

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 180**

51 Int. Cl.:

C07K 14/015 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/35 (2006.01)

A61K 39/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2010 PCT/EP2010/001343**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10099960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2010 E 10708716 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2403867**

54 Título: **Proteína activadora del ensamblaje (AAP) y su uso para la fabricación de partículas de parvovirus que consisten esencialmente en VP3**

30 Prioridad:

04.03.2009 US 157436 P
19.02.2010 US 306205 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2020

73 Titular/es:

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
MEDIGENE AG (50.0%)

72 Inventor/es:

SONNTAG, FLORIAN;
KLEINSCHMIDT, JÜRGEN;
HÖRER, MARKUS y
LUX, KERSTIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 742 180 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína activadora del ensamblaje (AAP) y su uso para la fabricación de partículas de parvovirus que consisten esencialmente en VP3

5 La presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican la novedosa proteína parvoviral "proteína activadora del ensamblaje" (AAP), los polipéptidos codificados, anticuerpos específicos para AAP, el uso de ácidos nucleicos para la preparación de los polipéptidos, el uso de ácidos nucleicos o polipéptidos para la preparación de la partícula parvoviral y métodos de producción de partículas parvovirales que consisten esencialmente en VP3 proporcionando, además de la secuencia codificante de la proteína estructural parvoviral VP3, un fragmento Z de secuencia/un ácido nucleico que codifica AAP en la célula y que expresa VP3 y el fragmento Z bajo el control de un promotor independiente de rep. Además, la presente invención se refiere a partículas parvovirales que consisten esencialmente en VP3 y/u obtenibles por el método anterior. La presente invención se refiere además a dicha partícula parvoviral para su uso como un medicamento, particularmente una vacuna, o para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades específicas.

20 Se ha mostrado que las partículas de tipo virus (VLPs) basadas en proteínas estructurales de parvovirus mutadas son candidatos a vacuna adecuados (documento de patente WO 2008/145401). Basándose en dichas proteínas estructurales de parvovirus mutadas, se generaron VLPs para la presentación de tolerógenos o pequeños antígenos o incluso epítopes individuales. Estas VLPs demostraron ser especialmente beneficiosas donde tiene que romperse la tolerancia a linfocitos B para tener un efecto terapéutico para el paciente.

25 Para el desarrollo clínico de vacunas basadas en VLPs, es generalmente necesario generar un producto que se base idealmente en un único compuesto activo/proteína y que sea tan puro como sea posible. Con respecto a VLPs, esto es un problema en general ya que los virus están frecuentemente compuestos por más de una proteína y son capaces de encapsidar específicamente ADN viral o inespecíficamente ADN de la célula hospedadora. Por consiguiente, se desea obtener VLPs "puras" que contengan tan pocas proteínas diferentes como sea posible y preferentemente ningún ácido nucleico. En la bibliografía, se han hecho varios intentos por producir eficientemente esas partículas.

30 Rabinowitz et al. (por ejemplo, Rabinowitz et al., 1999) han alterado los genes estructurales de AAV2 por mutagénesis de inserción de conector para definir componentes críticos del ensamblaje de viriones e infectividad. Generaron el mutante H2634 que contenía los ORFs de *rep* y *cap* y una inserción en el sitio de restricción HaeIII en la posición 2634. Y, lo que es más importante, debido a la presencia del ORF de *rep*, este mutante de inserción expresó la proteína Rep respectiva. Ensambló viriones intactos y pareció que la cápside estaba compuesta únicamente por VP3. Según los autores, la expresión indetectable de VP1 y VP2 en cualquier lisado celular o virión purificado podría haber sido un problema de límites de detección.

40 Warrington et al. (2004) y el documento de patente WO 2004/027019 también trataron la cuestión de las funciones específicas de las proteínas de la cápside individuales en la formación de cápsides para definir dónde se pueden insertar péptidos de longitud completa en el ORF de la cápside de AAV sin alteraciones de dominios estructurales críticos. Generaron construcciones que contienen ORF de *rep* y *cap* con mutaciones en los codones de iniciación de VP1, VP2 y/o VP3 y así la expresión de solo una única o dos proteína(s) de la cápside en presencia de Rep, Warrington et al. mostraron que se formaron partículas que contenían genoma, en tanto que estuviera presente la proteína VP3. Por tanto, los mutantes que expresaban VP1 y/o VP2 como únicas proteínas de la cápside o juntas no formaron partículas. Más bien, llegaron a la conclusión a partir de sus resultados que VP1 es necesaria para la infección viral, pero no esencial para el ensamblaje de cápside y la formación de partículas, mientras que VP2 parece ser no esencial para la infectividad viral. Además, observaron que la expresión de VP3 sola de construcciones con codones de iniciación mutados para VP1 y VP2 es suficiente para formar VLPs.

50 Igualmente, Grieger et al. (2007) generaron partículas de solo VP3 usando el plásmido auxiliar de AAV2 pXR2 (que contiene los genes *rep* y *cap*, Li et al. (2008)) mediante mutagénesis del codón de iniciación de VP1 y VP2. La expresión de construcciones de solo VP3, así como de VP2/VP3, en presencia de Rep produjo partículas virales no infecciosas en tanto que carecieran de la subunidad de VP1.

55 A partir de sus resultados sobre la formación de partículas de tipo AAV que contienen genoma de mutantes que expresan VP3 como la única proteína de la cápside en presencia de Rep, pareció que estas partículas se pueden obtener fácilmente.

60 Todas las construcciones de expresión descritas anteriormente expresaron proteínas Rep que se deben omitir para ensamblar VLPs que están compuestas preferentemente por una proteína y ningún ADN. Rep no solo representa una proteína adicional que se une a VLPs, sino que también es responsable de la encapsidación de genomas de virus y ADN inespecífico en cápsides preformadas (King et al., 2001). Se debe evitar la encapsidación de ADN ya que las VLPs pueden entrar posiblemente en células de un paciente y así transfectar dicho ADN contaminante, que puede provocar todo tipo de efectos no deseados.

65

Para estar seguro de que solo se expresa VP3, Hoque et al. (1999a, 1999b) y Handa et al. (documento de patente JP 2001169777) generaron construcciones de expresión que comprendían la secuencia codificante (cds) de VP3 sola bajo el control de un promotor heterólogo en ausencia de cualquier cds de Rep. Sorprendentemente, no pudieron producir partículas virales a partir de estas construcciones de expresión. Analizando una serie de mutantes de delección de VP2 que empezaron la expresión en diferentes sitios 5' del codón de iniciación de VP3, identificaron una región necesaria para la transferencia nuclear de VP3 y encontraron que se correlacionó bien la eficiencia de localización nuclear de las proteínas de la cápside y la eficiencia de formación de VLP. Observaron que se formaron partículas virales en tanto que estuviera presente una región entre el aminoácido 29 y 34 en la cds de VP2 o, en otras palabras, en la extensión 5' de VP3. A partir del motivo de aminoácidos de esta región que es PARKRL, llegaron a la conclusión de que funciona como señal de localización nuclear (NLS), que es importante para la translocación de VP3 en el núcleo.

Alternativamente, también se podrían obtener cápsides si la NLS del antígeno T grande del virus simio 40 (SV40) se fusionara con el extremo N de la proteína VP3 (NLS_{SV40}-VP3). Esta proteína de fusión podría formar VLPs, que indica que la región específica de VP2 localizada en el lado del extremo N de la proteína no se requiere estructuralmente. Debido a este hallazgo, los autores razonaron que VP3 tiene información suficiente para la formación de VLP y que VP2 es necesaria solo para la transferencia nuclear de las proteínas de la cápside, que es nuevamente un requisito previo para la formación de VLP.

Debido al método para la construcción de mutantes usado por ellos, todas las construcciones empezaron con un codón de iniciación ATG directamente en el extremo 5' de la secuencia codificante. Puesto que en general el "efecto de posición" (Kozak, 2002) provocará que el primer codón de iniciación ATG (más aguas arriba) de un transcrito inicie la traducción, la principal proteína a expresar y generar la partícula será VP3 extendida en el extremo N. Solo una parte menor de la traducción empezará en el codón de iniciación ATG más aguas abajo de VP3.

