-vii6 (2009).
- Wang, C *et al.*, "Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B α kinase-NF κ B," *J. Biol. Chem.*, 284:3804-3813 (2009).
- 10 Wang, L *et al.*, "The pleiotropic effects of natural AAV infections on liver-directed gene transfer in macaques," *Mol. Ther.*, 18(1): 126-134 (2010).
- Wang, LN *et al.*, "Pristimerin enhances recombinant adeno-associated virus vector-mediated transgene expression in human cell lines *in vitro* and murine hepatocytes *in vivo*," *J. Integr. Med.*, 12:20-34 (2014).
- Wang, W y Malcolm, BA, "Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange site-directed mutagenesis," *Biotechniques*, 26(4):680-682 (1999).
- 15 Wang, Y *et al.*, "Potent antitumor effect of TRAIL mediated by a novel adeno-associated viral vector targeting to telomerase activity for human hepatocellular carcinoma," *J. Gene Med.*, 10:518-526 (2008).
- Wang, Y *et al.*, "The efficacy of combination therapy using adeno-associated virus-TRAIL targeting to telomerase activity and cisplatin in a mice model of hepatocellular carcinoma," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 136:1827-1837(2010).
- 20 Wang, Z *et al.*, "Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart," *Nat. Biotechnol.*, 23:321-328 (2005).
- Wang, Z *et al.*, "Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*," *Gene Ther.*, 10(26):2105-2111 (2003).
- 25 Wu, J *et al.*, "Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of Rep proteins in vector purity," *Hum. Gene Ther.*, 18:171-182 (2007).
- Wu, P *et al.*, "Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism," *J. Virol.*, 74(18): 8635-8647 (2000).
- Wu, Z *et al.*, "Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy," *Mol. Ther.*, 14(3):316-327 (2006).
- 30 Wu, Z *et al.*, "Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes," *J. Virol.*, 80(22): 11393-11397 (2006).
- Wu, ZH y Miyamoto, S, "Induction of a pro-apoptotic ATM-NF- κ B pathway and its repression by ATR in response to replication stress," *EMBO J*, 27:1963-1973 (2008).
- 35 Xiao, C y Rossmann, MG, "Interpretation of electron density with stereographic roadmap projections," *J. Struct. Biol.*, 158:182-187 (2007).
- Xiao, W *et al.*, "Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2," *J. Virol.*, 76:11505-11517 (2002).
- 40 Xie, Q *et al.*, "The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 99(16): 10405-10410 (2002).
- Yan, Z *et al.*, "Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid Proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors," *J. Virol.*, 76:2043-2053 (2002).
- Yanagawa, Y y Onoe, K, "Distinct regulation of CD40-mediated interleukin-6 and interleukin-12 productions *via* mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB-inducing kinase in mature dendritic cells," *Immunology*, 117(4):526-535 (2006).
- 45 Yu, Y *et al.*, "rAAV/Her-2/neu loading of dendritic cells for a potent cellular-mediated MHC class I restricted immune response against ovarian cancer," *Viral Immunol.*, 21(4):435-442 (2008).
- Zaiss, AK y Muruve, DA, "Immune responses to adeno-associated virus vectors," *Curr. Gene Ther.*, 5(3):323-331 (2005).
- 50 Zaiss, AK y Muruve, DA, "Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge," *Gene Ther.*, 15(11):808-816 (2008).
- Zaiss, AK *et al.*, "Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors," *J. Virol.*, 82(6):2727-2740 (2008).
- Zaiss, AK *et al.*, "Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors," *J. Virol.*, 76(9):4580-4590 (2002).
- 55 Zhai, XF *et al.*, "Traditional herbal medicine in preventing recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma: a multicenter randomized controlled trial," *J. Integr. Med.*, 11:90-100 (2013).
- Zhang, C *et al.*, "Effects of melittin on expressions of mitochondria membrane protein 7A6c cell apoptosis-related gene products Fas and Fas ligand in hepatocarcinoma cells," *J. Chinese Integrat. Med.*, 5:559-563 (2007).
- 60 Zhang, FL *et al.*, "Celastrol enhances AAV1-mediated gene expression in mice adipose tissues," *Gene Ther.*, 18:128-134(2010).
- Zhang, Y *et al.*, "AAV-mediated TRAIL gene expression driven by hTERT promoter suppressed human hepatocellular carcinoma growth in mice," *Life Sci.*, 82:1154-1161 (2008).
- Zhao, W *et al.*, "Role of cellular FKBP52 protein in intracellular trafficking of recombinant adeno-associated virus 2 vectors," *Virology*, 353:283-293 (2006).
- 65 Zhong, L *et al.*, "A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral

second-strand DNA synthesis," *Mol. Ther.*, 15(7): 1323-1330 (2007).

Zhong, L *et al.*, "Heat-shock treatment-mediated increase in transduction by recombinant adeno-associated virus 2 vectors is independent of the cellular heat-shock protein 90," *J. Biol. Chem.*, 279:12714-12723 (2004).

Zhong, L *et al.*, "Impaired nuclear transport and uncoating limit recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transduction of primary murine hematopoietic cells," *Hum. Gene Ther.*, 15:1207-1218 (2004).

Zhong, L *et al.*, "Improved transduction of primary murine hepatocytes by recombinant adeno-associated virus 2 vectors *in vivo*," *Gene Ther.*, 11:1165-1169 (2004).

Zhong, L *et al.*, "Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 105(22):7827-7832 (2008).

Zhong, L *et al.*, "Single-polarity recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transgene expression *in vitro* and *in vivo*: mechanism of transduction," *Mol. Ther.*, 16:290-295 (2008).

Zhong, L *et al.*, "Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression," *Virology*, 381:194-202 (2008).

Zhu, J *et al.*, "The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice," *J. Clin. Invest.*, 119(8):2388-2398 (2009).

Zmcarelli, C *et al.*, "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection," *Mol. Ther.*, 16: 1073-1080 (2008).

Zmcarelli, C *et al.*, "Comparative cardiac gene delivery of adeno-associated virus serotypes 1-9 reveals that AAV6 mediates the most efficient transduction in mouse heart," *Clin. Translat. Sci.*, 3:81-89 (2008).

Zolotukhin, S *et al.*, "Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors," *Methods*, 28(2): 158-167 (2002).

Se entenderá que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son únicamente con fines ilustrativos y que los expertos en la materia podrán sugerir diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y se han de incluir dentro del alcance de la divulgación.

La enumeración de intervalos de valores en el presente documento está destinada meramente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento y cada valor por separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citase de manera individual en el presente documento.

Todos los métodos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

El uso de cualquiera y de todos los ejemplos o de lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención, a menos que se indique otra cosa. No ha de interpretarse que las expresiones de la memoria descriptiva indiquen que cualquier elemento es esencial para la práctica de la invención, a menos que esto se indique explícitamente.

La descripción en el presente documento de cualquier aspecto usando expresiones tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para un aspecto similar "que consiste en" o que "consiste esencialmente en", o que "comprende sustancialmente" dicho elemento o elementos particulares, a menos que se establezca lo contrario o se contradiga claramente con el contexto, por ejemplo, debe entenderse que si se describe en el presente documento que una composición comprende un elemento particular también se describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se establezca lo contrario o se contradiga claramente con el contexto.

Todas las composiciones y métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden practicarse y ejecutarse sin experimentación innecesaria en vista de la presente invención. Aunque las composiciones y los métodos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin desviarse de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están relacionados química y/o fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en el presente documento, obteniéndose los mismos resultados u otros similares.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> University of Florida Research Foundation, Inc.

<120> COMPOSICIONES DE VECTOR RAAV3 CON CÁPSIDA MODIFICADA Y USOS EN TERAPIA GÉNICA DEL CÁNCER DE HÍGADO HUMANO

<130> WOLBH/P60026EP

<140> EP 14733803.2
 <141> 15/05/2013
 5 <150> PCT/US2014/039015
 <151> 15/05/2013
 <150> US 13/899.481
 <151> 21/05/2013
 10 <150> US 12/595.196
 <151> 31/12/2009
 <150> PCT/US2008/059647
 15 <151> 08/04/2008
 <150> US 60/910.798
 <151> 09/04/2007
 20 <160> 25
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 736
 25 <212> PRT
 <213> Virus adenoasociado serotipo 1
 <400> 1
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 30

ES 2 714 292 T3

100					105					110					
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro
		115					120					125			
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
	130					135					140				
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly
145					150					155					160
Lys	Thr	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
				165					170					175	
Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro
			180					185					190		
Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
		195					200					205			
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ala
	210					215					220				
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile
225					230					235					240
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu
				245					250					255	
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His
			260					265					270		
Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe
		275					280					285			
His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn
	290					295					300				
Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln
305					310					315					320
Val	Lys	Glu	Val	Thr	Thr	Asn	Asp	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn
				325					330					335	
Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Ser	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro
			340					345					350		

ES 2 714 292 T3

Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	355	360	365
Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	370	375	380
Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	385	390	395
Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Thr	Phe	Ser	Tyr	Thr	Phe	405	410	415
Glu	Glu	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	420	425	430
Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Arg	435	440	445
Thr	Gln	Asn	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Gln	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Ser	450	455	460
Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Met	Ser	Val	Gln	Pro	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro	465	470	475
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Lys	Thr	Asp	Asn	485	490	495
Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Thr	Trp	Thr	Gly	Ala	Ser	Lys	Tyr	Asn	Leu	Asn	500	505	510
Gly	Arg	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Pro	Gly	Thr	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	515	520	525
Asp	Asp	Glu	Asp	Lys	Phe	Phe	Pro	Met	Ser	Gly	Val	Met	Ile	Phe	Gly	530	535	540
Lys	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Leu	Asp	Asn	Val	Met	Ile	545	550	555
Thr	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	565	570	575
Phe	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Asn	Phe	Gln	Ser	Ser	Ser	Thr	Asp	Pro	Ala	580	585	590
Thr	Gly	Asp	Val	His	Ala	Met	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	595	600	605

ES 2 714 292 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 735

<212> PRT

<213> Virus adenoasociado serotipo 2

<400> 2

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

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

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

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

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

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

ES 2 714 292 T3

Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly		
			100					105					110				
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro		
		115					120					125					
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Pro	Val	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg		
	130					135					140						
Pro	Val	Glu	His	Ser	Pro	Val	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Gly		
145					150				155						160		
Lys	Ala	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr		
			165					170						175			
Gly	Asp	Ala	Asp	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Gln	Pro	Pro		
			180					185					190				
Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Asn	Thr	Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Gly		
		195					200					205					
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ser		
	210					215					220						
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Met	Gly	Asp	Arg	Val	Ile		
225					230					235					240		
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu		
				245					250					255			
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His	Tyr		
			260					265					270				
Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	His		
		275					280					285					
Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn	Trp		
	290					295					300						
Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Val		
305					310					315					320		
Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Leu		
				325					330					335			
Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr		
			340					345					350				

ES 2 714 292 T3

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
 385 390 395 400
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
 405 410 415
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
 420 425 430
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr
 435 440 445
 Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
 485 490 495
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
 500 505 510
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
 515 520 525
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 530 535 540
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 545 550 555 560
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 565 570 575
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp

ES 2 714 292 T3

595	600	605
Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr 610	615	620
Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys 625	630	635
His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn 645	650	655
Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln 660	665	670
Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys 675	680	685
Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr 690	695	700
Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr 705	710	715
Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu 725	730	735

<210> 3
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Virus adenoasociado serotipo 3
 <400> 3

5

ES 2 714 292 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 Val Pro Gln Pro
20 25 30

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

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

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

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

ES 2 714 292 T3

					85						90					95
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	
			100					105					110			
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro	
		115					120					125				
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Gly	
	130					135					140					
Ala	Val	Asp	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Gly	
145					150					155					160	
Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr	
				165					170					175		
Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro	
			180					185					190			
Ala	Ala	Pro	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	
		195					200					205				
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ser	
	210					215					220					
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile	
225					230					235					240	
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu	
				245					250					255		
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His	Tyr	
			260					265					270			
Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	His	
		275					280					285				
Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn	Trp	
	290					295					300					
Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Lys	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Val	
305					310					315					320	
Arg	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Leu	
				325					330					335		

ES 2 714 292 T3

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
 385 390 395 400
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
 405 410 415
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
 420 425 430
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr
 435 440 445
 Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln
 565 570 575
 Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
 580 585 590

ES 2 714 292 T3

Thr Gly Thr Val Asn His 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

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> 734

5 <212> PRT

<213> Virus adenoasociado serotipo 4

<400> 4

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

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

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

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

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

10

ES 2 714 292 T3

Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp
 85 90 95
 Ala Glu Phe Gln Gln Arg Leu Gln Gly Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn
 100 105 110
 Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Leu
 115 120 125
 Gly Leu Val Glu Gln Ala Gly Glu Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro
 130 135 140
 Leu Ile Glu Ser Pro Gln Gln Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys
 145 150 155 160
 Lys Gly Lys Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Val Phe Glu Asp Glu Thr
 165 170 175
 Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro Glu Gly Ser Thr Ser Gly Ala Met Ser
 180 185 190
 Asp Asp Ser Glu Met Arg Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Val Glu Gly
 195 200 205
 Gly Gln Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys
 210 215 220
 Asp Ser Thr Trp Ser Glu Gly His Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr
 225 230 235 240
 Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Arg Leu Gly Glu
 245 250 255
 Ser Leu Gln Ser Asn Thr Tyr Asn Gly Phe Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 260 265 270
 Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 275 280 285
 Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Met Arg Pro Lys Ala Met Arg Val
 290 295 300
 Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu
 305 310 315 320
 Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp
 325 330 335

ES 2 714 292 T3

Ser Ser Tyr Glu Leu Pro Tyr Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser
 340 345 350
 Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 Cys Gly Leu Val Thr Gly Asn Thr Ser Gln Gln Gln Thr Asp Arg Asn
 370 375 380
 Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly
 385 390 395 400
 Asn Asn Phe Glu Ile Thr Tyr Ser Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser
 405 410 415
 Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile
 420 425 430
 Asp Gln Tyr Leu Trp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Thr Gly Thr Thr Leu
 435 440 445
 Asn Ala Gly Thr Ala Thr Thr Asn Phe Thr Lys Leu Arg Pro Thr Asn
 450 455 460
 Phe Ser Asn Phe Lys Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Ser Ile Lys Gln
 465 470 475 480
 Gln Gly Phe Ser Lys Thr Ala Asn Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Thr
 485 490 495
 Gly Ser Asp Ser Leu Ile Lys Tyr Glu Thr His Ser Thr Leu Asp Gly
 500 505 510
 Arg Trp Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Pro
 515 520 525
 Ala Asp Ser Lys Phe Ser Asn Ser Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Lys
 530 535 540
 Gln Asn Gly Asn Thr Ala Thr Val Pro Gly Thr Leu Ile Phe Thr Ser
 545 550 555 560
 Glu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Asn Ala Thr Asp Thr Asp Met Trp Gly
 565 570 575
 Asn Leu Pro Gly Gly Asp Gln Ser Asn Ser Asn Leu Pro Thr Val Asp

ES 2 714 292 T3

580 585 590
 Arg Leu Thr Ala Leu Gly Ala Val Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg
 595 600 605
 Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp
 610 615 620
 Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Ile Gly Gly Phe Gly Leu Lys His
 625 630 635 640
 Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro
 645 650 655
 Ala Thr Thr Phe Ser Ser Thr Pro Val Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr
 660 665 670
 Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Gln Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu
 675 680 685
 Arg Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly
 690 695 700
 Gln Gln Asn Ser Leu Leu Trp Ala Pro Asp Ala Ala Gly Lys Tyr Thr
 705 710 715 720
 Glu Pro Arg Ala Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr His His Leu
 725 730

<210> 5
 <211> 724
 <212> PRT
 <213> Virus adenoasociado serotipo 5
 <400> 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

ES 2 714 292 T3

65					70					75				80	
Gln	Leu	Glu	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala	Asp
				85					90					95	
Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Lys	Leu	Ala	Asp	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	Asn
			100					105					110		
Leu	Gly	Lys	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	Phe
		115					120					125			
Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Lys	Arg	Ile
	130					135					140				
Asp	Asp	His	Phe	Pro	Lys	Arg	Lys	Lys	Ala	Arg	Thr	Glu	Glu	Asp	Ser
145					150					155					160
Lys	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Asp	Ala	Glu	Ala	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Gln
				165					170					175	
Gln	Leu	Gln	Ile	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Ala	Asp	Thr
			180					185					190		
Met	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Leu	Gly	Asp	Asn	Asn	Gln	Gly	Ala
		195					200					205			
Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Gly	Asp	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp
	210					215					220				
Met	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Thr	Lys	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Val	Leu	Pro
225					230					235					240
Ser	Tyr	Asn	Asn	His	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ile	Lys	Ser	Gly	Ser	Val	Asp
				245					250					255	
Gly	Ser	Asn	Ala	Asn	Ala	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr
			260					265					270		
Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	His	Ser	His	Trp	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln
		275					280					285			
Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Tyr	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Arg	Ser	Leu	Arg	Val
	290					295					300				
Lys	Ile	Phe	Asn	Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Val	Gln	Asp	Ser	Thr
305					310					315					320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Pro Leu

<210> 6

<211> 736

5 <212> PRT

<213> Virus adenoasociado serotipo 6

<400> 6

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

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

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp 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

10

ES 2 714 292 T3

Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	65	70	75	80
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	85	90	95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	100	105	110	
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	115	120	125	
Phe	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	130	135	140	
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly	145	150	155	160
Lys	Thr	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr	165	170	175	
Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro	180	185	190	
Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	195	200	205	
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ala	210	215	220	
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile	225	230	235	240
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu	245	250	255	
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His	260	265	270	
Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	275	280	285	
His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn	290	295	300	
Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	305	310	315	320

ES 2 714 292 T3

Val	Lys	Glu	Val	Thr	Thr	Asn	Asp	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	
				325					330					335		
Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Ser	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	
			340					345					350			
Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	
		355					360					365				
Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	
	370					375					380					
Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	
385					390					395					400	
Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Thr	Phe	Ser	Tyr	Thr	Phe	
				405					410					415		
Glu	Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	
			420					425					430			
Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Arg	
		435					440					445				
Thr	Gln	Asn	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Gln	Asn	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Ser	
	450					455					460					
Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Met	Ser	Val	Gln	Pro	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro	
465					470					475					480	
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Lys	Thr	Asp	Asn	
				485					490					495		
Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Thr	Trp	Thr	Gly	Ala	Ser	Lys	Tyr	Asn	Leu	Asn	
			500					505					510			
Gly	Arg	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Pro	Gly	Thr	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	
		515					520					525				
Asp	Asp	Lys	Asp	Lys	Phe	Phe	Pro	Met	Ser	Gly	Val	Met	Ile	Phe	Gly	
	530					535					540					
Lys	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Leu	Asp	Asn	Val	Met	Ile	
545					550					555					560	
Thr	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	

ES 2 714 292 T3

565

570

575

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 737

<212> PRT

<213> Virus adenoasociado serotipo 7

<400> 7

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

5

10

ES 2 714 292 T3

50		55		60											
Val 65	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala 70	Ala	Ala	Leu	Glu	His 75	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp 80
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala 85	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr 90	Leu	Arg	Tyr	Asn	His 95	Ala
Asp	Ala	Glu	Phe 100	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln 105	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe 110	Gly	Gly
Asn	Leu	Gly 115	Arg	Ala	Val	Phe	Gln 120	Ala	Lys	Lys	Arg	Val 125	Leu	Glu	Pro
Leu	Gly 130	Leu	Val	Glu	Glu	Gly 135	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro 140	Ala	Lys	Lys	Arg
Pro 145	Val	Glu	Pro	Ser	Pro 150	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp 155	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile 160
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln 165	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys 170	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly 175	Gln
Thr	Gly	Asp	Ser 180	Glu	Ser	Val	Pro	Asp 185	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly 190	Glu	Pro
Pro	Ala	Ala 195	Pro	Ser	Ser	Val	Gly 200	Ser	Gly	Thr	Val 205	Ala	Ala	Gly	Gly
Gly 210	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn 215	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp 220	Gly	Val	Gly	Asn
Ala 225	Ser	Gly	Asn	Trp	His 230	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp 235	Leu	Gly	Asp	Arg	Val 240
Ile	Thr	Thr	Ser	Thr 245	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu 250	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn 255	His
Leu	Tyr	Lys	Gln 260	Ile	Ser	Ser	Glu	Thr 265	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn 270	Asp	Asn
Thr	Tyr	Phe	Gly 275	Tyr	Ser	Thr	Pro 280	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp 285	Phe	Asn	Arg
Phe 290	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro 295	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg 300	Leu	Ile	Asn	Asn

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 714 292 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu

<210> 8
<211> 738
5 <212> PRT
<213> Virus adenoasociado serotipo 8

<400> 8

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

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

10

ES 2 714 292 T3

Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	35	40	45	
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro	50	55	60	
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	65	70	75	80
Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	85	90	95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	100	105	110	
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	115	120	125	
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	130	135	140	
Pro	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	145	150	155	160
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	165	170	175	
Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	180	185	190	
Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Met	Ala	Ala	Gly	Gly	195	200	205	
Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	210	215	220	
Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	225	230	235	240
Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	245	250	255	
Leu	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Asn	Asp	260	265	270	
Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	275	280	285	

ES 2 714 292 T3

Arg	Phe	His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	290	295	300
Asn	Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	305	310	315
Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Glu	Gly	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala	325	330	335
Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	340	345	350
Leu	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	355	360	365
Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	370	375	380
Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	385	390	395
Phe	Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Thr	Tyr	405	410	415
Thr	Phe	Glu	Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	420	425	430
Leu	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	435	440	445
Ser	Arg	Thr	Gln	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Asn	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	450	455	460
Phe	Ser	Gln	Gly	Gly	Pro	Asn	Thr	Met	Ala	Asn	Gln	Ala	Lys	Asn	Trp	465	470	475
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			

ES 2 714 292 T3

530	535	540
Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val		
545	550	555
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr		
	565	570
		575
Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala		
	580	585
		590
Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val		
	595	600
		605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile		
	610	615
		620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe		
625	630	635
		640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val		
	645	650
		655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe		
	660	665
		670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
	675	680
		685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		
	690	695
		700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
		720
Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
	725	730
		735
Asn Leu		

<210> 9
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Virus adenoasociado serotipo 9
 <400> 9

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

ES 2 714 292 T3

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

ES 2 714 292 T3

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445
 Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
 500 505 510

ES 2 714 292 T3

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 565 570 575
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590
 Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
 625 630 635 640
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700
 Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
 705 710 715 720
 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735

<210> 10
 <211> 738
 <212> PRT
 <213> Virus adenoasociado serotipo 10
 <400> 10

ES 2 714 292 T3

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

ES 2 714 292 T3

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Gln Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

ES 2 714 292 T3

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

	<210> 11	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico directo	
	<400> 11	
10	accagaacct gggctctgcc cactttcaac aaccatctct acaag	45
	<210> 12	
	<211> 45	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico inverso	
20	<400> 12	
	caatcaggag cttcgaacga caaccacttc tttggctaca gcacc	45
	<210> 13	
	<211> 45	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
30	<400> 13	
	cttatcgatc agtatctgta cttcctgaac agaacgcaag gaaca	45
	<210> 14	
35	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 14	
	gctaacgaca acaacaacag taactatcca tggacagcgg ccagcaaa	48
45	<210> 15	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 15	
	tggaatccag agattcagtt cacgtccaac tacaacaagt ctggt	45
55	<210> 16	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 16	

	gagattcagt acacgtccaa cttcaacaag tctgttaatg tggac	45
5	<210> 17 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 17 gtgaacctcg ccctattgga acccggtttc tcacacgaaa cttg	44
15	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 18 tcccatagta acgccaatag g	21
25	<210> 19 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
35	<400> 19 cttggcatat gatacacttg atg	23
40	<210> 20 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
45	<400> 20 tcccatagta acgccaatag g	21
50	<210> 21 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
55	<400> 21 cttggcatat gatacacttg atg	23
60	<210> 22 <211> 145 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 714 292 T3

	<223> Secuencia de síntesis	
	<400> 22	
	aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg	60
	ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc	120
5	gagcgcgcag agagggagtg gccaa	145
	<210> 23	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
15	<400> 23	
	ctccatcact aggggttcct	20
	<210> 24	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
25	<400> 24	
	ctccatcact aggggttcct	20
	<210> 25	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador oligonucleotídico	
	<400> 25	
	gaggtagtga tccccaagga	20

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside modificada que comprende una combinación de dos o más sustituciones de aminoácidos que incluyen una sustitución de aminoácido no nativo, en donde la proteína de la cápside comprende una o más de las siguientes combinaciones de sustituciones de aminoácidos:
 - (a) Y701F e Y705F;
 - (b) Y705F, Y731F y S663V;
 - (c) Y705F, Y731F, K533R;
 - (d) Y705F, Y731F, S663V y T492 V; o
 - (e) Y705F, Y731F, S663V, T492V y K533R, de la proteína de la cápside de AAV3 de tipo silvestre, como se expone en la SEQ ID NO: 3 o en donde las mutaciones se encuentran en restos de aminoácidos expuestos en la superficie equivalentes en uno cualquiera de las proteínas de la cápside de AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10 de tipo silvestre, como se expone en las SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10 y que dan como resultado los mismos restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos equivalentes que resultan de las mutaciones indicadas en la proteína de la cápside de AAV3.
2. La partícula de rAAV de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la eficacia de transducción de un virión que comprende la partícula es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 veces mayor en una célula hospedadora de mamífero seleccionada que la de un virión que comprende una partícula de rAAV correspondiente no modificada, opcionalmente, de aproximadamente 6 a aproximadamente 40 veces mayor, más opcionalmente, de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 veces mayor.
3. La partícula de rAAV de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la partícula es menos susceptible a la ubiquitinación cuando se introduce en una célula de mamífero que la de un virión que comprende una partícula de rAAV correspondiente no modificada.
4. La partícula de rAAV de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la partícula comprende además un segmento de ácido nucleico que comprende un agente diagnóstico, terapéutico o quimioterapéutico unido operativamente a un promotor capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en una célula hospedadora adecuada que comprende la partícula; opcionalmente en donde el segmento de ácido nucleico comprende además un potenciador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación o cualquier combinación de las mismas, unido operativamente al segmento de ácido nucleico.
5. La partícula de rAAV de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que además comprende una secuencia intrónica de mamífero unida operativamente al segmento de ácido nucleico.
6. La partícula de rAAV de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el promotor es un promotor heterólogo, un promotor específico de tejido, un promotor específico de célula, un promotor constitutivo, un promotor inducible o una combinación de los mismos.
7. La partícula de rAAV de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el promotor es un promotor específico de hígado, un promotor específico de células tumorales o una combinación de los mismos.
8. La partícula de rAAV de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el segmento de ácido nucleico expresa o codifica un polipéptido, un péptido, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, u polinucleótido antisentido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o cualquier combinación de los mismos.
9. La partícula de rAAV de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el segmento de ácido nucleico codifica un agente quimioterapéutico.
10. La partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde el agente diagnóstico, terapéutico o quimioterapéutico es un agonista, un antagonista, un factor antiapoptótico, un inhibidor, un receptor, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor de factor de crecimiento, una hormona, un receptor de hormonas, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, un factor de crecimiento nervioso, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una enzima, una proteína de unión a receptor, una proteína de transporte o un inhibidor de la misma, un receptor de serotonina o un inhibidor de la captación de la misma, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, un agente citotóxico, un agente citostático, un agente antiinflamatorio o cualquier combinación de los mismos.
11. La partícula de rAAV de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la partícula de rAAV es una partícula de AAV3.

12. Una célula hospedadora de mamífero aislada que comprende la partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, opcionalmente en donde la célula hospedadora es una célula madre, una célula hematopoyética, una célula sanguínea, una célula neuronal, una célula retiniana, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula pancreática, una célula cancerosa, una célula muscular, una célula vascular, una célula diafragmática, una célula estomacal, una célula hepática, una célula tumoral o una célula CD34+.
13. Una composición que comprende:
- (I) la partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
- (II) un tampón, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptable; opcionalmente en donde la composición está comprendida en un kit para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad, una lesión, un trastorno, un traumatismo o una disfunción de un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, cáncer hepático, tal como CHC.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, que además comprende un lípido, un liposoma, un complejo lipídico, un etosoma, un niosoma, una nanopartícula, una micropartícula, una liposfera, una nanocápsula o cualquier combinación de los mismos.
15. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, para su uso en terapia o en profilaxis, opcionalmente de un cáncer humano.
16. Un kit que comprende:
la partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
e instrucciones para usar el componente en el diagnóstico, la prevención, el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas del cáncer hepático en un ser humano.
17. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la fabricación de un medicamento para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas de un cáncer en un mamífero; opcionalmente para tratar o mejorar uno o más síntomas del cáncer hepático humano.
18. Una partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en medicina; opcionalmente en donde la partícula de rAAV se proporciona a un mamífero en una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz y durante un tiempo efectivo para proporcionar al mamífero una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de la partícula de rAAV.
19. Una partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el diagnóstico, la prevención, el tratamiento o la mejora de al menos uno o más síntomas de cáncer hepático, incluyendo CHC, en un mamífero; opcionalmente en donde la partícula de rAAV se administra a un mamífero que lo necesite en una cantidad y durante un tiempo suficientes para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar los uno o más síntomas del cáncer hepático en el mamífero, opcionalmente en donde el mamífero es un ser humano.
20. Una partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método para transducir una población de células hepáticas o de células de tumores hepáticos en un ser humano al que se le ha diagnosticado, que tiene o se sospecha que tiene CHC; comprendiendo el método administrar al ser humano una composición que comprende una cantidad eficaz de la partícula de rAAV durante un tiempo efectivo para transducir la población de células hepáticas o de células de tumor hepático.