De acuerdo con Hoque et al. (arriba) y Handa et al. (arriba) y usando las construcciones descritas por ellos, los presentes inventores no pudieron detectar VLPs que consistieran en VP3 sola a partir de construcciones de expresión que comprenden la cds de VP3 sola bajo el control de un promotor constitutivo ni en las células de mamífero ni en las células de insecto en cantidades cuantitativas (que significa que estaban presentes $<10^{10}$, particularmente $<10^8$ cápsides/ml) usando el ELISA de valoración de AAV2 (cuantificado según las instrucciones del fabricante Progen, Heidelberg, Alemania, Fig. 15B). Ni los presentes inventores pudieron detectar partículas de tipo AAV que expresaran VP1 o VP2 solas de construcciones de expresión que comprenden la cds respectiva sola a partir de un codón ATG bajo el control de un promotor constitutivo. La eficiencia de la producción de cápsides de todas las construcciones solas o en diferentes combinaciones de diferentes relaciones en presencia o ausencia de expresión de Rep y en presencia o ausencia de co-administración de genes auxiliares adenovirales estuvo en el límite de detección más bajo del ELISA de valoración de AAV2 ($<10^8$ cápsides/ml, véase anteriormente).

Los presentes inventores pudieron confirmar que se pueden generar VLPs a partir de construcciones de expresión que comprenden alguna secuencia 5' del codón de iniciación de VP3 junto con la secuencia que codifica VP3, pero a diferencia de los resultados de Hoque et al., los presentes inventores no pudieron cuantificar el ensamblaje de cápside en cantidades detectables ($\geq 10^8$ cápsides/ml, véase el Ejemplo 8) usando la construcción de fusión de NLS_{sv40}-VP3. Por consiguiente, el método de Hoque et al. no es adecuado para la generación de una gran cantidad de VLPs puras adecuadas para fines de vacunación para el mercado.

Tomados conjuntamente, las técnicas del estado de la técnica o bien usan sistemas de expresión en presencia de Rep que conducen inevitablemente a la encapsidación de Rep y ADN, o en ausencia de Rep los rendimientos de VLPs de VP3 son demasiado bajos para generar un proceso o producto comercialmente viable.

Por consiguiente, fue un objeto de la presente invención proporcionar partículas útiles como vacuna basadas en VLPs y métodos de producción de las mismas que eviten una o más de las desventajas anteriores. Particularmente, se desea que las VLPs consistan esencialmente en solo un tipo de proteína viral, no contengan ADN o solo muy pocas cantidades de ADN y/o que se puedan producir en un modo económico, por ejemplo con altos rendimientos.

El problema se resuelve proporcionando partículas parvovirales que consisten esencialmente en VP3, con esencialmente ninguna proteína VP1, VP2 y Rep. Se pueden producir expresando en una célula VP3 de una secuencia codificante (cds) de VP3 de la proteína de estructura parvoviral VP3 (cds de VP3) bajo el control de un promotor independiente de rep. Además, en este método se expresa un fragmento de secuencia de ADN (fragmento Z) que codifica (parcialmente) un polipéptido recién identificado denominado "proteína activadora del ensamblaje" (AAP), que permite altos rendimientos, por ejemplo, que se formen aproximadamente 10^5 , preferentemente aproximadamente 10^6 , y más preferentemente aproximadamente 10^7 partículas de virus por célula. La identificación de esta novedosa proteína es un concepto totalmente nuevo con respecto al ensamblaje de cápside parvoviral en general y especialmente para cápsides de VP3, ya que no se requiere motivo de secuencia dentro de una proteína VP2 tal como el motivo "PARKRL" postulado o una secuencia de localización nuclear heteróloga para VP3 como se postula (Hoque et al., 1999a, 1999b).

A diferencia del estado de la técnica, estas VLPs no contienen una NLS heteróloga o una proteína VP2. Tras la

inserción del epítipo en uno o varios de los sitios preferidos en VP3, se podrían ensamblar satisfactoriamente partículas que presentaron epítipes para el desarrollo de vacunas. Con este método se forman 10^{11} , preferentemente aproximadamente 10^{12} , y más preferentemente aproximadamente 10^{13} partículas de virus por ml de lisado en bruto y, por tanto, los rendimientos son suficientes para un producto comercialmente viable.

Sorprendentemente y en línea con su función de codificar un polipéptido, el fragmento Z de secuencia se puede proporcionar ya sea en *cis* o en *trans* para ensamblar cápsides que consisten esencialmente en VP3. Además, el fragmento Z y VP3 pueden derivar de la misma especie o de especies diferentes de familias de parvovirus, trans-complementándose mutuamente entre sí con respecto al ensamblaje de partículas de VP3.

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

"AA" se usa como abreviatura para aminoácido(s), "nt" se usa como abreviatura para nucleótido(s).

Como se usa en el presente documento, un "parvovirus" o "parvoviral" se refiere a un miembro de la familia de Parvoviridae en donde la forma no mutada expresa VP1, VP2 y VP3 como proteínas de la cápside. La familia de Parvoviridae contiene varios géneros divididos entre 2 subfamilias, Parvoviridae (Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus, Amdovirus y Bocavirus) y Densovirinae (Densovirus, Iteravirus, Brevidensovirus, Pefudensovirus y Contravirus) (Fields: Virology, cuarta edición 2001, Volumen 2, capítulos 69 y 70, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia; <http://virus.stanford.edu/parvo/parvovirus.html> http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_parvo.htm#SubFamily1). La cápside natural se ensambla de las tres proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 que forman las 60 subunidades de la cápside de AAV en una relación de 1:1:8 (Kronenberg et al., 2001). Por tanto, el término "VP3" representa la proteína 3 de virus. La partícula parvoviral que existe de forma natural está compuesta por la cápside icosaédrica que encierra el genoma de ADN monocatenario. Los parvovirus preferidos son los Dependovirus, que incluyen AAV.

Como se usa en el presente documento, el término "serotipo" representa el tipo de virus de un grupo de virus estrechamente relacionados distinguidos por su conjunto característico de antígenos. Así, el serotipo se caracteriza por tipificación serológica (prueba para antígenos reconocibles sobre la superficie del virus). Por consiguiente, el AAV también se puede seleccionar de un serotipo desarrollado a partir de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 a AAV12 y AAV13, en particular de AAV2.

Partículas parvovirales que consisten "esencialmente en VP3" o "esencialmente solo en VP3" significa que la cápside se ensambla con al menos 98 %, preferentemente al menos 99 %, más preferentemente al menos 99,6 % y esencialmente al menos 99,8 % de VP3. Esto significa que solo 1/50, preferentemente 1/100, más preferentemente 1/250 y esencialmente solo 1/500 o menos de las proteínas que ensamblan la cápside son versiones extendidas del extremo N de VP3 o proteínas completamente diferentes. La cápside se puede ensamblar con al menos 98 %, preferentemente al menos 99 %, más preferentemente al menos 99,6 % y esencialmente al menos 99,8 % de VP3, que significa que solo 1/50, preferentemente 1/100, más preferentemente 1/250 y esencialmente solo 1/500 o menos de las proteínas que ensamblan la cápside son versiones extendidas del extremo N de VP3 o proteínas parvovirales diferentes. Se prefiere especialmente que la cápside parvoviral consista solo en una proteína, que es VP3 en su secuencia natural o una forma mutada de ella.

Una "secuencia codificante" o "cds" significa la porción de un gen que especifica directamente la secuencia de aminoácidos (AA) de su producto. Por tanto, la "secuencia codificante de VP3" o "cds de VP3" define la parte del gen cap de la que se traduce el código genético en la secuencia de aminoácidos (AA) de una VP3, que puede ser natural o mutada como se define adicionalmente en la presente invención. La cds de VP3 se localiza en el extremo 3' de ORF de cap y empieza con un triplete de nucleótidos ATG que codifica una metionina. Dependiendo del parvovirus individual elegido, la cds de VP3 se traduce en aproximadamente 533 Aas. Por ejemplo, para AAV2 la cds de la principal proteína de la cubierta VP3 se puede obtener de la entrada de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) NC_001401 (nucleótidos 2809-4410) según Ruffing et al. (1994), la secuencia de AA de la entrada de NCBI correspondiente YP_680428. Aquí, una cds de VP3 codifica una proteína VP3 que es capaz de formar partículas según los métodos de la presente invención. Una proteína VP3 extendida en el extremo N comprende uno o más de los Aas respectivos de VP2. Por consiguiente, VP2 se puede observar como una VP3 extendida en el extremo N, a diferencia de una VP3 que tiene una inserción en el extremo N de una secuencia heteróloga a la misma, tal como Tag o un epítipo como se define adicionalmente más adelante.

El código genético define un mapeo entre secuencias de trinucleótidos, denominadas "codones", y Aas. Un codón triplete en una secuencia de ácidos nucleicos normalmente especifica un único AA.

Un "marco de lectura" es un conjunto contiguo y no solapante de codones de trinucleótidos en ADN o ARN. Existen 3 marcos de lectura posibles en una hebra de ARNm y seis en una molécula de ADN bicatenario debido a las dos hebras a partir de las que es posible la transcripción. Un "marco de lectura abierto" (ORF) es un marco de lectura que contiene un codón de iniciación, la región posterior que normalmente tiene una longitud que es un múltiplo de 3 nucleótidos, y termina con un codón de terminación. Un ORF podría codificar posiblemente una proteína. La

inserción de uno o dos nucleótidos da inequívocamente como resultado un desplazamiento a un marco de lectura diferente (mutación del marco de lectura). Normalmente, ATG se usa como codón de iniciación. Sin embargo, como ya se conoce de VP2 de AAV, algunas veces se usan codones de iniciación no canónicos.

5 "Mutaciones" son cambios en la secuencia de nucleótidos del material genético de un organismo. Dichas mutaciones pueden conducir a un cambio de la proteína codificada y, por tanto, pueden tener efectos variables dependiendo de donde ocurran y si alteran la estructura y/o función de la proteína codificada. Estructuralmente, las mutaciones se pueden clasificar como mutaciones puntuales, inserciones que añaden uno o más nt adicionales en el ADN/AA en la proteína o deleciones que retiran uno o más nt/AA. Una "inserción" de nt/AA es, generalmente hablando, una
 10 inserción de al menos un nt/AA heterólogo en la secuencia de - para la presente invención - una proteína de parvovirus. 'Heterólogo' en este contexto significa heterólogo en comparación con el virus del que deriva la proteína de parvovirus. Ejemplificado para una proteína estructural de parvovirus, los Aas insertados se pueden insertar simplemente entre dos Aas dados de la proteína estructural de parvovirus. Una inserción de Aas también puede ir junto con una deleción de Aas dados de la proteína estructural de parvovirus en el sitio de inserción, que conduce a una sustitución completa (por ejemplo, 10 Aas dados se sustituyen por 10 o más Aas insertados) o sustitución parcial (por ejemplo, 10 Aas dados se sustituyen por 8 Aas insertados) de Aas de la proteína estructural de parvovirus.

Además de un marco de lectura abierto que empieza con un codón de iniciación próximo a su extremo 5', se tienen que cumplir algunos requisitos de secuencia adicionales en el entorno local del codón de iniciación para iniciar la síntesis de proteínas. Uno de estos es la "secuencia de Kozak". La cantidad de proteína sintetizada a partir de un ARNm dado depende de la intensidad de la secuencia de Kozak. Para un consenso 'fuerte', con respecto al codón de iniciación de la traducción que se denomina número 1, los nucleótidos en las posiciones +4 (es decir, G en el consenso) y -3 (es decir, ya sea A o G en el consenso) deben ambos corresponder al consenso (no existe posición de número 0). Un consenso 'adecuado' solo tiene 1 de estos sitios, mientras que un consenso 'débil' no tiene ninguno. No se conserva cc en -1 y -2, pero contribuyen a la intensidad global. También hay evidencia de que una G en la posición -6 es importante en el inicio de la traducción.

El término "porcentaje de identidad" con respecto a dos secuencias, secuencias de aminoácidos particulares, indica cuántos aminoácidos o bases son idénticos en un alineamiento de dos secuencias. Para normalización, se puede usar cualquiera de la longitud de secuencia más larga, de secuencia más corta, o de columnas de alineamiento ocupadas en ambas secuencias. Normalmente, se usa software de alineamiento de secuencias para determinar el porcentaje de identidad de secuencias. Las herramientas de software comunes usadas para las tareas generales de alineamiento de secuencias incluyen, por ejemplo, ClustalW y T-coffee para el alineamiento, y BLAST y FASTA3x para la búsqueda en base de datos. El experto será capaz de seleccionar un método o software adecuado y parámetros apropiados cuando se evalúa el porcentaje de identidad.

La "molécula de ácido nucleico" puede estar en forma de ARN, tal como ARNm o ARNc, o en forma de ADN, que incluye, por ejemplo, ADNc y ADN genómico, por ejemplo, obtenido clonando o producido por técnicas de síntesis química o por una combinación de las mismas. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante, también conocida como la hebra sentido, o puede ser la hebra no codificante, también denominada la hebra antisentido.

Un "promotor independiente de rep" es un promotor que se puede activar en ausencia de la proteína Rep, mientras que en el contexto de la presente invención Rep representa la(s) proteína(s) no estructural(es) codificada(s) por un parvovirus, particularmente Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78 como se describe por Muzyczka y Berns (2001). Estos promotores incluyen, por ejemplo, promotores constitutivos heterólogos y promotores inducibles.

La "expresión génica" es el proceso por el que información heredable de un gen, tal como la secuencia de ADN, se transforma en un producto génico funcional, tal como proteína o ácido nucleico. Así, la expresión génica siempre incluye transcripción, pero no necesariamente traducción en proteína. Los genes de ARNr y ARNt son un ejemplo de genes codificantes no de proteína que se expresan en ARNr y ARNt, respectivamente, y no se traducen en proteína. Con el fin de que tenga lugar la expresión génica, un promotor tiene que estar presente preferentemente cerca del gen para proporcionar (a) sitio(s) de unión y reclutar (una) enzima(s) para empezar la transcripción.

La "desactivación" de la expresión genética significa que se bloquea la expresión de un gen. Puede ser o bien mediante modificación genética (un cambio en la secuencia de ADN que incluye mutación o deleción del codón de iniciación, al menos parte de la cds, o al menos parte de un elemento de secuencia necesario para su expresión como, por ejemplo, el promotor), o bien mediante tratamiento con un reactivo tal como un oligonucleótido corto de ADN o ARN con una secuencia complementaria ya sea para un transcrito de ARNm o un gen. Este último se puede usar preferentemente para la desactivación transitoria.

Los sitios de "poli (A)" en el extremo 3' del transcrito señalan la adición de una serie de adeninas durante la etapa de procesamiento de ARN antes de la migración al citoplasma. Estas denominadas colas de poli(A) aumentan la estabilidad del ARN.

El "fragmento Z de secuencia" o "fragmento Z" es un fragmento de ADN que comprende

- (i) al menos 44 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de VP3 y
- (ii) más de 242 nucleótidos de la cds de VP3 que empieza con el codón de iniciación, derivados de

- (a) un parvovirus, o
- (b) una secuencia de nucleótidos que es al menos 60 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 90 %, especialmente 99 % y ventajosamente 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos del fragmento Z derivado de AAV2 (secuencia 1, Fig. 2), o
- (c) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en 4x SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C con la hebra complementaria de la molécula de ADN del fragmento Z de AAV2, o
- (d) una secuencia de ácidos nucleicos que se puede usar en ensayos de trans-complementación para provocar el ensamblaje de VLPs de VP3.

Esto significa que la secuencia del fragmento Z representa al mismo tiempo parte de la cds de VP2 y de VP3, puesto que los genes de la cápside de AAV se modifican por secuencias solapadas del mismo ORF usando corte y empalme de ARNm alternativo y codones alternativos de iniciación de la traducción. Así, el gen de VP2 contiene toda la secuencia de genes de VP3 con una región 5' específica (representación esquemática en la Fig. 1).