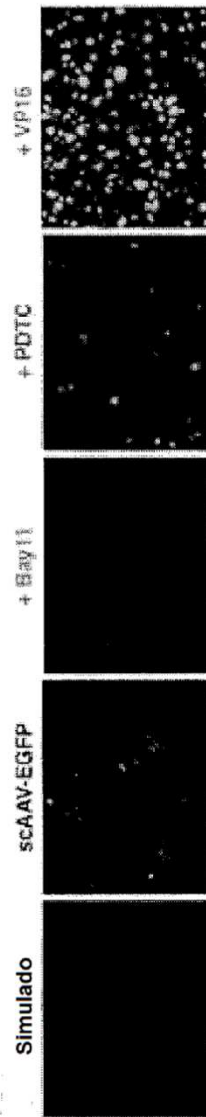


FIG. 1A

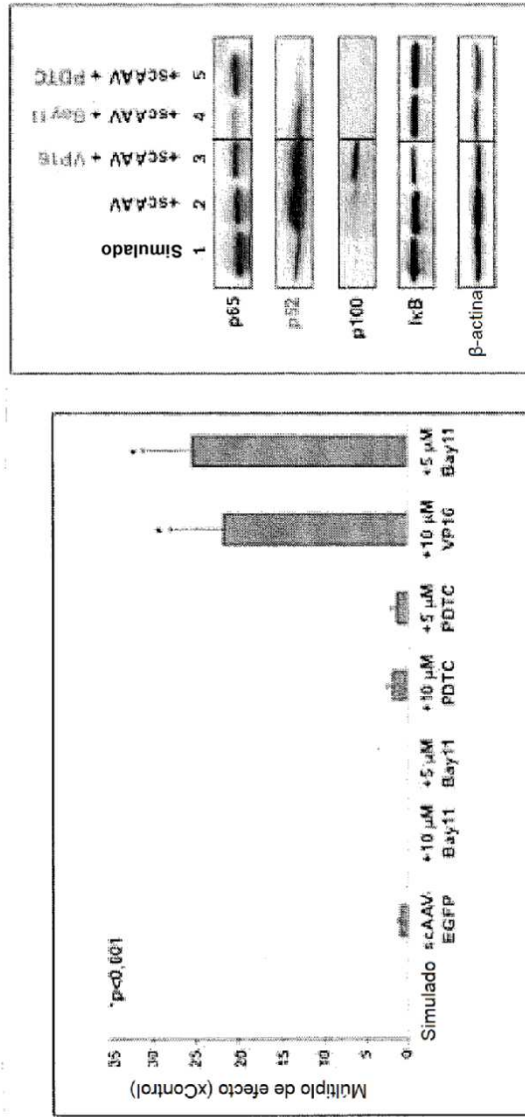


FIG. 1B

FIG. 1C

FIG. 2A

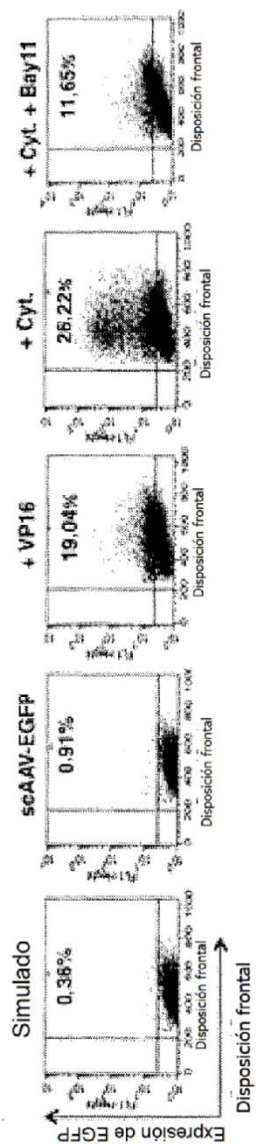


FIG. 2B

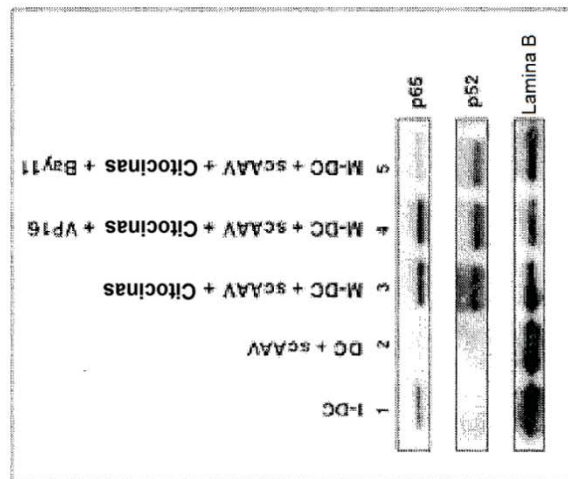


FIG. 3A

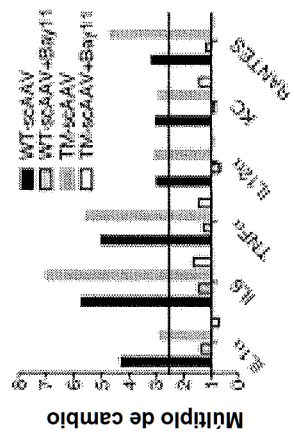
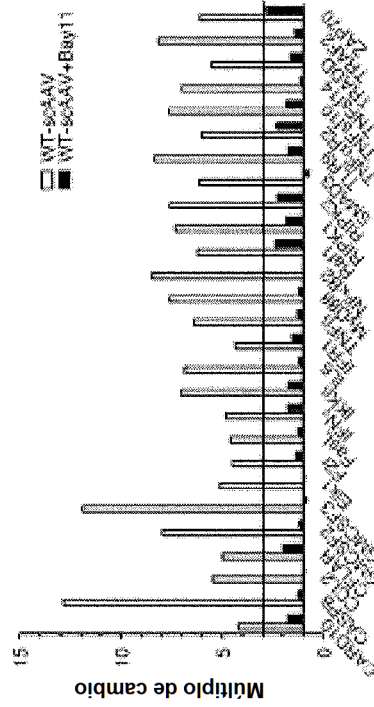


FIG. 3B



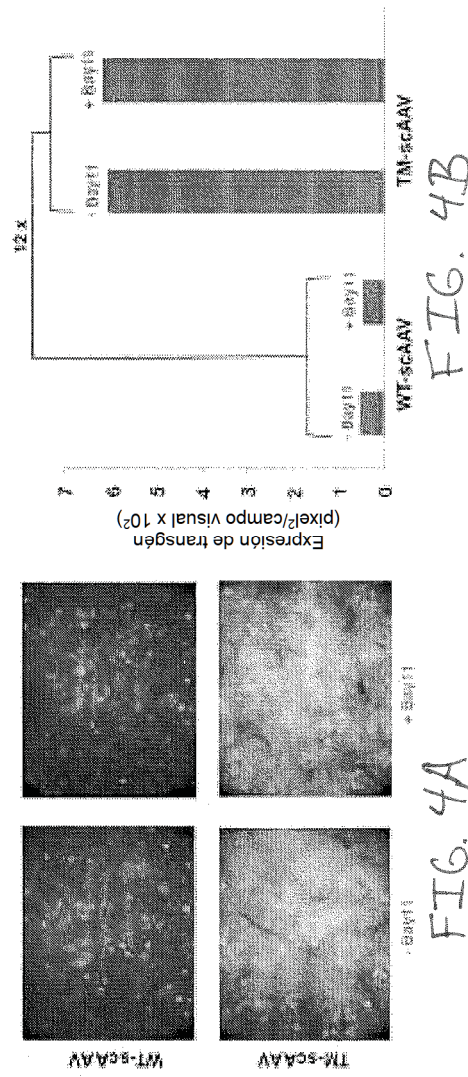


FIG. 5

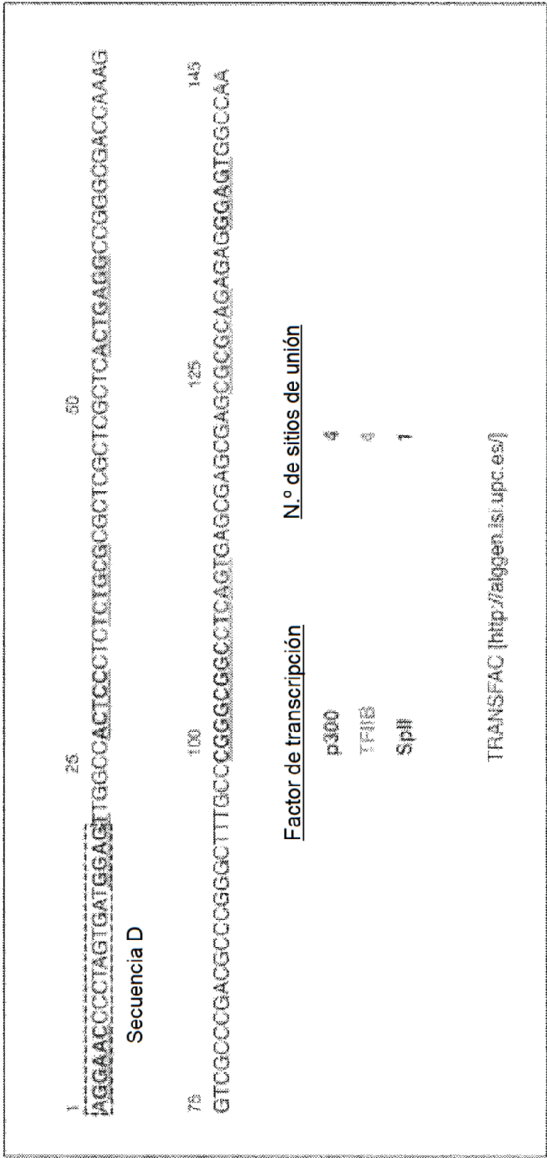


FIG. 6A



FIG. 6B

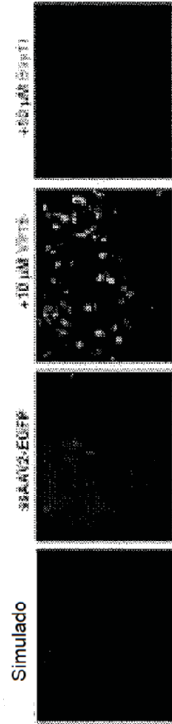
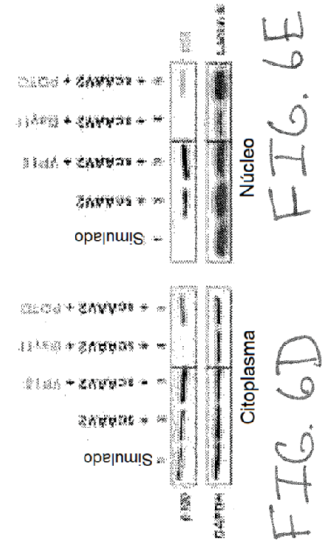
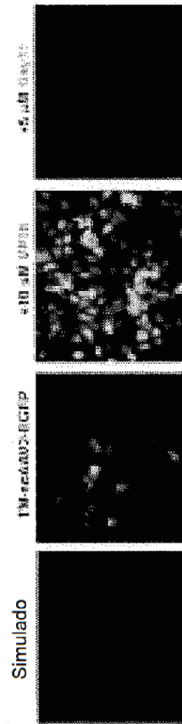


FIG. 6C



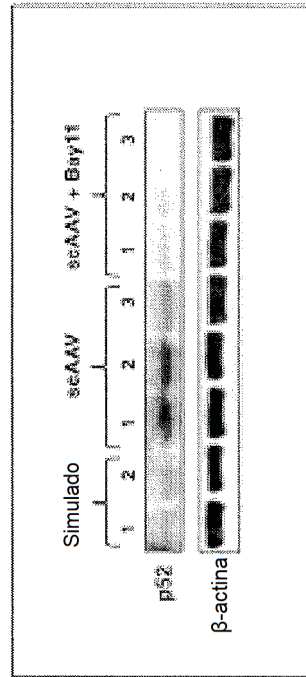
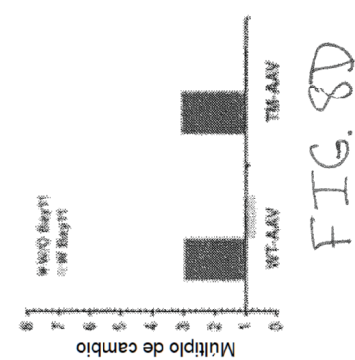
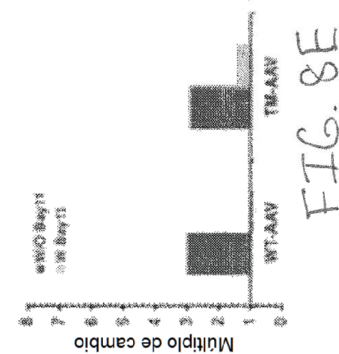
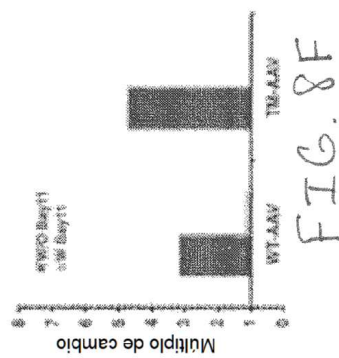
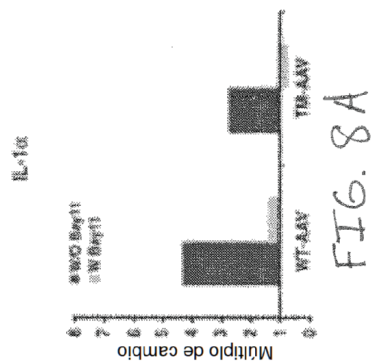
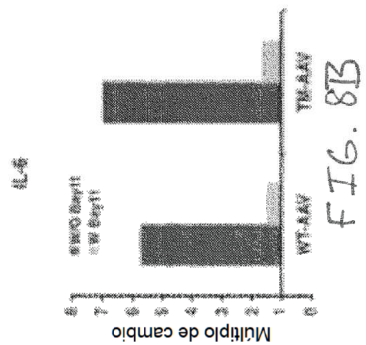
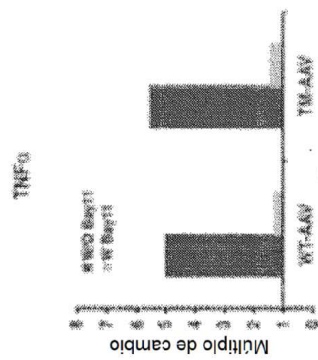