Una "variante funcionalmente activa" del polipéptido reivindicado o un ácido nucleico es un polipéptido o un ácido nucleico que se define como en las reivindicaciones y es una variante obtenida por una o más mutaciones como se detalló en el presente documento, que es funcionalmente activa en que la variante mantiene su función biológica, por ejemplo su capacidad para promover el ensamblaje de VP3. La actividad biológica se puede determinar en ensayos de trans-complementación, donde la expresión de dicho polipéptido de dicho ácido nucleico es capaz de promover el ensamblaje de VLPs de VP3 de una construcción codificante de VP3 cuya expresión en condiciones adecuadas es insuficiente para el ensamblaje de cápside de VP3. Las construcciones codificantes de VP3 de AAV2 insuficientes adecuadas son pCMV-VP3/2809 o pCI-VP3. Se describe una prueba adecuada en los ejemplos, por ejemplo en el Ejemplo 3. Preferentemente, el mantenimiento de la función biológica se define como tener al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 70 %, 80 % o 90 %, todavía más preferentemente 95 % de la actividad de la AAP que ocurre de forma natural. Se pueden realizar ensayos de complementación como se describe en el Ejemplo 3 y o bien se analizan por ELISA (Ejemplo 1.5) o por inmunofluorescencia (1.6). Ambos ensayos se basan en la detección de partículas de virus por la unión de un anticuerpo monoclonal a la cápside viral en un estado ensamblado. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal A20 (Progen, Heidelberg, Alemania) se une a la cápside viral de AAV2 y algunos otros serotipos de AAV, para los serotipos más distantemente relacionados están comercialmente disponibles anticuerpos específicos. Si no está disponible anticuerpo específico, se pueden detectar cápsides virales por microscopía electrónica (por ejemplo, véase Hoque et al. (1999b)), o análisis en gradiente de densidad de sacarosa (Ejemplo 1.3.2.)

Las "versiones de VP3 extendidas" comprenden en general extensiones del extremo N por varios Aas. Estas extensiones del extremo N representan la parte 3' de la secuencia que codifica VP2, pero no VP3, puesto que los genes de la cápside de AAV están codificados por secuencias de solapamiento del mismo ORF usando diferentes codones de iniciación (Fig. 1). Así, la VP3 extendida en el extremo N es idéntica a la VP2 truncada en el extremo N que significa que las partes de VP2 pueden estar presentes dentro de la extensión del extremo N de VP3, pero no se expresa la proteína VP2 natural completa e intacta como, por ejemplo, se da por Ruffing et al. (1994) y accesible de NCBI (número de entrada: NC_001401). Según la presente invención, las partículas consisten esencialmente en VP3 (como se define) y, por tanto, las versiones de VP3 extendidas son muy raras, mientras que partículas que existen de forma natural comprenden VP1:VP2:VP3 en una relación de 1:1:8 (Kronenberg et al., 2001).

Para determinar la composición de las proteínas de la cápside expresadas en una muestra dada, se puede usar análisis de transferencia Western. Se puede fraccionar el lisado celular o las VLPs purificadas en un gradiente de sacarosa y las fracciones se analizan por electroforesis en gel y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, donde se pueden sondar usando ligantes específicos para la proteína diana. El anticuerpo monoclonal B1 reacciona con las tres proteínas de la cápside y se puede usar para detectar VP3, mientras que el anticuerpo monoclonal A69 reacciona solo con VP1 y VP2 y se puede usar para detectar VP2 truncada.

En el contexto de la presente divulgación, "formación eficiente de partículas" significa que se forma un alto título de partículas de aproximadamente 10^{11} , preferentemente de aproximadamente 10^{12} , y más preferentemente de aproximadamente 10^{13} partículas/ml en lisado en bruto (correspondiente a aproximadamente 10^5 , preferentemente aproximadamente 10^6 , y más preferentemente aproximadamente 10^7 partículas/ célula transfectada).

El término "aproximadamente" significa según la invención un intervalo de error general de ± 20 %, especialmente ± 10 %, en particular ± 5 %.

Los títulos de partículas de virus se pueden cuantificar a partir de lisados de células transfectadas (véase anteriormente) en su forma sin diluir o en una solución usando un kit de ELISA de valoración comercialmente disponible que se basa en la unión del anticuerpo monoclonal A20 a la cápside viral en un estado ensamblado para

medir la concentración de virus. Como ya se ha descrito anteriormente, si el anticuerpo A20 no se une a la cápside de, por ejemplo, un serotipo de virus diferente, se pueden visualizar títulos de partículas por microscopía electrónica y cuantificar por recuento (Grimm et al., 1999, Grimm y Kleinschmidt, 1999, Mittereder et al., 1996).

5 Para analizar la expresión de proteínas y estimar su cantidad, se pueden procesar para SDS-PAGE lisados celulares de porciones idénticas de células transfectadas. Tras la electroforesis en gel y la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se pueden sondar las proteínas usando ligantes específicos para la proteína diana (por ejemplo, anticuerpos monoclonales B1, A69, anti-GFP). La cantidad de traducción de proteína se puede estimar a partir de la cantidad de ligantes que se unen específicamente a la proteína. Estos complejos se pueden visualizar y cuantificar por, por ejemplo, tinción inmunohistoquímica, tinción inmunofluorescente o marcado radiactivo.

15 El término "ligante" se refiere a una molécula que se une específicamente a su componente de unión respectivo. Los ligantes comúnmente usados son anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales, derivados de anticuerpo tales como anticuerpos monocatenarios o fragmentos de anticuerpos. En principio se pueden usar todas las clases de anticuerpos, se prefieren anticuerpos IgG. Igualmente se pueden usar fragmentos o multímeros de anticuerpos. Los fragmentos comúnmente usados son anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab o (Fab)₂. Los ejemplos de otros ligantes adecuados son armazones de proteína tales como anticalinas o lipocalinas (Nygren y Skerra, 2004), receptores o partes de los mismos (por ejemplo, receptores solubles de linfocitos T), ankirina, microcuerpos o aptámeros.

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

25 Un "epítotope" es el parte de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente por anticuerpos, linfocitos B o linfocitos T.

30 Un "mimótopo" es un epítotope estructural no lineal compuesto de varios Aas derivado de diferentes regiones de la secuencia lineal de la proteína estructural localizada en estrecha proximidad debido a la estructura terciaria global de la cápside o de una estructura no de péptido tal como restos de hidrato de carbono, ácido nucleicos o lípidos, y dicho epítotope estructural no lineal se une específicamente por un anticuerpo. Así, imitando la estructura de un epítotope, el mimótopo provoca una respuesta de anticuerpos idéntica a la provocada por el epítotope. El mimótopo en el contexto de la presente invención podría consistir en (partes de) la secuencia de péptidos insertada sola o podría estar compuesto por péptido insertado y restos de AA de partículas del núcleo de parvovirus.

35 Como se usa en el presente documento, el término "epítotope de linfocitos B" pretende incluir también mimótopos. Por tanto, los epítotos pueden ser tanto lineales como estructurales.

40 El término "antígeno", en el contexto de los productos, métodos y usos de la presente invención, se refiere a cualquier antígeno diana contra el que se debe inducir una reacción inmunitaria. Dichos antígenos diana son normalmente antígenos que son susceptibles a la respuesta inmunitaria humoral. Son normalmente proteínas que pueden ser post-traduccionalmente modificados como, por ejemplo, proteínas glucosiladas.

45 El término "inmunoglobulina" (abreviadamente Ig) se refiere a cualquiera de las glucoproteínas que existen de forma natural en el suero sanguíneo que se inducen en respuesta a invasión por antígenos inmunogénicos y que protegen al hospedador erradicando los patógenos. En total, existen cinco clases de anticuerpos humanos, conocidos como IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, que pertenecen a este grupo de proteínas.

50 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, y SEQ ID NO: 22, o que codifica un polipéptido que comprende una variante funcionalmente activa de cualquiera de estas secuencias de aminoácidos, en donde la variante funcionalmente activa es capaz de promover el ensamblaje de una cápside parvoviral que consiste esencialmente en VP3 y en donde la variante funcionalmente activa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 % idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 22, en donde el ácido nucleico es incapaz de expresar cualquiera de las proteínas de Rep funcional, VP1, VP2 y VP3.

60 Como se describe, son variantes funcionalmente activas, en donde la variante funcionalmente activa

(i) tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 % idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 22, y/o

65 (ii) está codificada por un ADNc que se hibrida en 6x SSC, 5x solución de Denhardt, 0,5 % de SDS a 40 °C durante 2 a 12 horas con una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,

SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, y SEQ ID NO: 44, o con una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 44; y/o (iii) está codificada por una parte de un genoma parvoviral que comprende un marco de lectura abierto (ORF) no en marco con aquél que codifica VP1, VP2 y VP3, que incluye más de 378 nucleótidos del ORF de VP3,

en donde el ácido nucleico es incapaz de expresar cualquiera de las proteínas Rep funcionales, particularmente incapaz de expresar Rep40, Rep52, Rep68, Rep78, VP1, VP2 y VP3.

Se demostró que la co-expresión de un producto sin identificar hasta la fecha del gen cap de AAV2 promueve eficientemente el ensamblaje de VP3 en una cápside icosaédrica. Esta proteína, designada la proteína activadora del ensamblaje o AAP, está codificada por ORF2 del gen cap (en donde el primer ORF codifica VP1, VP2 y VP3) y tiene un peso molecular de aproximadamente 23 kDa. El peso molecular de AAP estimado a partir de transferencias Western era mayor (aproximadamente 30 kDa), puede ser debido a modificación (modificaciones) post-traduccionales(es). Su localización celular está en el núcleo y dirige las proteínas VP al nucléolo donde tiene lugar el ensamblaje de cápside. Sin embargo, la localización nucleolar de VP3 sola no es suficiente para la formación de cápsides, que indica que AAP proporciona un armazón adicional de tipo chaperona y/o también función de nucleación dentro del genoma de AAV de longitud completa.

Se pueden identificar polipéptidos homólogos para diferentes parvovirus. Dicho alineamiento de secuencias predichas de AAP de proteínas derivadas de ORF2 del gen cap de diferentes parvovirus se muestran en la Figura 28. Por consiguiente, el ácido nucleico según la invención se caracteriza preferentemente por que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (AAV2), SEQ ID NO: 2 (AAV1), o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (AAV5).

Se prevé por la presente invención que se pueda modificar AAP que existe de forma natural, pero sigue existiendo funcionalmente activa. Dichas variantes funcionalmente activas se pueden generar, por ejemplo, para aumentar la expresión, estabilidad y/o actividad, o para facilitar la clonación más fácil de construcciones. Por consiguiente, una variante funcionalmente activa puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos 65 %, más preferentemente al menos 70 %, más preferentemente al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, más preferentemente al menos 95 %, lo más preferentemente al menos 99 % y especialmente 100 % idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22.

También se describen variantes funcionalmente activas que están codificadas por un ADNc que se hibrida en 6x SSC, 5x solución de Denhardt, 0,5 % de SDS a 45 °C, más preferentemente a 50 °C, más preferentemente a 55 °C, más preferentemente a 60 °C, especialmente a 65 °C y ventajosamente a 68 °C con una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, y SEQ ID NO: 44, tal como una variante funcionalmente activa codificada por un ADNc que se hibrida en las condiciones especificadas anteriormente en 6x SSC, 5x solución de Denhardt, 0,5 % de SDS con la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 23, o una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 23.

En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, y SEQ ID NO: 22, o codifica un polipéptido que consiste en una variante funcionalmente activa de cualquiera de estas secuencias de aminoácidos, como se define en las reivindicaciones. La variante funcionalmente activa se define anteriormente. Más preferentemente, el ácido nucleico codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, a SEQ ID NO: 22.

Debido a experimentos de truncación del extremo N y C con AAP, se ha encontrado que con respecto al extremo 3' de AAP de AAV2, 378 nt que se solapan con el ORF de VP3 empezando en ATG₂₈₀₉ no son capaces de soportar el ensamblaje de cápside de VP3, mientras que 445 nucleótidos del ORF de VP3 son aproximadamente igual de eficientes en el rendimiento de cápsides que AAV wt. Por consiguiente, el ácido nucleico de la invención se caracteriza por que incluye más de 378 nucleótidos (tal como más de 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399 nucleótidos), preferible al menos 400 nucleótidos

(tal como al menos 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424 nucleótidos), más preferentemente al menos 425 nucleótidos (tal como al menos 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444 o 445 nucleótidos), y especialmente al menos 445 nucleótidos (tal como 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487 o 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o más nucleótidos) del ORF de VP3.

Con respecto al extremo 5' de AAP de AAV2, una AAP troncada en el extremo N codificada por un ácido nucleico con una extensión de 44 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de VP3 es aproximadamente igual de eficiente en el rendimiento de cápsides que AAV wt, si la traducción empieza por un ATG insertado en marco ORF2, y con menor eficiencia si no se inserta el codón de iniciación ATG (datos no mostrados). Una AAP troncada en el extremo N codificada por un ácido nucleico que empieza con un ATG en lugar de ACG en la posición 2858 no condujo a formación detectable de la cápside. Para AAV4 y AAV9 se mostró que una construcción de expresión de cds de VP3 que empieza en el codón de iniciación de VP3 respectivo es suficiente para el ensamblaje detectable de la cápside, codificando todavía, por tanto, AAP funcional (variante) (datos no mostrados).

Por consiguiente, el ácido nucleico de la invención se caracteriza por que incluye al menos 44 nucleótidos (tal como 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos), preferentemente al menos 20 nucleótidos (tal como 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 o 43 nucleótidos), más preferentemente al menos 5 nucleótidos (tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 nucleótidos) de los nucleótidos que codifican VP2 adyacente, que se localizan en sucesión directa de 5' del codón de iniciación de VP3.

El ácido nucleico que codifica AAP o sus variantes puede incluso empezar 3' del codón de iniciación de VP3, como se puede apreciar de AAV4 y AAV9 (anteriormente). Por tanto, en otra realización preferida, el ácido nucleico de la invención se caracteriza por que su codón de iniciación es un ATG 4 nucleótidos, preferentemente 24 nucleótidos, y más preferentemente 44 nucleótidos aguas abajo del codón de iniciación de VP3.

Por tanto, en el aspecto preferido el ácido nucleico de la divulgación comprende nucleótidos que empiezan al menos 44 nucleótidos aguas arriba y 445 nucleótidos aguas abajo del codón de iniciación de VP3 (el recuento incluye el ATG), preferentemente al menos 20 nucleótidos (tal como 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44 nucleótidos) aguas arriba y 425 nucleótidos (tal como 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444 o 445 nucleótidos) aguas abajo del codón de iniciación de VP3, y especialmente al menos 5 nucleótidos (tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 nucleótidos) aguas arriba y 400 nucleótidos (tal como 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423 o 424 nucleótidos) aguas abajo del codón de iniciación de VP3. Por consiguiente, la longitud total del ácido nucleico de la invención es al menos 489 nt (tal como 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500 o más nt), preferentemente al menos 445 nt (tal como 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487 o 488 nt), y especialmente al menos 405 nt (tal como 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443 o 444 nt).

El ácido nucleico de la invención es capaz de expresar una proteína que promueve el ensamblaje de cápside de VP3. Se puede caracterizar en que deriva de AAV2 y su codón de iniciación de la traducción (encontrado en secuencias de AAV2 natural) es C₂₇₂₉TG, A₂₇₃₅CG, A₂₇₁₇TT o T₂₇₂₀TG, o que deriva de otros parvovirus y su codón de iniciación de la traducción está en el sitio homólogo a los codones de iniciación de la traducción de AAV2. Los codones de iniciación homólogos para otros parvovirus se pueden identificar fácilmente por el alineamiento dado (véase la Fig. 27) y buscando aminoácidos codificados por posibles codones de iniciación no canónicos. Dichos posibles codones de iniciación no canónicos se pueden verificar fácilmente por análisis mutacional como se hace para AAV2 C₂₇₂₉TG en el Ejemplo 14. Para parvovirus no mostrados en la Fig. 27, dicha secuencia se puede añadir fácilmente al alineamiento dado.

En una realización preferida, la AAP que codifica ORF se muta de tal forma para generar un codón de iniciación ATG que permite la traducción mejorada del marco de lectura abierto, mientras que "mejorada" significa mayor expresión de AAP o sus variantes en comparación con la secuencia natural respectiva. Preferentemente, uno de los codones de iniciación de la traducción de AAV2 o los sitios homólogos de otros parvovirus está mutado en un codón de iniciación ATG. El inicio de la traducción con el codón de iniciación canónico ATG generalmente conduce a expresión optimizada de AAP o sus variantes y, por tanto, cuando AAP o sus variantes es inferior al óptimo, conduce a elevado rendimiento del ensamblaje de cápside. Esto llega a ser especialmente beneficioso si los sistemas de expresión se cambian a células a las que no está adaptado el virus respectivo. Se puede suponer que la expresión de AAP o sus variantes en células no hospedadoras será inferior a la óptima. Por ejemplo, se prevé fabricar cápsides en células de insecto u otras células adecuadas para infección por baculovirus, en levaduras o bacterias, donde la expresión optimizada de AAP o sus variantes puede ser altamente beneficiosa o crucial para conseguir la alta formación de cápsides.