FIG. 7



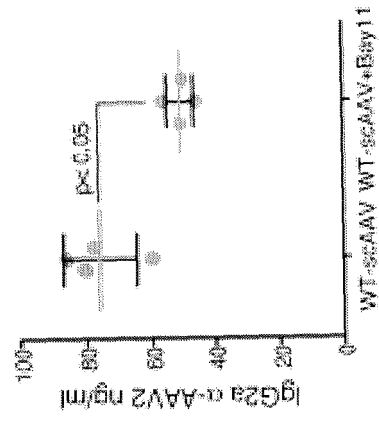


FIG. 9

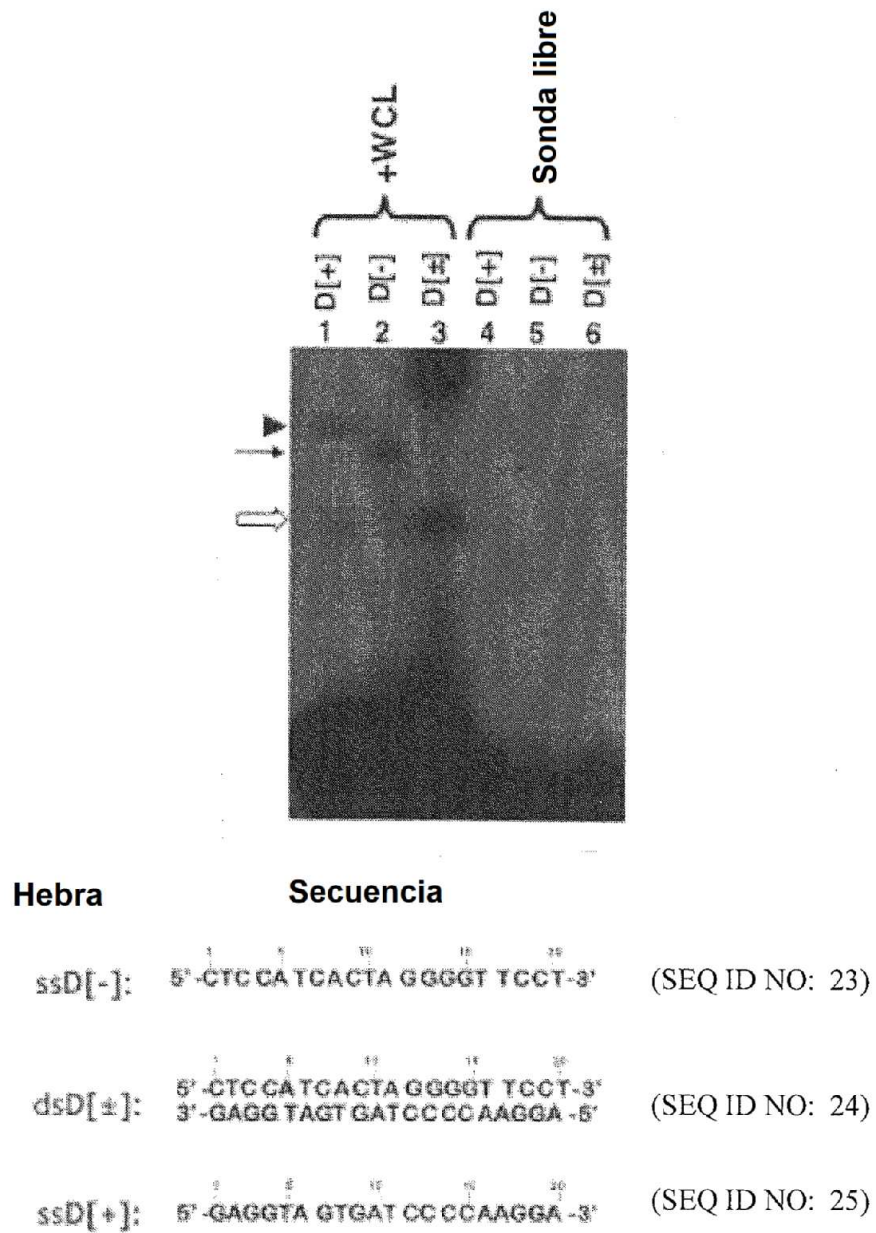


FIG. 10

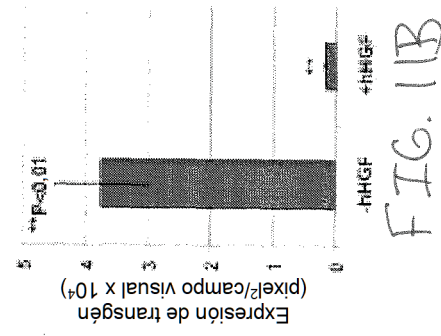


FIG. 1B

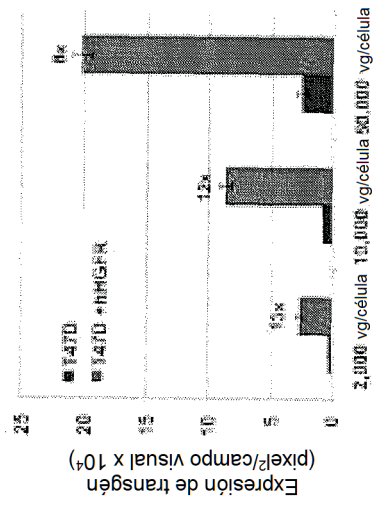


FIG. 1A

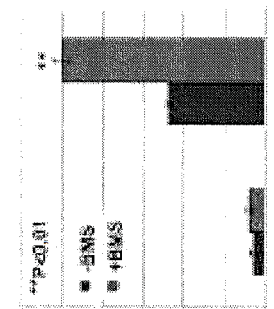


FIG. 12B

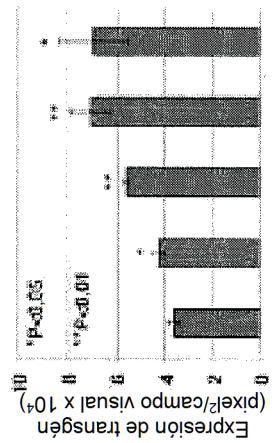


FIG. 12A

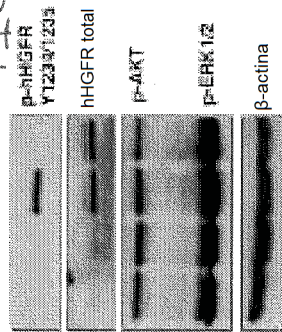


FIG. 12C

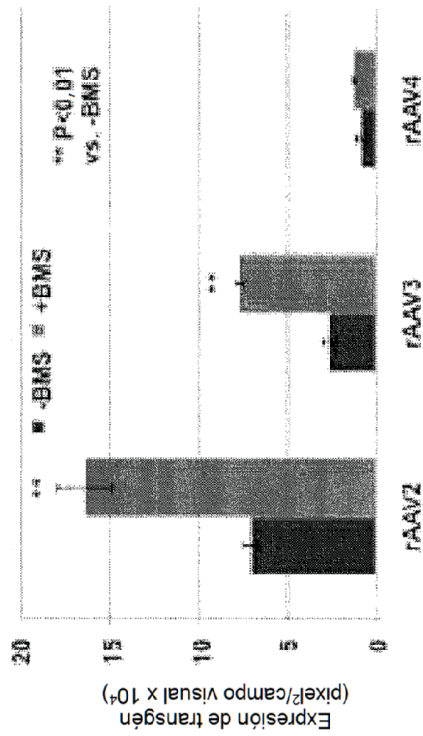


FIG. 13A

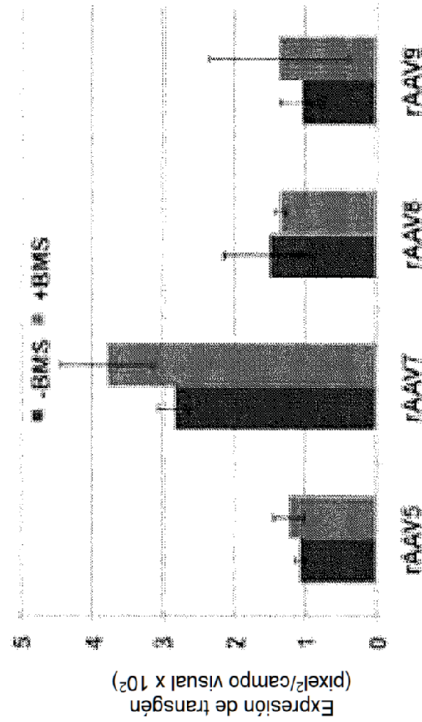


FIG. 13B

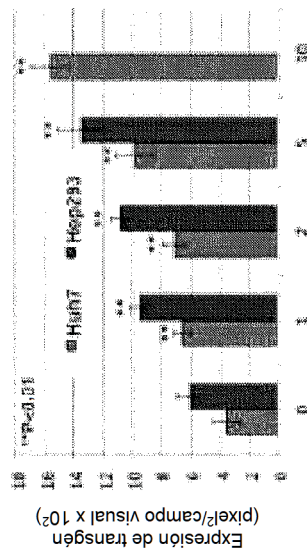


FIG. 14B

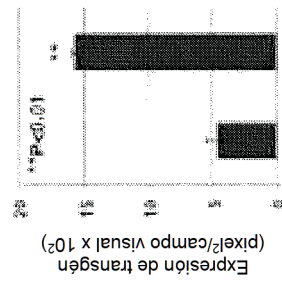


FIG. 14D

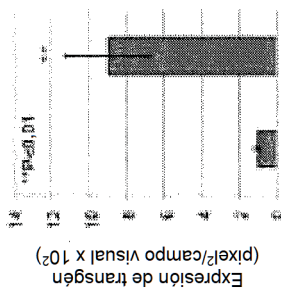


FIG. 14A

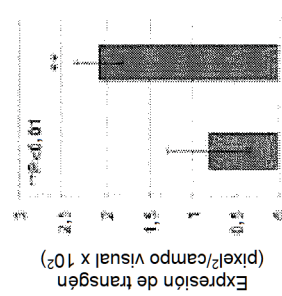
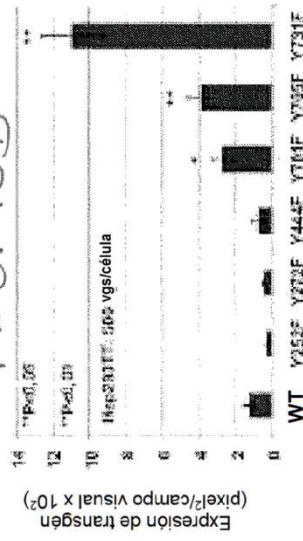
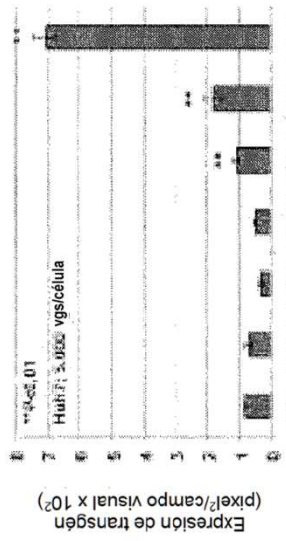
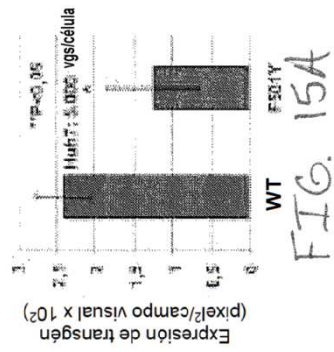


FIG. 14C



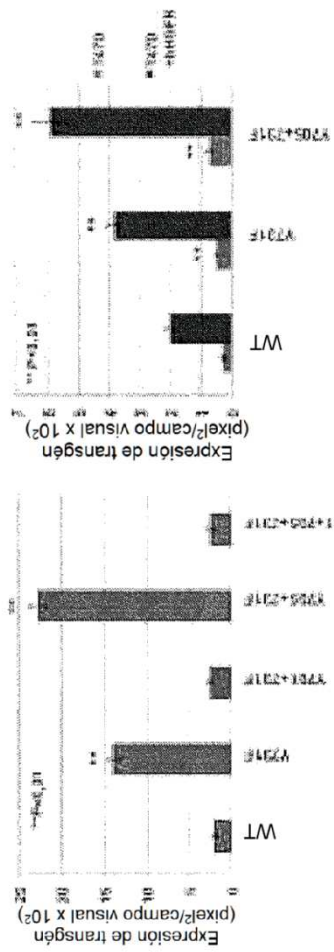


FIG. 16B

FIG. 16A

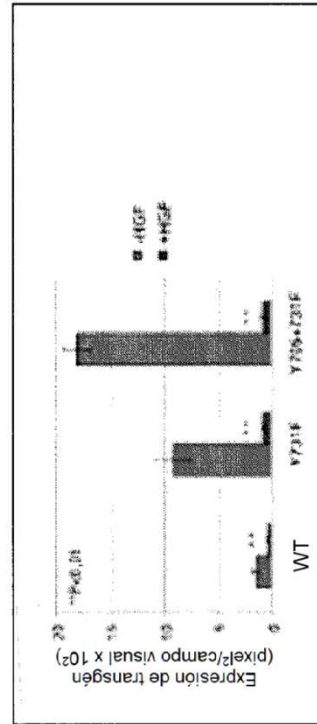
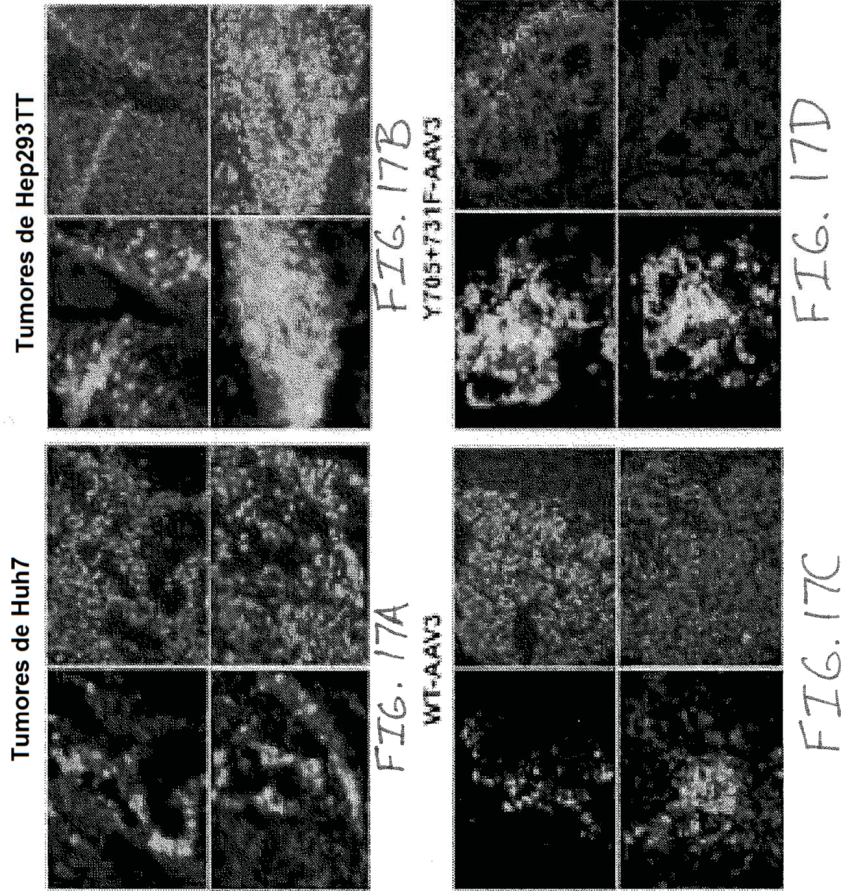
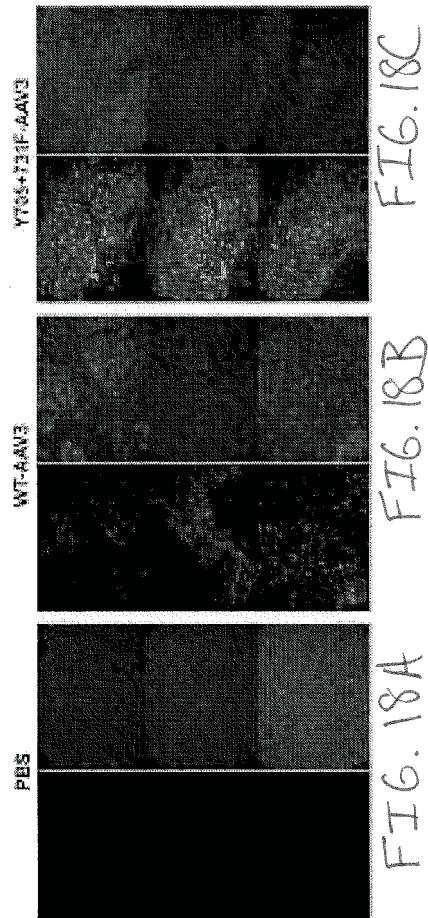


FIG. 16C





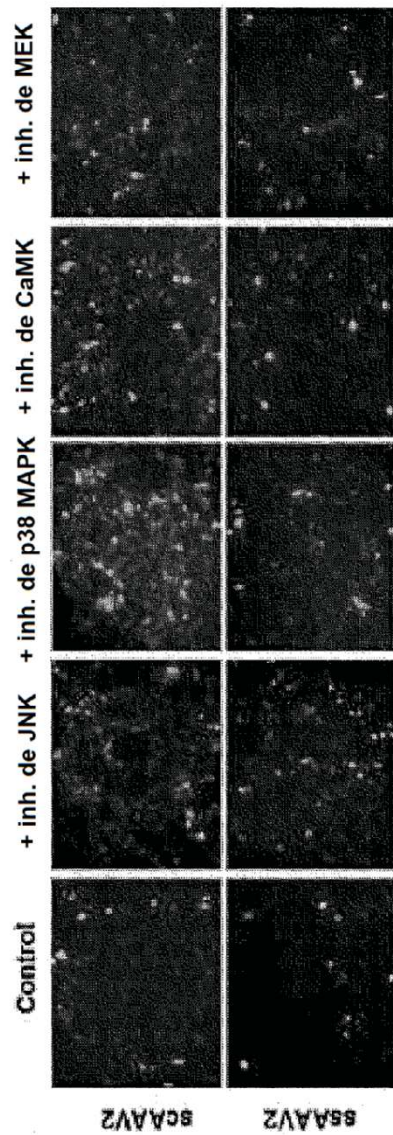


FIG. 19A

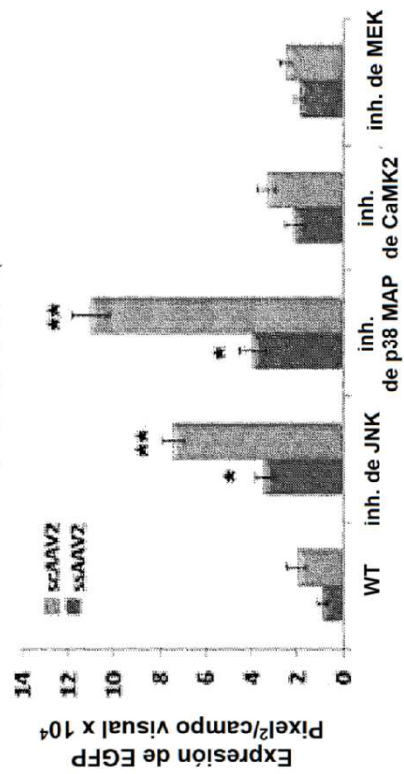
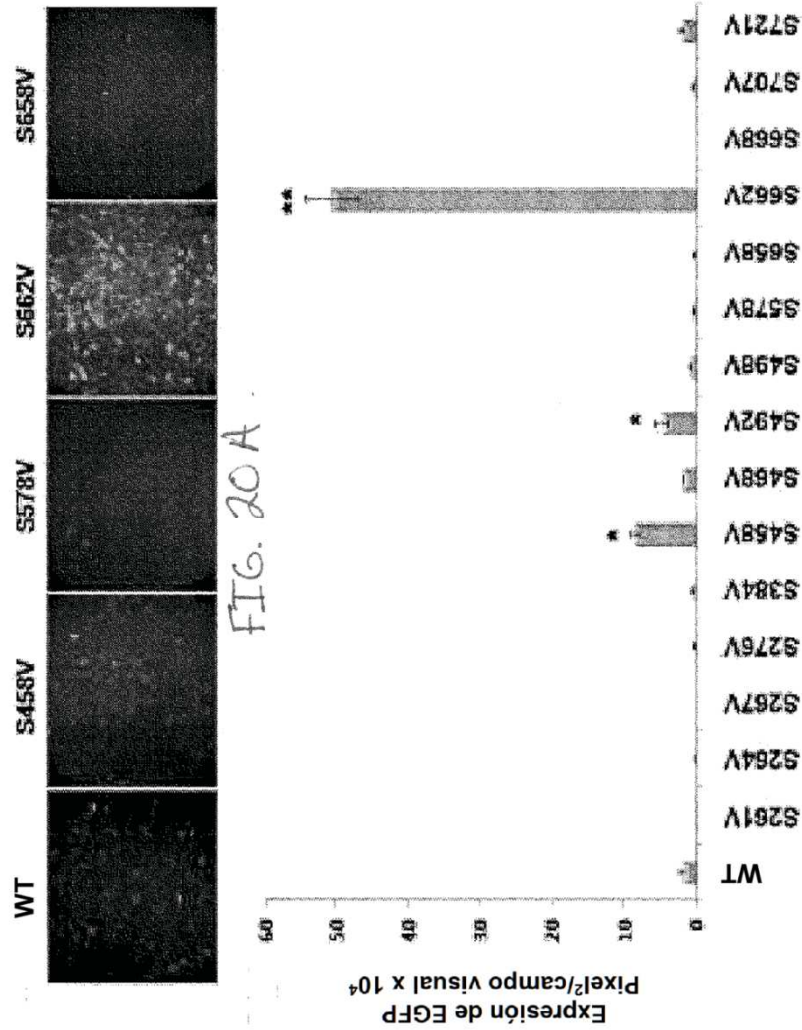


FIG. 19B



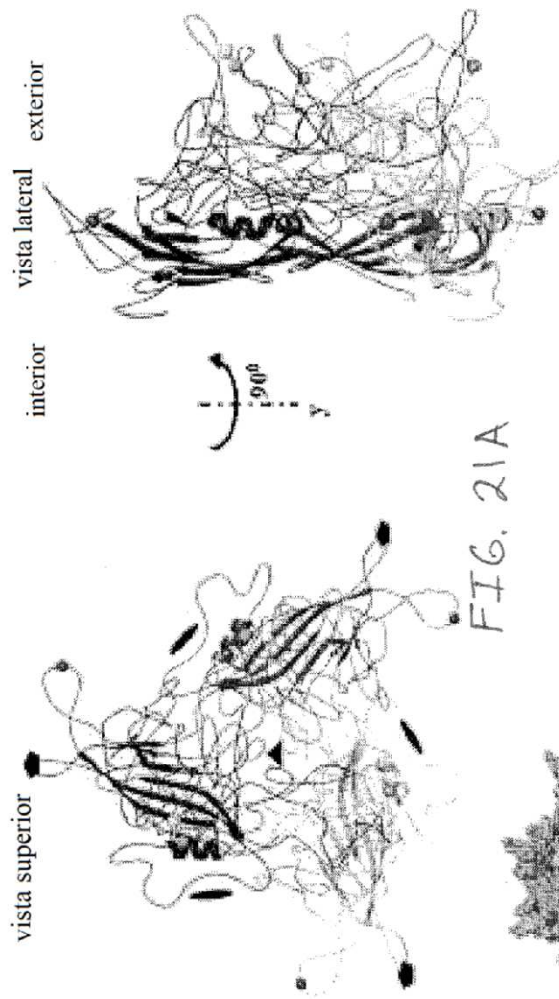


FIG. 21A

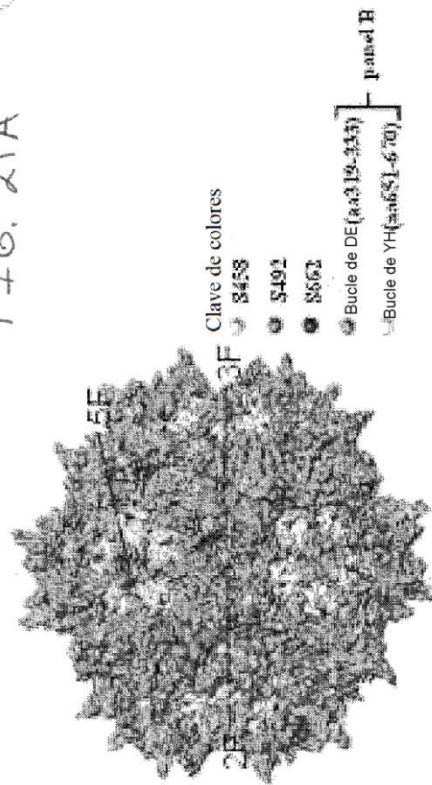


FIG. 21B

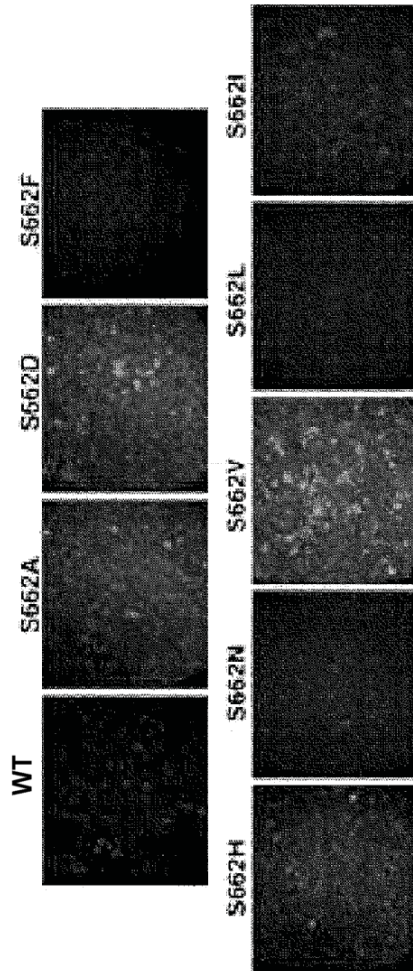


FIG. 22A

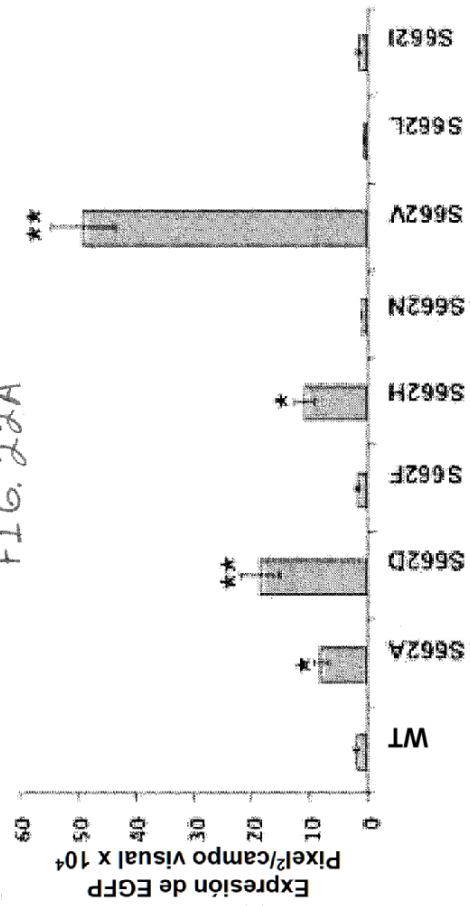
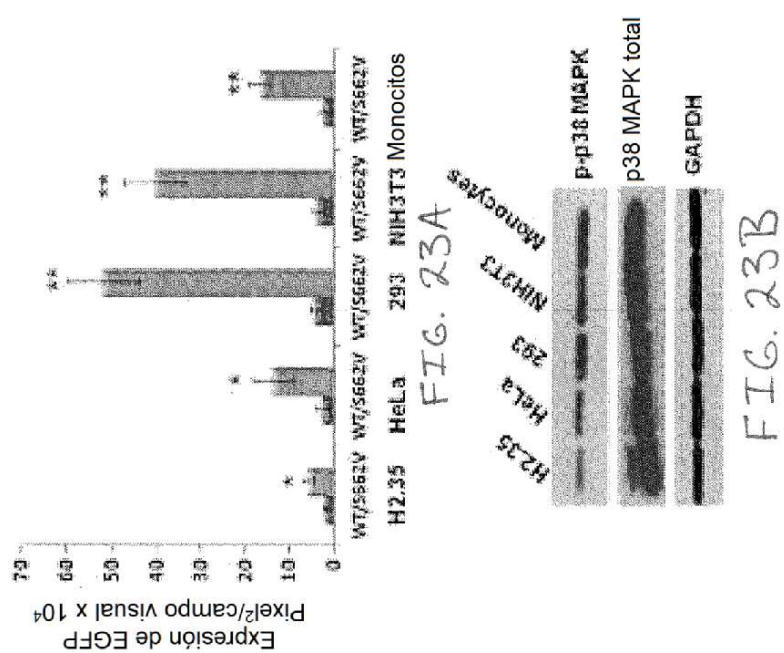


FIG. 22B



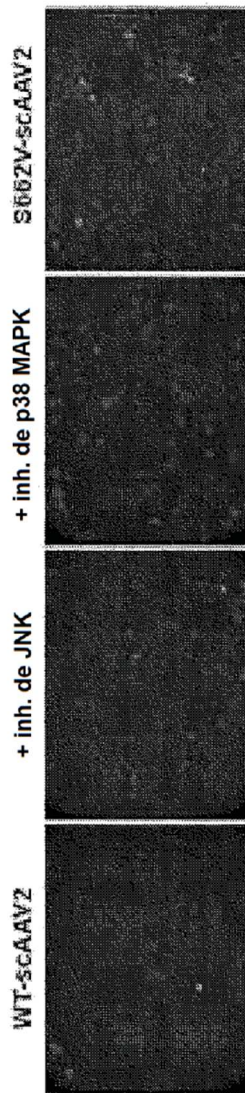
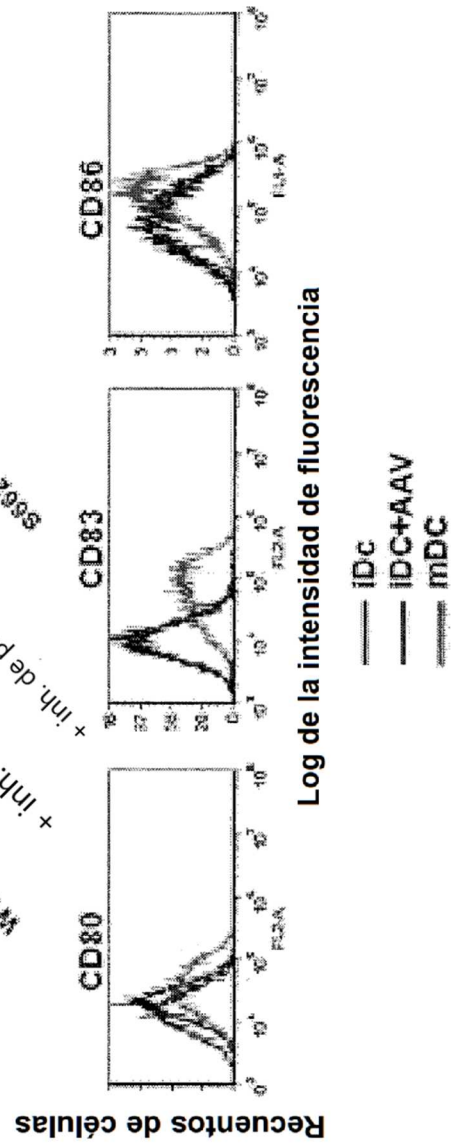
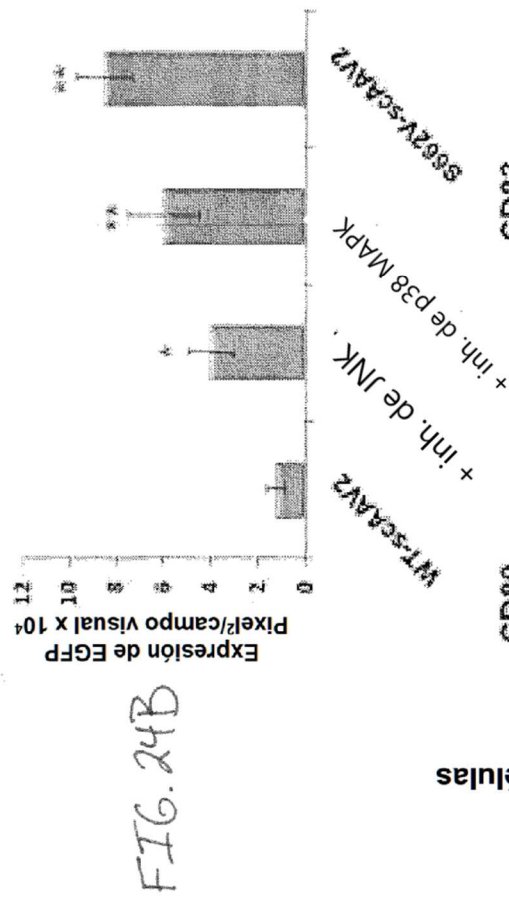