Mientras que dicha mutación del codón de iniciación de AAP en un ATG puede reducir la formación de cápsides en una situación en *cis* (donde AAP está codificada por un ácido nucleico que se solapa con ORF1 que codifica VP3), dicha mutación es especialmente beneficiosa en una situación en *trans*, donde AAP está codificada independientemente de ORF1 que codifica VP3 (Ejemplo 14).

5 Se conoce bien en la técnica y es parte de la invención que el ácido nucleico se caracteriza por que la secuencia codificante de polipéptidos del ácido nucleico va seguida por una señal de poli(A).

10 En un aspecto de la invención, el ácido nucleico de la invención comprende un promotor que conduce la transcripción de la secuencia codificante de polipéptidos. En una realización preferida, se usa un promotor heterólogo, es decir, que no está presente en el virus del que deriva el ácido nucleico que codifica AAP o preferentemente no está presente en ningún genoma natural de parvovirus. El promotor que se puede usar en el método descrito en el presente documento no se limita a los ejemplos descritos en el presente documento. Puede ser cualquiera conocido o posteriormente descubierto. Los promotores constitutivos como, por ejemplo, el promotor temprano del citomegalovirus (CMV) (documento de patente US 4.168.062), que son continuamente transcritos, son tan útiles en la invención como los promotores inducibles, tales como un promotor específico de antibiótico o uno específico de célula. Para la expresión en sistemas de células de mamífero, se prefiere especialmente el uso del promotor del CMV, por ejemplo para su uso en procesos de fabricación usando métodos de transfección, mientras que en células de insecto se prefiere el uso del promotor de polihedrina (PoIH). Se prefieren especialmente los promotores heterólogos inducibles, ya que se pueden usar para establecer células de producción estables para VP3.

25 Debido a la alta conservación de la organización del genoma entre los parvovirus, la invención se puede transferir fácilmente a otros miembros de parvovirus. Dentro de los parvovirus, los virus preferidos, de los que deriva el ácido nucleico de la invención, son el virus adeno-asociado (AAV), parvovirus de ganso, parvovirus de pato y parvovirus de serpiente. Los AAVs preferidos se seleccionan del grupo que consiste en AAV bovino (b-AAV), AAV canino (CAAV), AAV1 de ratón, AAV caprino, AAV de rata, AAV aviar (AAAV), AAV1, AAV2, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 y AAV13, especialmente AAV2.

30 En un aspecto adicional, el ácido nucleico de la invención está comprendido en un casete de expresión, construcción, vector o línea celular. Una construcción, normalmente un plásmido, generalmente es un ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de la invención y secuencias adicionales tales como sitios de policlonación, origen de replicación, genes de marcadores de selección, etc. Un casete de expresión generalmente es una construcción que, una vez está dentro de una célula, es capaz de producir la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención por la maquinaria de transcripción y traducción celular. La construcción de expresión se manipula para contener secuencias reguladoras que actúan de regiones potenciadoras o promotoras y conducen a la transcripción eficiente del ácido nucleico de la invención. Normalmente comprende además un sitio de poli(A) que es después poliadenilado, que es importante para la exportación nuclear, traducción y estabilización del ARNm. Los vectores son construcciones que se usan para introducir el ácido nucleico de la invención en células. Dependiendo de las células a transfectar, se construyen según las habilidades convencionales del experto. Estos pueden ser plásmidos para transfección con fosfato de calcio o transfección liposomal, o vectores virales, por ejemplo baculovirus. Las líneas celulares son líneas celulares de laboratorio adecuadas para la expresión de AAP o sus variantes o la replicación de plásmidos que codifican AAP (variante).

45 Un aspecto adicional de la invención es un polipéptido codificado por un ácido nucleico según las reivindicaciones. El polipéptido que existe de forma natural subyacente se denomina proteína activadora del ensamblaje (AAP). Por consiguiente, las variantes de este polipéptido codificado por el ácido nucleico de la presente invención se denominan variantes de AAP. Por ejemplo, una variante que comprende la proteína AAP y uno o más péptidos adicionales se denominaría un polipéptido que comprende AAP. La proteína AAP se expresa a partir de ORF2 (con el codón de iniciación para VP3 definiendo el ORF1), tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 23 kDa y es capaz de proporcionar el ensamblaje de cápside de VP3 en el nucléolo. También es esencial para la formación de cápsides dentro del genoma completo de AAV. Dirige proteínas VP al nucléolo y ejerce allí una función adicional en promover la reacción de ensamblaje.

55 Un aspecto adicional de la invención es un método de producción del polipéptido de la invención, es decir, AAP o una variante de AAP, expresando un ácido nucleico según la presente invención en una célula hospedadora. Dicha producción es adecuada para promover la formación de cápsides de parvovirus, en general y específicamente de cápside que comprende proteínas VP3, pero no VP1 y VP2 y Rep. Las células hospedadoras adecuadas se pueden seleccionar por el experto según sus necesidades y preferencias. Las células hospedadoras preferidas se seleccionan de una lista que consiste en una línea celular de mamífero, especialmente una línea celular humana, una línea celular usada para infección por baculovirus, una cepa bacteriana y una cepa de levadura.

60 Un aspecto adicional de la invención es un anticuerpo o un ligante en general que se une específicamente a AAP como se define en las reivindicaciones. Particularmente, el anticuerpo se une específicamente a cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 1 a 22. Dichos anticuerpos se pueden usar para investigar adicionalmente la función de AAP o, cuando se usan como factor de trans-activación en sistemas de expresión heterólogos, para verificar y optimizar los niveles de expresión de AAP para la producción comercial de ADN de parvovirus o partículas de tipo

virus. Un anticuerpo preferido se caracteriza por que se une específicamente a AAP de AAV2 (SEQ ID NO:1). Los anticuerpos según la presente invención pueden ser policlonales o monoclonales. La invención engloba además los fragmentos correspondientes de anticuerpos como anticuerpos monocatenarios, scF_vs, fragmentos Fab, nanocuerpos o similares, o multímeros de anticuerpo.

5 Un aspecto adicional de la invención es el uso de ácido nucleico de la invención para la preparación de un polipéptido de la invención, que incluye AAP y variantes de AAP.

10 Un aspecto adicional de la invención es el uso del ácido nucleico o el polipéptido de la invención para la preparación de un parvovirus. La identificación de AAP conduce a posibilidades previamente desconocidas de fabricación de dichos virus ya que las construcciones de expresión se pueden optimizar individualmente para aumentar el rendimiento o para generar sistemas de producción inducibles usando líneas celulares productoras transfectadas estables. La expresión se puede aumentar mediante el uso de promotores heterólogos. Específicamente, se pueden preparar partículas en ausencia de secuencias codificantes funcionales de Rep y VP1 y VP2 que permite que la
15 fabricación de partículas parvovirales no comprenda ninguna de las proteínas funcionales VP1, VP2, Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78. Todos estos factores son importantes en el contexto de generación de un sistema de producción robusto, rápido y barato para dichos virus y partículas.

20 Un aspecto de la invención es un método de producción de partículas parvovirales que consiste esencialmente en VP3 como se define en las reivindicaciones, comprendiendo el método las etapas de (i) proporcionar una célula capaz de expresar VP3 de una de secuencia codificante de VP3 (cds) de un parvovirus, en donde el VP3 está bajo el control de un promotor independiente de rep y que expresa una proteína codificada por el ácido nucleico según la invención, (ii) incubar la célula en condiciones propicias para la expresión de VP3 y la proteína del ácido nucleico según la invención, produciendo así la partícula parvoviral, y (iii) opcionalmente purificar las partículas parvovirales
25 de la célula, en donde se forman al menos 10⁵ partículas de virus por célula y se expresan las proteínas no funcionales VP1, VP2 y Rep en dicha célula. Este método es igualmente aplicable usando fragmento Z en lugar del ácido nucleico según la divulgación.

30 Particularmente, se proporciona un método de producción partículas parvovirales que consiste esencialmente en VP3, comprendiendo el método las etapas de

i. expresar VP3 de una secuencia codificante de VP3 (cds) de un parvovirus bajo el control de un promotor independiente de rep en una célula,

35 ii. expresar un fragmento de secuencia de ADN (fragmento Z) en la célula bajo el control de un promotor independiente de rep, que comprende

(1) al menos 44 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de VP3 y

(2) más de 242 nucleótidos de la cds de VP3 que empieza con el codón de iniciación derivado de

40 a) un parvovirus, o
b) una secuencia de nucleótidos que es al menos 60 %, preferentemente 80 %, más preferentemente 90 %, especialmente 99 % y ventajosamente 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos del fragmento Z derivada de AAV2 (secuencia 1, Fig. 2), o

45 c) una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en 4x SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C con la hebra complementaria de la molécula de ADN del fragmento Z de AAV2 (secuencia 2), o

d) una secuencia de ácidos nucleicos que se puede usar en ensayos de trans-complementación para provocar el ensamblaje de VLPs de VP3.