FIG. 24A



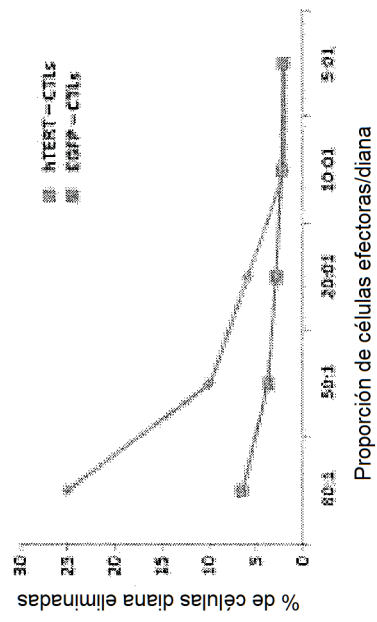


FIG. 25

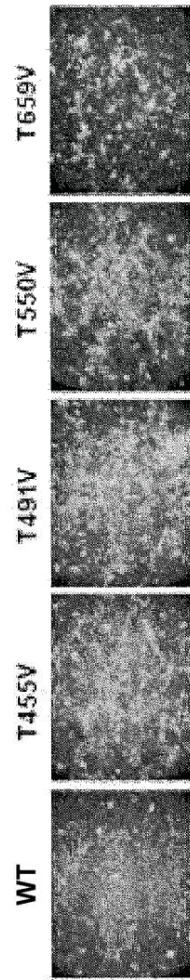


FIG. 26A

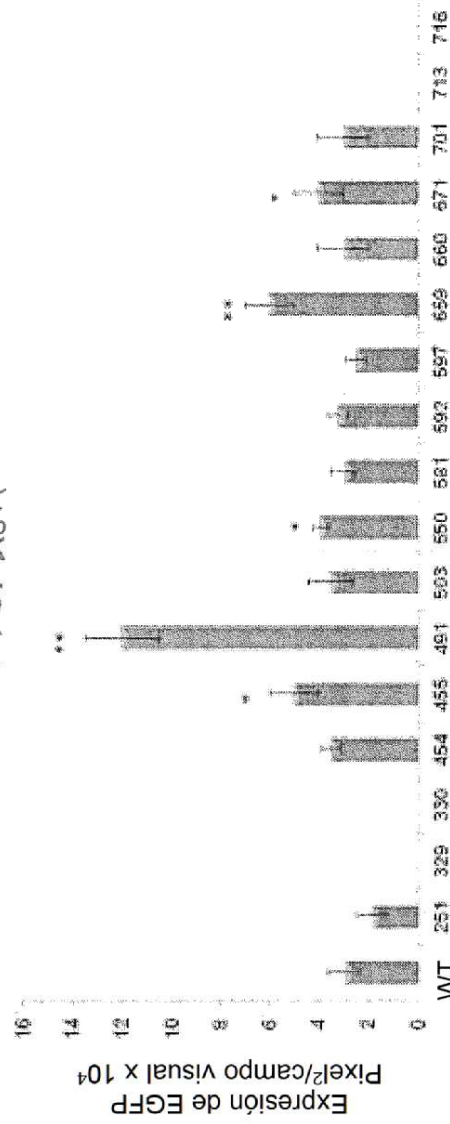


FIG. 26B

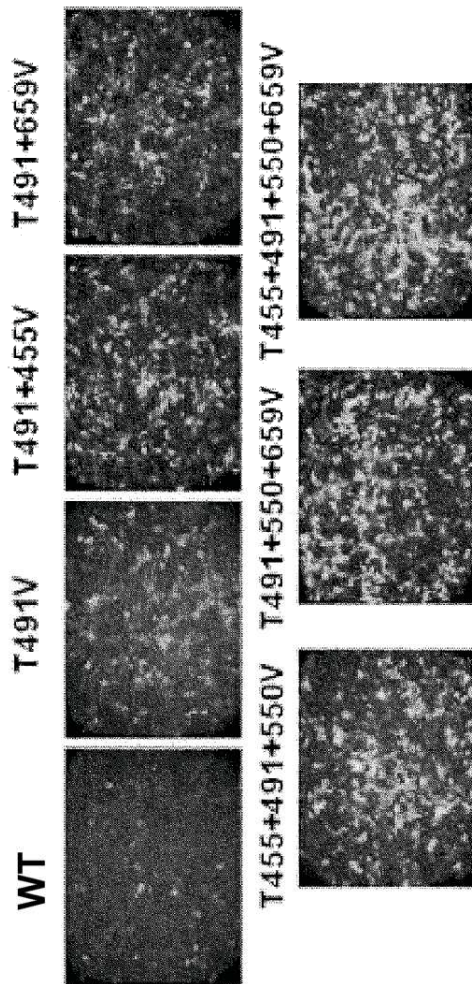
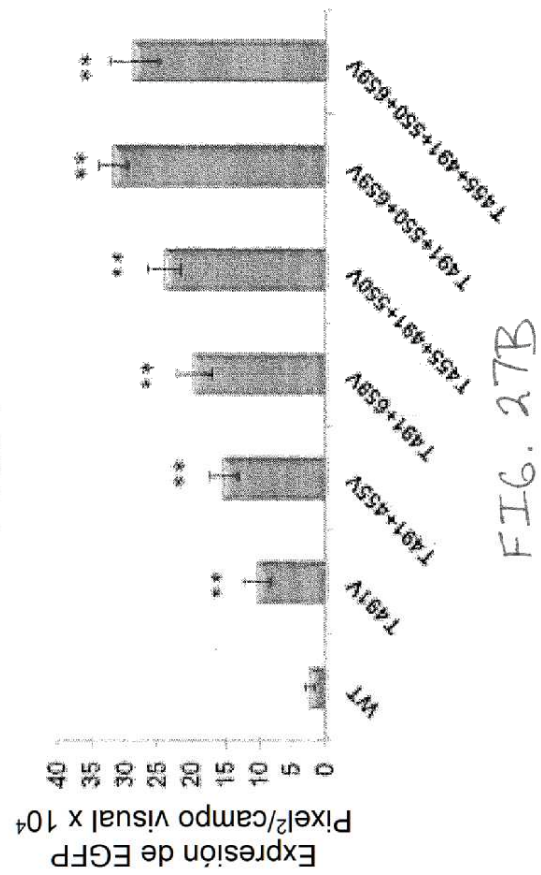


FIG. 27A



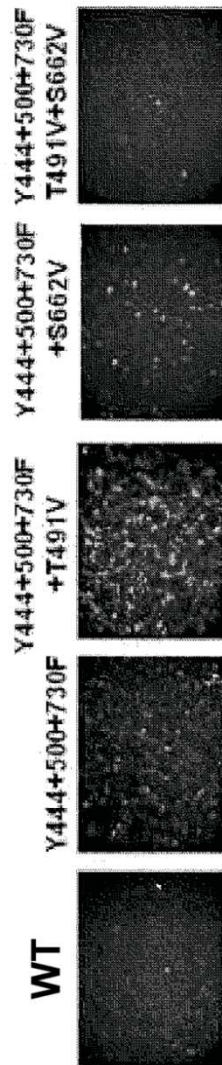


FIG. 28A

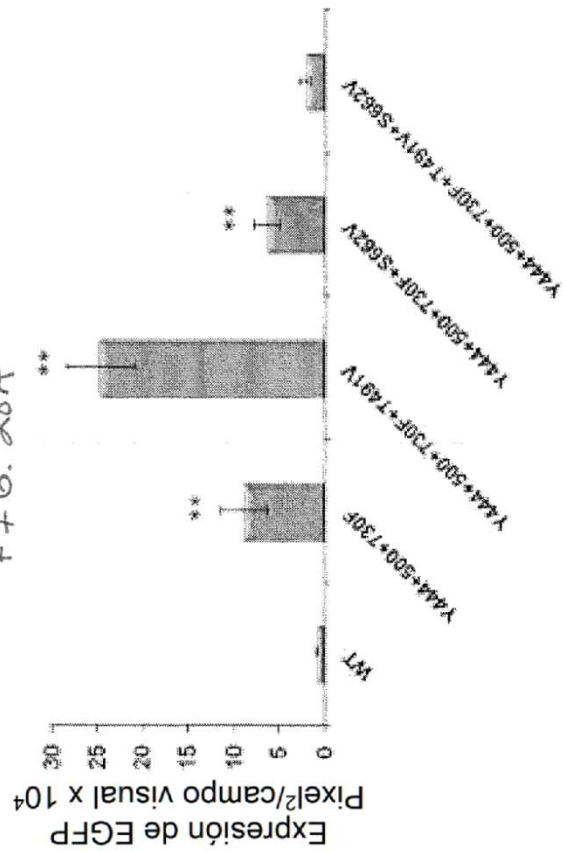


FIG. 28B

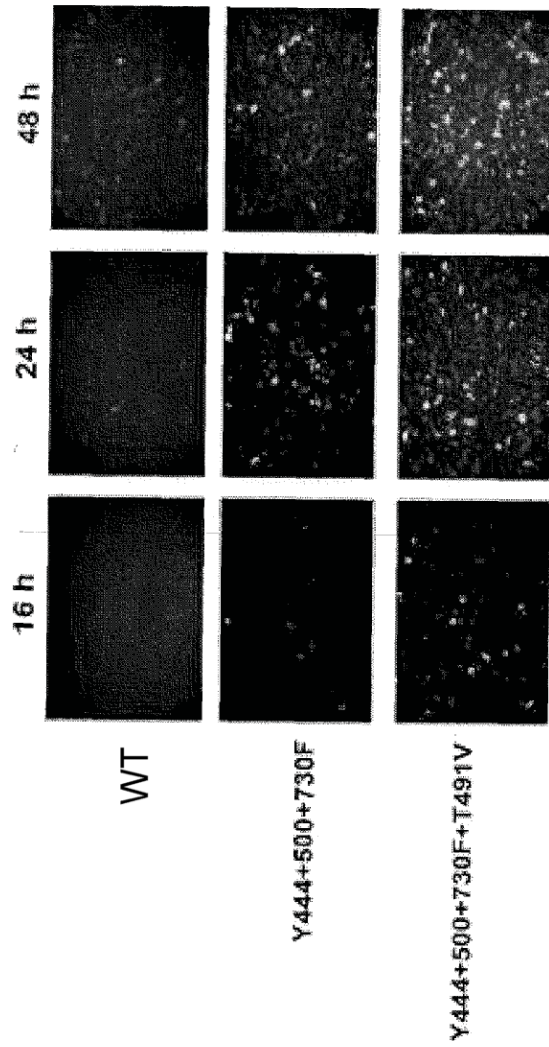


FIG. 29A

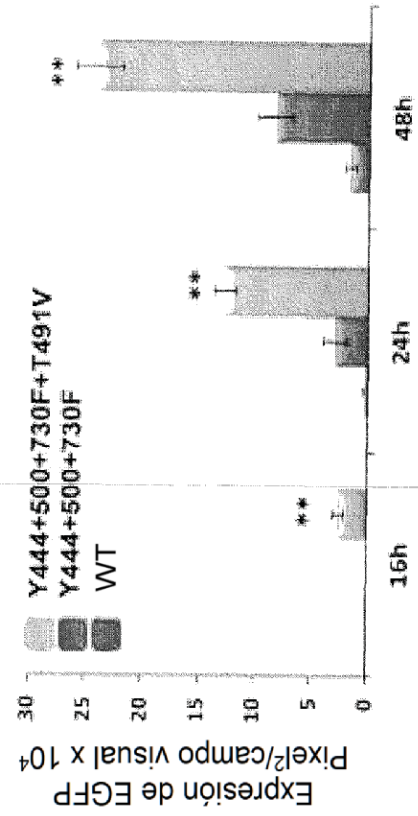
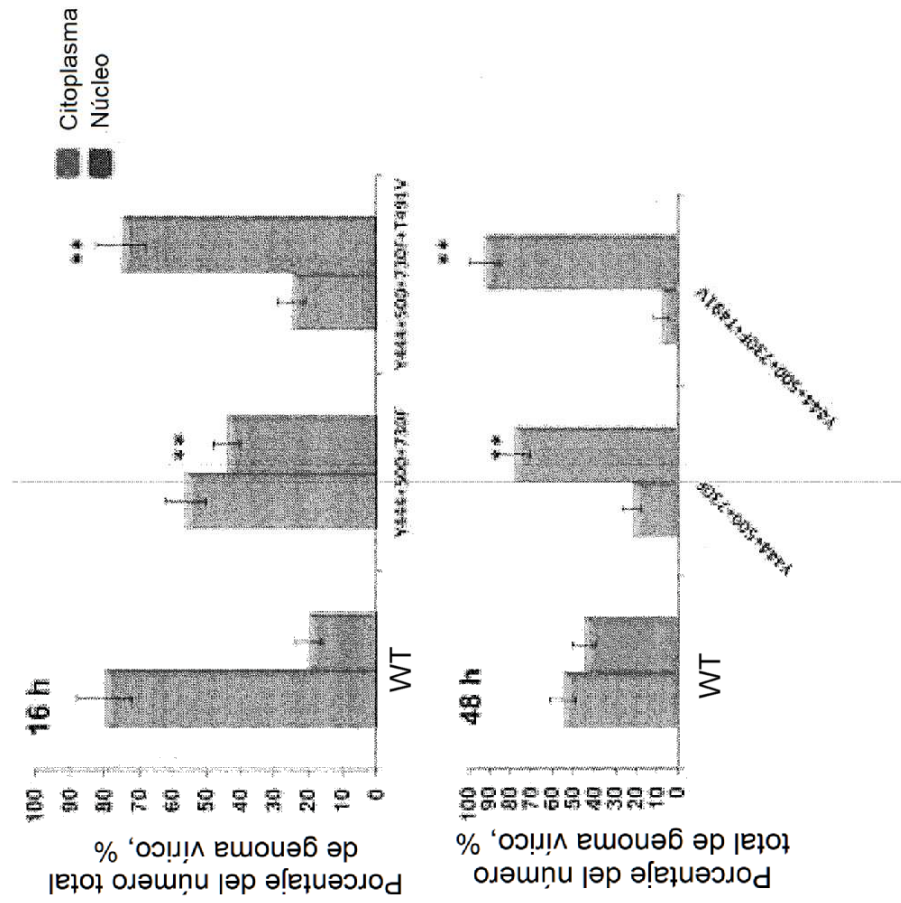


FIG. 29B



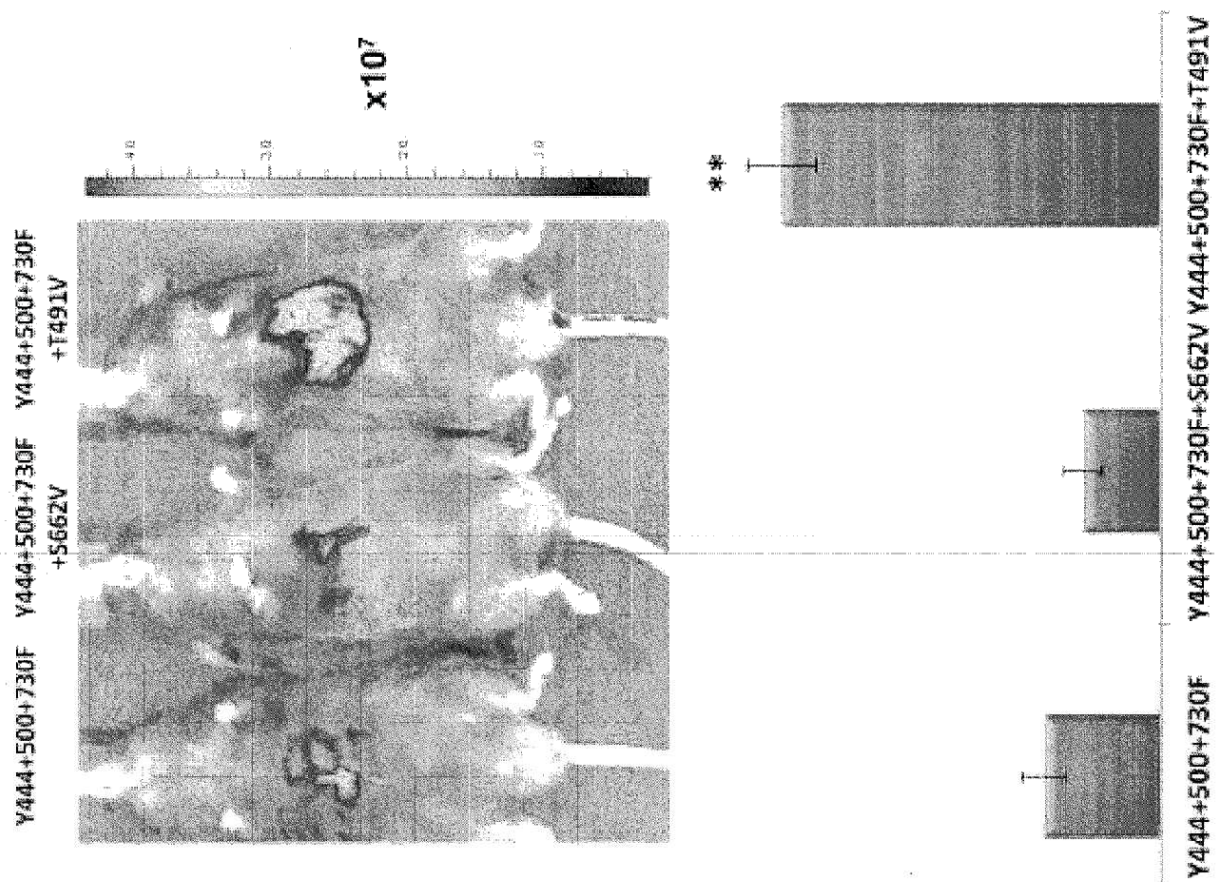


FIG. 31A

FIG. 31B

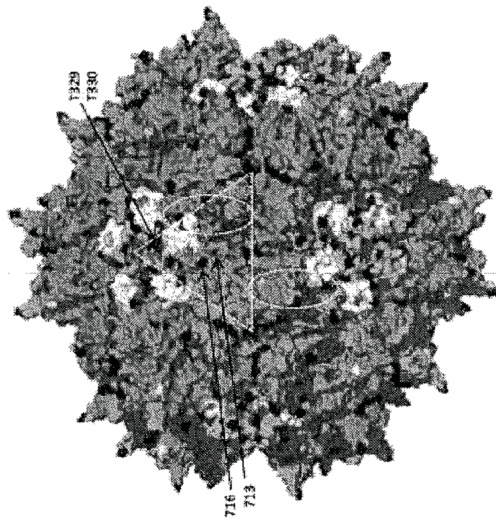


FIG. 32A

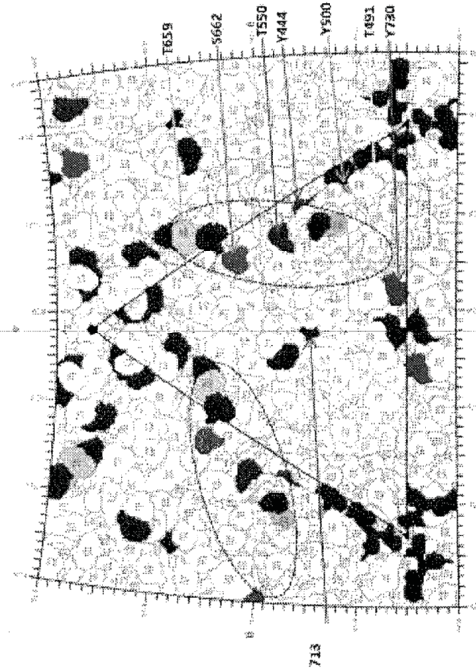


FIG. 32B

FIG. 33A

Alineamiento de aminoácidos en cápsides de serotipos de AAV

Cápside de AAV1	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	100
Cápside de AAV2	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	
Cápside de AAV3	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	
Cápside de AAV4	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	
Cápside de AAV5	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	
Cápside de AAV6	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	
Cápside de AAV7	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	
Cápside de AAV8	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	
Cápside de AAV9	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	
Cápside de AAV10	(1)	MAADGYLPDWLEDNISGIRRWWDIKKCAPKPRANQOQDGRGLVILPGYKYLGPENGLDKGEVYNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPYLRYNHADAEEF	200
Cápside de AAV1	(101)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV2	(101)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV3	(101)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV4	(100)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV5	(100)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV6	(101)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV7	(101)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV8	(101)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV9	(101)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	
Cápside de AAV10	(101)	QERLOEDTSFGGNLCRAVFOAKKRVLLEPLGLVEFGAKTAPKRRVPSQPSQ--PDSSSGIGKTCOPAKKRINFGQIGDSESVDPDPOPLGEPPTATPRAVG	300
Cápside de AAV1	(200)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV2	(200)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV3	(200)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV4	(196)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV5	(190)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV6	(200)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV7	(201)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV8	(201)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV9	(200)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	
Cápside de AAV10	(201)	PTTMAAGGAPMADNNEGADGVGNAGSNHCHDSWIGDRVITTTSTRTWALPTNNHLYKQISSAST--GASNDNHYTGSTPWGYFDENRTHCHTSPRDWQ	400
Cápside de AAV1	(299)	RLINNNWGERPKRLNFKLENIQVKEVTQNDGTTTANNLTSTVQVITDSEYQILPYVLSAHOGLPPEPADVFMVPOYGYLTNNGSQA---VGRSSSYFC	
Cápside de AAV2	(298)	RLINNNWGERPKRLNFKLENIQVKEVTQNDGTTTANNLTSTVQVITDSEYQILPYVLSAHOGLPPEPADVFMVPOYGYLTNNGSQA---VGRSSSYFC	
Cápside de AAV3	(298)	RLINNNWGERPKRLNFKLENIQVKEVTQNDGTTTANNLTSTVQVITDSEYQILPYVLSAHOGLPPEPADVFMVPOYGYLTNNGSQA---VGRSSSYFC	
Cápside de AAV4	(289)	RLINNNWGERPKRLNFKLENIQVKEVTQNDGTTTANNLTSTVQVITDSEYQILPYVLSAHOGLPPEPADVFMVPOYGYLTNNGSQA---VGRSSSYFC	
Cápside de AAV5	(289)	RLINNNWGERPKRLNFKLENIQVKEVTQNDGTTTANNLTSTVQVITDSEYQILPYVLSAHOGLPPEPADVFMVPOYGYLTNNGSQA---VGRSSSYFC	

(Continuación)

FIG. 33A (continuación)

Cápside de AAV6	(299)	RLINNACRRPRINAELENTONAVITITUGVITIANNTITVOVDEBVOIPVYLSNHCCLPPEAVTMIPOYGYLILNNGSOA---VGRSEFYC	500
Cápside de AAV7	(300)	RLINNACRRPRINAELENTONAVITITUGVITIANNTITVOVDEBVOIPVYLSNHCCLPPEAVTMIPOYGYLILNNGSOA---VGRSEFYC	
Cápside de AAV8	(301)	RLINNACRRPRINAELENTONAVITITUGVITIANNTITVOVDEBVOIPVYLSNHCCLPPEAVTMIPOYGYLILNNGSOA---VGRSEFYC	
Cápside de AAV9	(300)	RLINNACRRPRINAELENTONAVITITUGVITIANNTITVOVDEBVOIPVYLSNHCCLPPEAVTMIPOYGYLILNNGSOA---VGRSEFYC	
Cápside de AAV10	(301)	RLINNACRRPRINAELENTONAVITITUGVITIANNTITVOVDEBVOIPVYLSNHCCLPPEAVTMIPOYGYLILNNGSOA---VGRSEFYC	
Cápside de AAV1	(396)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	401
Cápside de AAV2	(395)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV3	(395)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV4	(389)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV5	(388)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV6	(396)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV7	(397)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV8	(398)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV9	(397)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV10	(398)	LEYTPSOMLRTGNNEFTSYTEPEEPFHSVAHSCSTPRINPLIDCQYLYKXENRQ---NCSGSAKNDLPSLSGSPAGVAVSPRNVHPPEHPCQVSKRT	
Cápside de AAV1	(495)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	501
Cápside de AAV2	(494)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV3	(495)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV4	(489)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV5	(481)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV6	(495)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV7	(497)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV8	(497)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV9	(495)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV10	(497)	DN-----NNSNFVHCASKKXELNCRSEHNEPGLAWASHKQDQKPPPSQVIMPEKE---SAGASATATADNVMTIDEELERATDPVATPFUTVAVNFQ	
Cápside de AAV1	(587)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	601
Cápside de AAV2	(586)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV3	(587)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV4	(585)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV5	(576)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV6	(587)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV7	(588)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV8	(589)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV9	(587)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV10	(589)	ESTDPAIGDVAACALPGVWQDRVYLOGPIWAKIPHTDGFHPSFIMGFGKPNPFPQITKTPVPANPEAFSAKEASFIITQISTQVSVLEIAME	
Cápside de AAV1	(687)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 1	701
Cápside de AAV2	(686)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 2	
Cápside de AAV3	(687)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 3	
Cápside de AAV4	(685)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 4	
Cápside de AAV5	(675)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 5	
Cápside de AAV6	(687)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 6	
Cápside de AAV7	(688)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 7	
Cápside de AAV8	(689)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 8	
Cápside de AAV9	(687)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 9	
Cápside de AAV10	(689)	LOKNSKRWNPPEQYTSNRYKSAKMDTVDNCHVTPRTPGTYLILNPLI---SEQ ID NO: 10	

(Continuación)

FIG. 33B

Alineamiento de restos de serina y treonina en cápsides de serotipos de AAV

Cápside de AAV1	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	100
Cápside de AAV2	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
Cápside de AAV3	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
Cápside de AAV4	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
Cápside de AAV5	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
Cápside de AAV6	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
Cápside de AAV7	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
Cápside de AAV8	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
Cápside de AAV9	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
Cápside de AAV10	(1)	MAADGYPDWIEDNLSEGI	
		101	
Cápside de AAV1	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	200
Cápside de AAV2	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
Cápside de AAV3	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
Cápside de AAV4	(100)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
Cápside de AAV5	(100)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
Cápside de AAV6	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
Cápside de AAV7	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
Cápside de AAV8	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
Cápside de AAV9	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
Cápside de AAV10	(101)	QERLQEDTSFGGNLGRAV	
		201	
Cápside de AAV1	(200)	PTTWSAGGGA	300
Cápside de AAV2	(200)	TNTMATGSGA	
Cápside de AAV3	(200)	SNTWASGGGA	
Cápside de AAV4	(196)	EMRAAAGGA	
Cápside de AAV5	(190)	ADTWSAGGG	
Cápside de AAV6	(200)	PTTWSAGGGA	
Cápside de AAV7	(201)	SGTVAAGGGA	
Cápside de AAV8	(201)	PNTVAAGGGA	
Cápside de AAV9	(200)	SLTWSAGGGA	
Cápside de AAV10	(201)	SGTVAAGGGA	
		301	
Cápside de AAV1	(299)	RLINNNGFRPKRLNFK	400
Cápside de AAV2	(298)	RLINNNGFRPKRLNFK	
Cápside de AAV3	(298)	RLINNNGFRPKRLNFK	
Cápside de AAV4	(289)	RLINNNGFRPKRLNFK	

(Continuación)

Alineamiento de restos de tirosina en cápsides de serotipos de AAV

[illegible]

(Continuación)

Mutante	Eficacia de empaquetado	Eficacia de transducción
AAV2-S261V	~10 veces menor	~ ¹⁰
AAV2-S264V	Sin cambios	~ ¹⁰
AAV2-S267V	Sin partículas resistentes a DNAsa I	~ ¹⁰
AAV2-S276V	~10 veces menor	~ ¹⁰
AAV2-S384V	~3 veces mayor	~10 veces menor
AAV2-S458V	Sin cambios	~4 veces mayor
AAV2-S468V	~5 veces mayor	Sin cambios
AAV2-S492V	Sin cambios	~2 veces mayor
AAV2-S498V	Sin cambios	~10 veces menor
AAV2-S578V	Sin cambios	~10 veces menor
AAV2-S658V	~10 veces menor	~ ¹⁰
AAV2-S662V	Sin cambios	~20 veces mayor
AAV2-S668V	Sin partículas resistentes a DNAsa I	~ ¹⁰
AAV2-S707V	Sin cambios	~10 veces menor
AAV2-S721V	Sin cambios	Sin cambios

Los ensayos de empaquetado e infectividad del vector se llevaron a cabo al menos dos veces para cada uno de los vectores AAV mutantes. La eficacia de empaquetado se determinó mediante análisis de PCR cuantitativa. La eficacia de transducción se estimó mediante la intensidad de fluorescencia de células HEK293 infectadas con una MOI de 1000 vgs/célula.

* No se detectó fluorescencia a la MOI evaluada.

FIG. 34

Mutante	Eficacia de empaquetado	Eficacia de transducción
AAV2-S662V	Sin cambios	~20 veces mayor
AAV2-S662A	~5 veces mayor	~3 veces mayor
AAV2-S662D	Sin cambios	~8 veces mayor
AAV2-S662F	~10 veces menor	Sin cambios
AAV2-S662H	Sin cambios	~4 veces mayor
AAV2-S662N	~10 veces menor	Sin cambios
AAV2-S662L	~10 veces menor	Sin cambios
AAV2-S662I	~10 veces menor	Sin cambios

Los ensayos de empaquetado e infectividad se llevaron a cabo como se describe en la leyenda de la tabla 1.

V: valina; A: alanina; D: ácido aspártico; F: fenilalanina; H: histidina; N: asparagina; L:leucina; e I: isoleucina.

FIG. 35

FIG. 36A

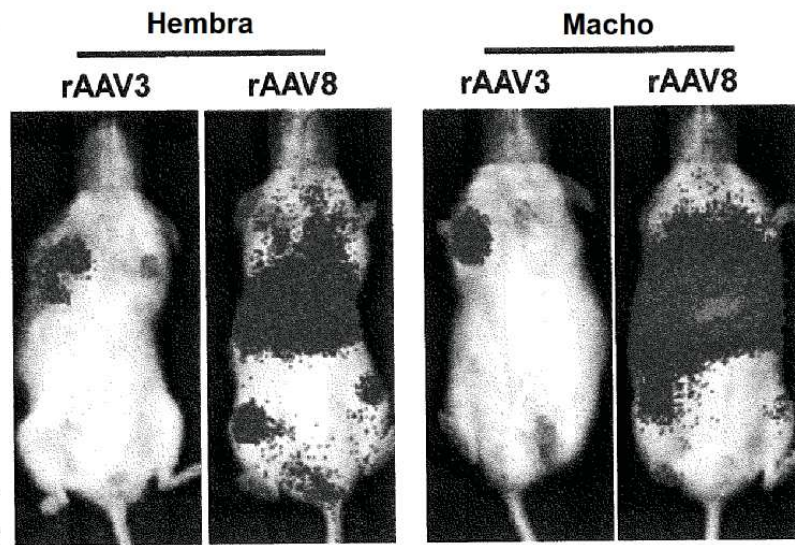


FIG. 36B

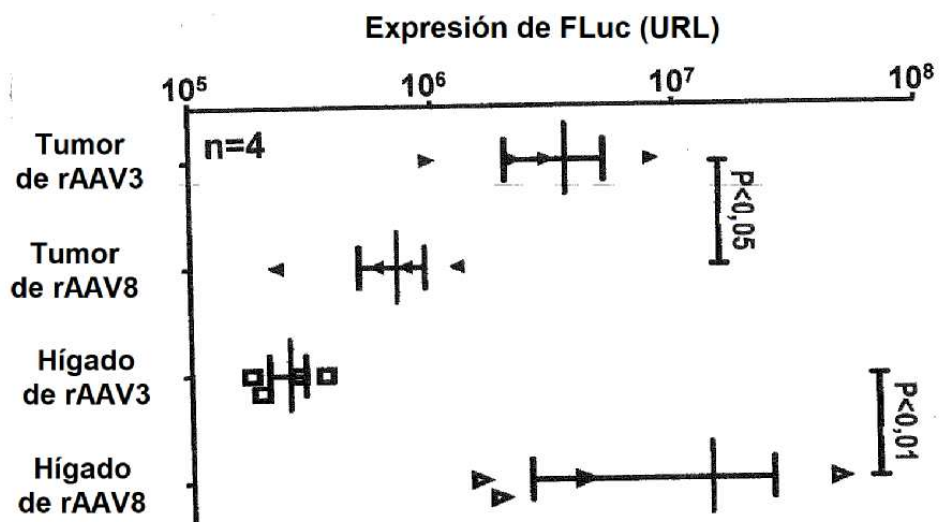


FIG. 36C

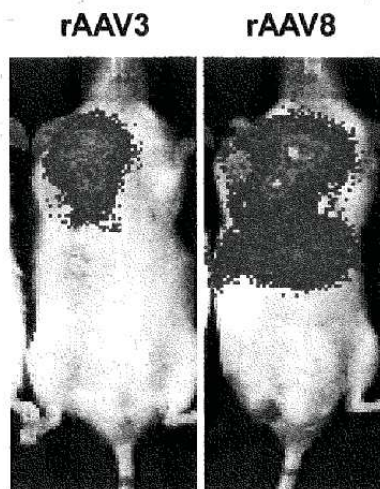


FIG. 36D

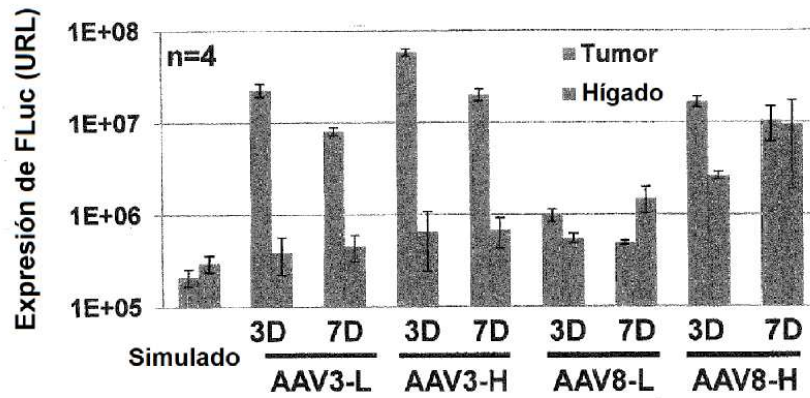


FIG. 36E

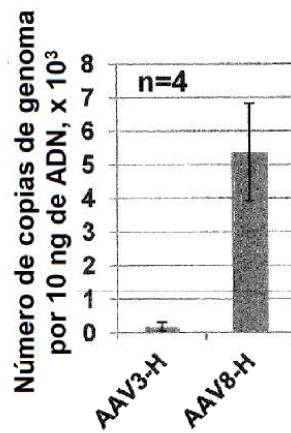


FIG. 37A

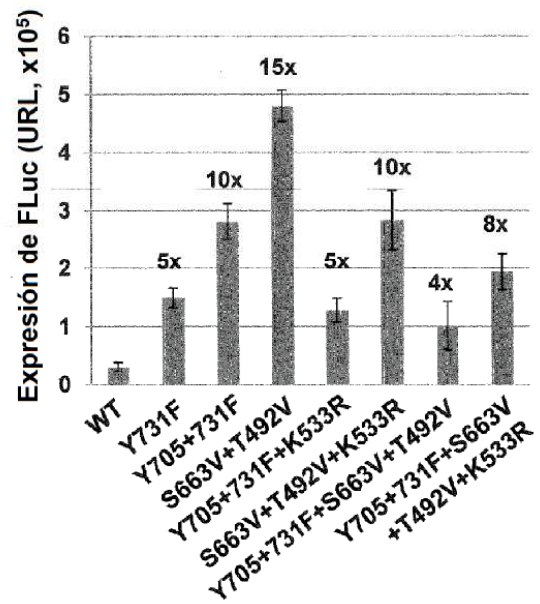
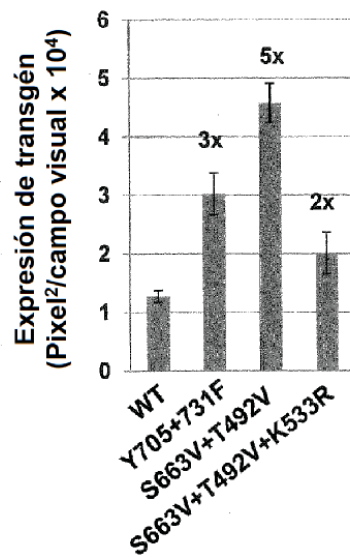