50 iii. incubar la célula en condiciones adecuadas para la expresión de VP3, y

iv. purificar las partículas parvovirales de la célula,

55 en donde se forman aproximadamente 10⁵, preferentemente aproximadamente 10⁶, y más preferentemente aproximadamente 10⁷ partículas de virus por célula y esencialmente no se expresan proteínas VP1, VP2 y Rep (particularmente Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78).

60 Estos métodos se basan en la generación de partículas a partir de un virus de la familia de Parvoviridae en donde el natural expresa VP1, VP2 y VP3 como proteínas de la cápside. Las partículas parvovirales que consisten esencialmente en VP3 se pueden generar expresando la cds de VP3 parvoviral esencialmente en ausencia de expresión de proteínas funcionales VP1, VP2 y Rep, particularmente Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78. Como resultado, la partícula parvoviral purificada consiste esencialmente en solo una proteína de la cápside. Se evita completamente la encapsidación de ADN mediada por Rep debido a la ausencia de Rep en la partícula. La invención permite la producción de altos títulos de partículas parvovirales que consisten esencialmente en VP3 que son, entre otras cosas, adecuadas para el desarrollo de vacunas.

65 Se conoce bien en la técnica que VP3 sola no es capaz de ensamblarse en cápsides. En el contexto de la presente

divulgación, se identificó que un ácido nucleico que codifica un novedoso polipéptido designado AAP, respectivamente un elemento Z de secuencia (fragmento Z), si se expresa en la célula, media en el ensamblaje de partículas de VP3 y que VP3 no necesita proteínas virales adicionales para el ensamblaje de cápside.

5 Varias líneas de evidencia condujeron a la conclusión de que VP3 requiere ARN derivado del gen cap para el ensamblaje de cápside. Este factor requerido para el ensamblaje de cápside de VP3 se podría proporcionar en *trans* en un fragmento del gen cap fusionado con gfp (VP2N-gfp). No fue necesaria la expresión de proteínas del primer ORF de este fragmento de gen cap (ORF que codifica VP1, VP2 y VP3), ya que varias construcciones que contienen codones de terminación en la región relevante del gen cap también proporcionaron función auxiliar. No se pudo
10 detectar la expresión de VP2N-gfp de los transcritos de ultralectura por análisis de transferencia Western. Es muy poco probable dicha expresión de proteínas, iniciada en sitios de inicio de la traducción no convencionales y seguidos por un codón de terminación, y su cantidad sería muy baja. Dicha expresión de proteínas VP2N-gfp tampoco es suficiente para estimular el ensamblaje de cápside de VP3. Esto se ha mostrado claramente por expresión de esta proteína usando codones alternativos que produjeron altos niveles de proteína VP2N-gfp, pero no
15 en el ensamblaje de cápside de VP3. Debido a que dicho cambio de los codones implica un cambio de la secuencia de nucleótidos, es evidente que la secuencia de nucleótidos correcta es necesaria para el efecto auxiliar del ensamblaje y no la proteína expresada del primer ORF. Finalmente, el proporcionar la secuencia de nucleótidos correcta por un plásmido que no se podría transcribir en el primer ORF tampoco resultó en el ensamblaje de cápside, que argumenta que es necesaria la transcripción de la secuencia de nucleótidos correcta.

20 Como se muestra en la Fig. 2, el fragmento Z comprende al menos 44 nucleótidos aguas arriba y más de 242 nucleótidos aguas abajo del codón de iniciación de VP3. Preferentemente, el fragmento Z no comprende una cds de VP3 de longitud completa. La secuencia de fragmento Z puede derivar de uno de varios parvovirus diferentes como se enumera en Fig. 2, donde se dan algunos ejemplos para la secuencia de nucleótidos de la región respectiva para el fragmento Z de parvovirus AAV1, AAV2, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV10, AAV11 y b-AAV. Este listado no se limita a los parvovirus mostrados aquí. Una secuencia adicional se puede alinear fácilmente mediante su posición del codón de iniciación de VP3 y seleccionar como fragmento Z. Una secuencia de nucleótidos también se puede seleccionar como fragmento Z por su identidad con la secuencia de nucleótidos del fragmento Z derivada de AAV2 (SEQ ID NO: 45, véase más adelante) que es al menos 60 %, preferentemente 80 %, más preferentemente
25 90 %, especialmente 99 % y ventajosamente 100 %. Además, una secuencia de nucleótidos que se hibrida en 4x SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C con la hebra complementaria de la Z molécula de ADN del fragmento de AAV2 (SEQ ID NO: 46, véase más adelante) también se puede usar en ensayos de trans-complementación como el fragmento Z para provocar el ensamblaje de VLPs de VP3. Se prefiere especialmente que el fragmento Z derive de AAV2 y comprenda SEQ ID NO: 45.

35 Secuencia de nucleótidos del fragmento Z de la secuencia de ADN derivado de AAV2 (SEQ ID NO: 45, como también se da en la Fig. 2):

```

1  tgggacagcc accagcagcc ccctctggtc tgggaactaa tacgatggct
51  acaggcagtg ggcaccaat ggcagacaat aacgagggcg ccgacggagt
101 gggtaattcc tgggaaatt ggcattgcca ttccacatgg atgggcgaca
151 gagtcacac caccagcacc cgaacctggg ccctgccacc ctacaacaac
201 cacctctaca acaaatctc cagccaatca ggagcctcga acgacaatca
251 ctactttggc tacagcacc cttgggggta ttttgac

```

40 Secuencia inversa y complementaria de SEQ ID NO: 45, que se puede usar en experimentos de hibridación para identificar un fragmento de ADN desconocido como el fragmento Z (SEQ ID NO: 46):

```

1  gtcaaaatac cccaagggg tgctgtagcc aaagtagtga ttgtcgttcg
51  aggcctcctga ttggctggaa atttgtttgt agaggtggtt gttgtaggtg
101 ggcagggccc aggttcgggt gctgggtggtg atgactctgt cgcctatcca
151 tgtggaatcg caatgccaat ttccogagga attaccact ccgtcggcgc
201 cctcgttatt gtctgcaatt ggtgcgccac tgccctgtagc catcgatta
251 gtcccagac cagagggggc tgctggtggc tgtcoga

```

45 Para el inicio de la transcripción de la cds de VP3 y la secuencia del fragmento Z o del ácido nucleico de la divulgación se elige/n uno o dos "Promotor(es) independiente(s) de rep". Se usa un promotor independiente de rep para expresar VP3 y el fragmento Z en ausencia del factor parvoviral Rep que se va a evitar ya que Rep es responsable de la encapsidación de genomas de virus y ADN inespecífico en partículas parvovirales. A efectos de la presente divulgación, se debe evitar la encapsidación de ADN viral o inespecífico ya que las partículas parvovirales podrían entonces actuar involuntariamente de vectores de terapia génica. Usando un "Promotor independiente de rep" para la expresión de VP3 y la transcripción del fragmento Z o el ácido nucleico de la divulgación, la ARN
50

polimerasa puede iniciar la transcripción en ausencia de expresión de proteínas Rep que permite la fabricación de cápsides en ausencia de proteínas Rep, particularmente Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78. Los promotores independientes de Rep son, por ejemplo, promotores constitutivos o inducibles heterólogos.

5 Por consiguiente, el ácido nucleico de la invención puede comprender un promotor que conduce la transcripción de la secuencia codificante de polipéptidos. Preferentemente, se usa un promotor heterólogo, que no está presente en ningún genoma natural de parvovirus. El promotor que se puede usar en el método descrito en el presente documento no se limita a los ejemplos descritos en el presente documento. Puede ser cualquiera conocido o posteriormente descubierto. Los promotores constitutivos como, por ejemplo, el promotor temprano del citomegalovirus (CMV) (documento de patente US 4.168.062), que se transcriben continuamente, son tan útiles como los promotores inducibles tales como un promotor específico de antibiótico o uno específico de célula. Para la expresión en sistemas de células de mamífero, se prefiere especialmente el uso del promotor del CMV, por ejemplo para su uso en procesos de fabricación usando métodos de transfección, mientras que en células de insecto se prefiere el uso del promotor de polihedrina (PoIH). Se prefieren especialmente los promotores heterólogos inducibles, ya que se pueden usar para establecer células de producción estables para VP3.