FIG. 37B



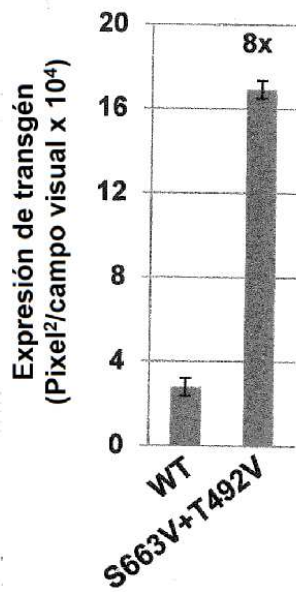


FIG. 37C

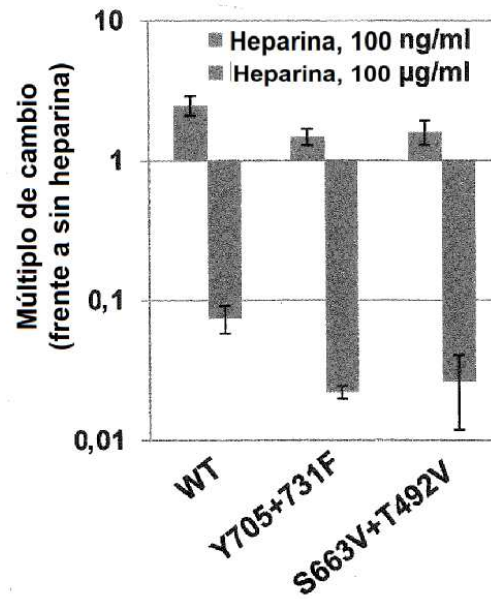


FIG. 37D

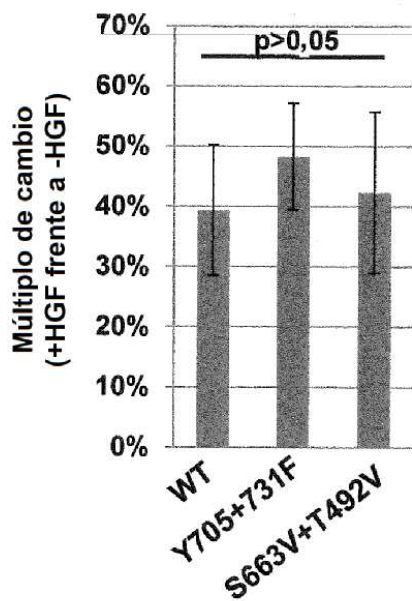


FIG. 37E

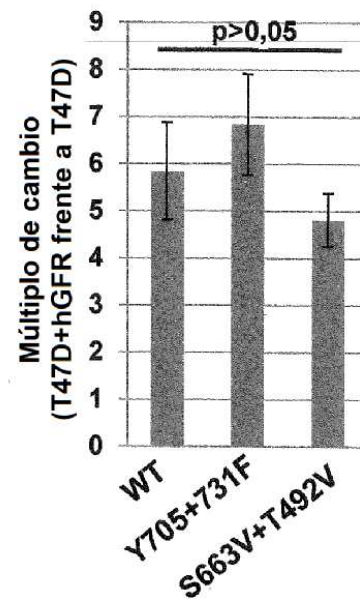


FIG. 37F



FIG. 38A

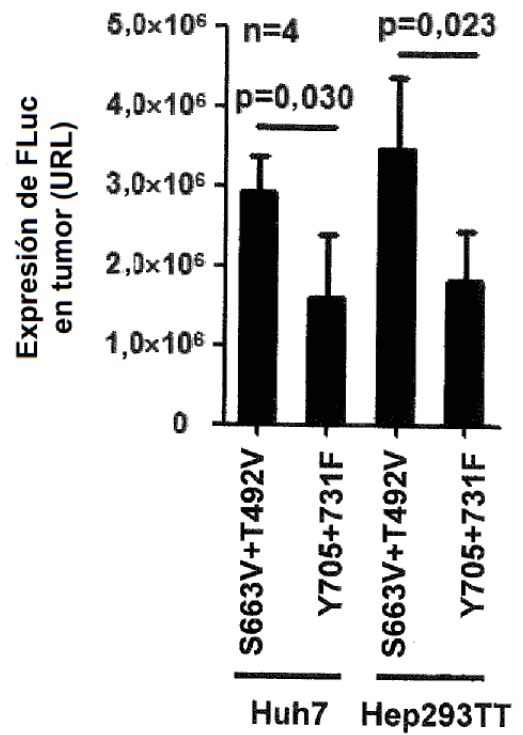


FIG. 38B

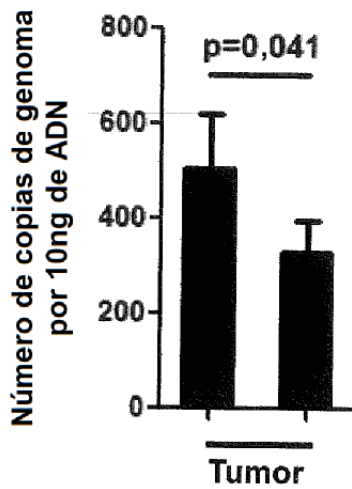


FIG. 38C

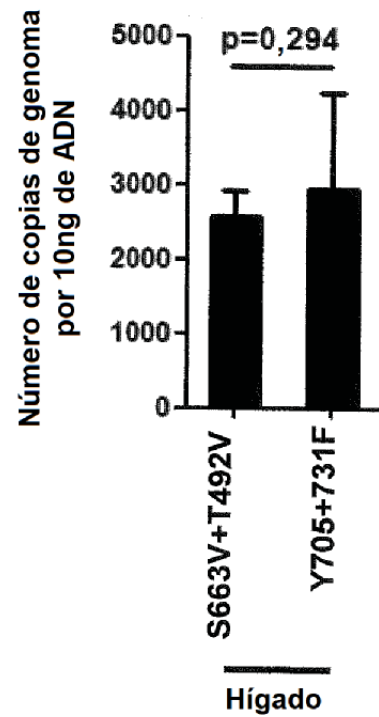


FIG. 38D

FIG. 39A

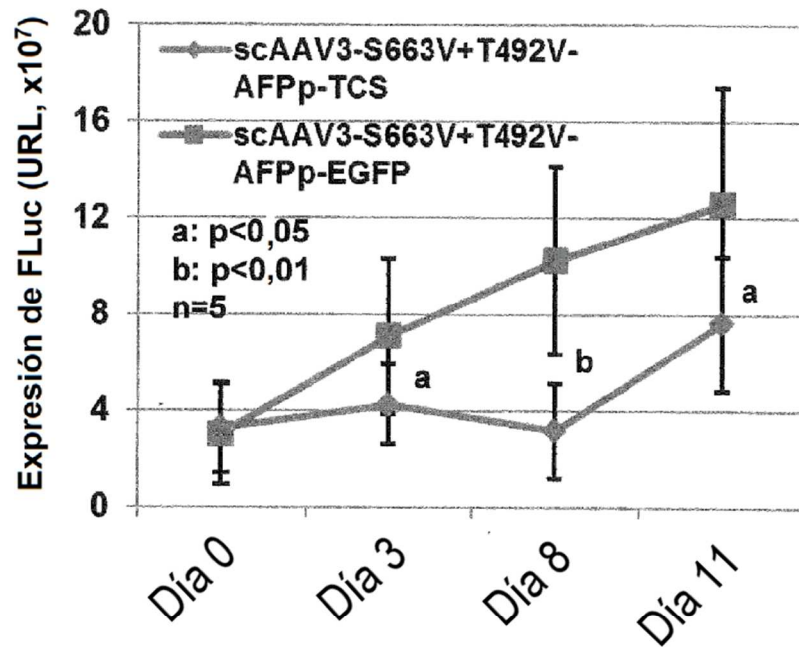


FIG. 39B

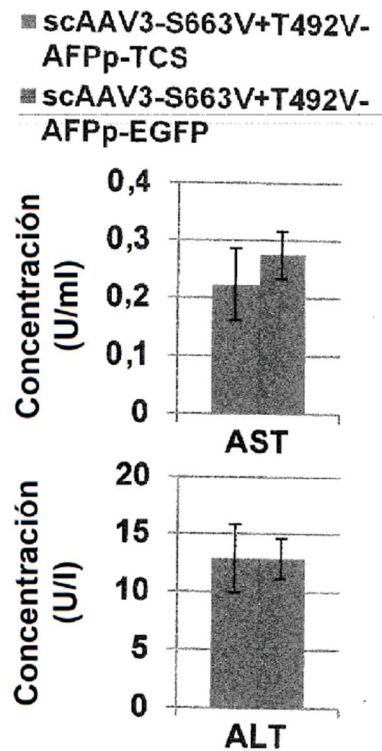
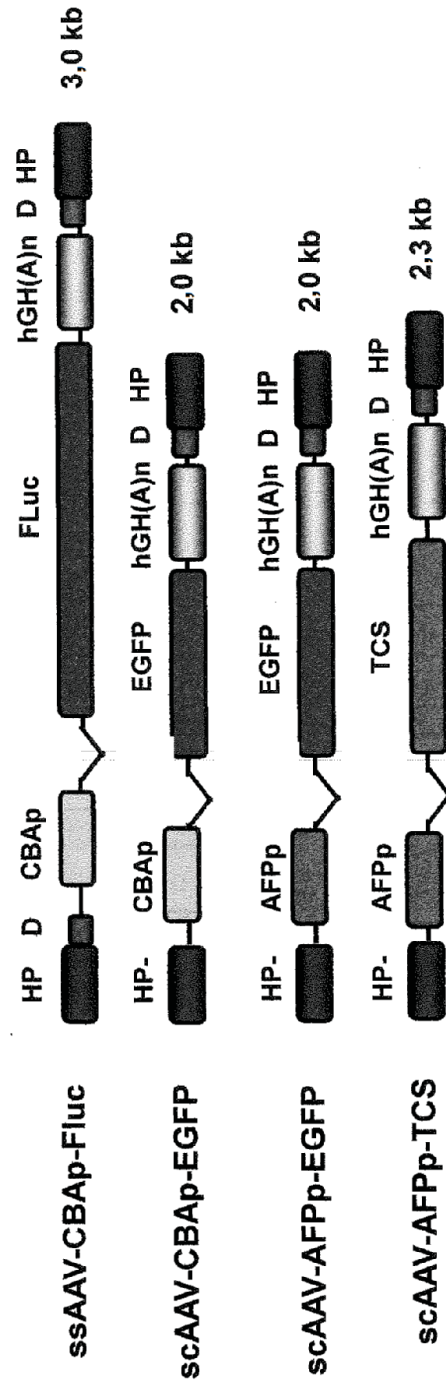


FIG. 39C

FIG. 40A



ATGATCAGATTCTTAGTCCTCTCTTTGCTAATTCACCCCTCTTCTAACAACCTCCTGCTGTGGAGGGCGATGTTAGCTTCCGTTTAT
 CAGGTGCAACAAGCAGTTCCCTATGGAGTTTTCATTTCAAAATCTGAGAAAAGCTCTTCCAAATGAAAGGAAACTGTACGATATCCCTCT
 GTTACGTTCTCTCTCCAGGTTCTCAACGCTACGCATTGATCCATCTCACAATACGCCGATGAAACCAATTTCAAGTGGCCATAGA
 CGTAACGAACGCTCTATATTATGGGATATCGCGCTGGCGATACATCCTATTTTTCAACGAGGCTTCTGCAACAGAGCTGCAAAATA
 TGTATTCAAAGACGCTATGCGAAAAGTTACGCTTCCATATTCTGGCAATTACGAAAGGCTTCAAACCTGCTGCAGGCAAAATAAGGGA
 AAATATTCGCTTGGACTCCCTGCTTTGGACAGTGCCATTACCACTTTGTTTACTACAACGCCAAATCTGCTGCGTCGGCACTTAT
 GGTACTCATTACGTCGACGCTGAGGCTGCGAGGTATAAATTTATTGAGCAACAATTTGGGAAGCGTGTGACAAAACCTTCCCTACC
 AAGTTTAGCAATTATAAGTTTGAAAATAGTTGGTCTCTCTCCTCAAGCAAAATTCAGATAGCGAGTACTAATAATGGACAGTTTGAA
 AGTCTGTTGTGCTTATAAATGCTCAAAACCAACGAGTCACGATAACCAATGTTGATGCTGGAGTTGTAACTCCCAACATCGCGTTG
 CTGCTGAATAGAAACAATATGGCAGCCCATGGATGACGATGTTCTCTATGACACAGAGCTTTGGATGTGGAAAGTTATGCTATTTAG

(seq ID NO: 26)

F16.40B

FIG. 40B

GAATTGATGATCAGATTCTTAGTCCTCTCTTTGCTAATTCACCCCTCTTCTAACAACCTCCTGCTGTGGAGGGCGATGTTAGCTTCC
 GTTATCAGGTGCAACAAGCAGTTCCCTATGGAGTTTTCATTTCAATCTGAGAAAAGCTCTTCCAAATGAAAGGAAACTGTACGATAT
 CCCTCTGTTACGTTCTCTCTCCAGGTTCTCAACGCTACGCATTGATCCATCTCACAATACGCCGATGAAACCAATTTCAAGTGGCC
 ATAGACGTAACGAACGCTATATTATGGGATATCGCGCTGGCGATACATCCTATTTTTCAACGAGGCTTCTGCAACAGAGCTGCA
 AAATATGTATTCAAAGACGCTATGCGAAAAGTTACGCTTCCATATTCTGGCAATTACGAAAAGGCTTCAAACCTGCTGCAGGCAAAATAA
 GGGAAAATATTCGCTTGGACTCCCTGCTTGGACAGTGCCATTACCACTTTGTTTACTACAACGCCAAATTTCTGCTGCGTCGGCAC
 TTATGGTACTCATTACGTCGACGCTGAGGCTGCGAGGTATAAATTTATTGAGCAACAATTTGGGAAGCGTGTGACAAAACCTTCC
 TACCAAGTTTAGCAATTATAAGTTTGAAAATAGTTGGTCTCTCTCAAGCAAAATTCAGATAGCGAGTACTAATAATGGACAGTTT
 GAAAGTCCCTGTTGTGCTTATAATGCTCAAAACCAACGAGTCACGATAACCAATGTTGATGCTGGAGTTGTAACTCCCAACATCGCG
 TTGCTGCTGAATAGAAACAATATGGCAGCCATGGATGACGATGTTCTCTATGACACAGAGCTTTGGATGTGGAAAGTTATGCTATTCTC
 GAGGACTACAAGGATGACGATGACAAGGATTACAAGACGACGATGATAAGGACTATAAGGATGATGACGACAAATAA

(seq ID NO: 27)

F16.40C

FIG. 40C

Mutantes individuales		Dobles mutantes		Mutantes múltiples	
Y252F	++	Y701+705F	++	Y701+705+731F	++
Y272F	+	Y701+731F	++	Y705+731F+S663V	++
Y444F	+	Y705+731F	++++	Y705+731F+T492V	+
F501Y	+	S663V+T492V	++++	Y705+731F+K533R	+++
Y701F	++			S663V5+T492V+K533R	++++
Y705F	+++			Y705+731F+S663V+T492V	+++
Y731F	+++			Y705+731F+S663V+T492V+K533R	++
S459V	+++				
S663V	+++				
T251V	+				
T492V	++				
K528E	-				
K528R	++				
K533E	-				
K533R	+++				
K545E	+++				
K545R	+++				

-: Reducción mayor de 10 veces

+: Reducción mayor de 2 veces pero menor de 10 veces

++: Aumento menor de 2 veces

+++ : Aumento mayor de 2 veces pero menor de 10 veces

++++: Aumento mayor de 10 veces

FIG. 41