20 Se conocen bien en la técnica las condiciones adecuadas para la expresión de VP y se pueden transferir en principio a la expresión de VP3 solo. Para producir parvovirus o específicamente partículas parvovirales, las secuencias de ADN respectivas se tienen que transfectar en células. Se describe un protocolo dentro de los ejemplos. Sin embargo, en su lugar se pueden usar diferentes métodos de transfección, diferentes células o células establemente transfectadas. Se describen diferentes métodos de producción, por ejemplo, por Grimm et al. (2002) y Grieger y Samulski (2005).

25 Los métodos de la presente invención conducen a rendimiento altos de partículas de parvovirus, en se forman donde 10^5 , preferentemente aproximadamente 10^6 , y más preferentemente aproximadamente 10^7 partículas de virus por célula transfectada. Estos números corresponden a aproximadamente 10^{11} , preferentemente aproximadamente 10^{12} , y más preferentemente aproximadamente 10^{13} partículas/ml de lisado en bruto. El uso comercial de partículas de VP3 requiere un método de producción eficiente que proporciona altos rendimiento de partículas.

30 Las partículas se pueden purificar por los métodos desvelados en el presente documento y el estado de la técnica.

35 Se prefiere especialmente que la secuencia de fragmento Z o el ácido nucleico según la invención y la cds de VP3 están dispuestas y se expresan de tal forma que se produzcan partículas parvovirales que consisten solo en VP3. "Que consisten solo" en este contexto significa que no se pueden detectar otras moléculas proteináceas como parte de las partículas por métodos comunes tales como transferencia Western. Dichas partículas pueden comprender otras moléculas o sales tales como agua y otros constituyentes de tampones. Además, la partícula puede comprender moléculas que se encapsulan por casualidad durante el ensamblaje de la partícula dentro de la célula.

40 Según un aspecto, la secuencia de fragmento Z o el ácido nucleico según la invención no se solapa con la cds de VP3 conduciendo a partículas parvovirales que consisten solo en VP3. Esto evita la expresión de un número subestequiométrico de proteínas VP3 extendidas en el extremo N presentes en las partículas (véase el Ejemplo 4). Dicho pequeño número de proteínas VP3 extendidas en el extremo N lo más probablemente no afectaría la actividad o rendimiento de las partículas. Sin embargo, en aspectos normativos de medicamentos es ventajoso tener un producto de una proteína.

45 Por consiguiente, se prefiere esencialmente que las partículas parvovirales según la presente invención se ensamblen solo de VP3. Para este fin, se desactiva la expresión de VP1, VP2 y Rep, particularmente Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78, en la célula por un método bien conocido por el experto, como, por ejemplo, delección o mutación del codón de iniciación respectivo, delección (completa o en parte) de la cds específica para la proteína, o mutación de la cds específica para la proteína, evitando la expresión de un producto génico funcional (los ejemplos se describen, por ejemplo, en Warrington et al. (2004)).

50 Parece que la selección del sitio de iniciación traduccional en la mayoría de los ARNms de eucariota ocurre mediante un mecanismo de barrido que predice que la proximidad al extremo 5' desempeña una función dominante en la identificación del codón de iniciación. Este "efecto de posición" provoca que el primer codón de iniciación ATG (más aguas arriba) de un transcrito inicie la traducción (Kozak, 2002).

60 Con referencia a la expresión de proteínas de la cápside de parvovirus/AAV, esto significa que el transcrito cortado y empalmado secundario explica principalmente la síntesis de VP1 del primer ATG, mientras que traducción de VP3 se inicia principalmente a partir de su codón de iniciación ATG que es el ATG más aguas arriba de un transcrito cortado y empalmado principal. Este ARN cortado y empalmado principal también codifica el codón de iniciación ACG poco usual de VP2 aguas arriba del sitio de inicio de VP3. Por tanto, además de VP3 que se sintetiza eficazmente a partir del transcrito cortado y empalmado principal, VP2 se expresa hasta un cierto grado (Becerra et al., 1988, Becerra et al., 1985).

65 En general, el efecto de la posición es evidente también en casos en los que una mutación inactiva o retira el sitio de

inicio normal y desplace la traducción a un sitio de inicio aguas abajo. Así, se puede activar un codón ATG interno silencioso y se incrementa la eficiencia traduccional, un problema bien conocido en algunos estados de enfermedad (Kozak, 2002).

5 Teniendo en cuenta este conocimiento, la mutagénesis de los codones de iniciación de VP1 y VP2 para inactivar su expresión puede activar la traducción de proteínas truncadas empezando en los sitios aguas abajo que son silenciosos en el tipo natural (como se describe por Warrington et al. (2004), y se observa en el Ejemplo 2.2.).

10 Por tanto, además de los principales codones de iniciación conocidos para proteínas de la cápside, dichos codones de iniciación alternativos se delecionan o mutan preferentemente para garantizar que VP3 sea la única proteína de la cápside a expresar. Se pueden controlar la expresión de VP3 solo y la desactivación de cualquier otra proteína de la cápside mediante transferencia Western como se describe.

15 En una realización preferida adicional, secuencias codificantes para VP1 y VP2, que no codifican secuencias de VP3, se delecionan completamente del casete de expresión que codifica VP3. En dicho caso, el fragmento Z o el ácido nucleico de la invención se proporciona en *trans* para permitir la producción de cápsides de VP3.

20 En un aspecto preferido de la divulgación, la secuencia de ADN del fragmento Z o el ácido nucleico según la invención va seguido por una señal de poli(A). La señal de poli(A) es capaz de reclutar la maquinaria de poliadenilación para añadir una extensión de adeninas (la cola de poli(A)) sobre la molécula de ARN una vez ha terminado la transcripción de un gen. Esta etapa de procesamiento aumenta la estabilidad del factor transcrito del fragmento Z dentro de la célula. Se conocen bien en la técnica las señales de poli(A) tales como poli(A) del antígeno T grande de SV40 y se usan regularmente en todos los tipos de casetes de expresión y construcciones.

25 Los análisis de los presentes inventores de una serie de mutantes de delección que empezaron la expresión en diferentes sitios 5' del codón de iniciación de VP3 mostraron que el mutante pCMV-VP3/2765 es todavía capaz de provocar el ensamblaje de cápside (Ejemplo 2.). Por tanto, como ya se ha descrito anteriormente, el fragmento Z tiene que comprender al menos 44 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de VP3. Puesto que la eficiencia de formación de partículas aumentó usando un fragmento Z extendido en 5' por algunos nucleótidos, se prefiere que el fragmento Z comprenda al menos 113 nucleótidos o especialmente al menos 198 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de VP3, respectivamente. En los experimentos de los presentes inventores, han elegido una construcción que proporciona un fragmento Z de AAV2 que empieza en el nucleótido 2696 (correspondiente a 113 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de VP3). En Fig. 2, las secuencias de los diferentes serotipos se enumeran con respecto al codón de iniciación de VP3 que está subrayado. Las secuencias se pueden extender fácilmente en la dirección 5' o 3' según las secuencias de nucleótidos dadas en las entradas de NCBI respectivas (véanse las leyendas de la Fig. 2).

35 Si la secuencia extendida en 5' del fragmento Z comprende el codón de iniciación de la traducción de VP1 y/o VP2 o cualquier otro codón de iniciación ATG en ORF1, ORF2 u ORF3, se tienen que inactivar por mutación o delección para expresar VP3 como la única proteína de la cápside.

40 Además, el fragmento Z tiene que comprender más de 242 nucleótidos aguas abajo del codón de iniciación de VP3. Se prefiere que el fragmento Z comprenda más de aproximadamente 275 nucleótidos, más de aproximadamente 300 nucleótidos, más de aproximadamente 325 nucleótidos, más de aproximadamente 350 nucleótidos, más de aproximadamente 375 nucleótidos, más de aproximadamente 400 nucleótidos, más de aproximadamente 425 nucleótidos, y lo más preferentemente más de aproximadamente 445 nucleótidos de la cds de VP3 que empieza con el codón de iniciación. Un fragmento Z especialmente preferido para en aproximadamente el nucleótido 3254 (correspondiente a aproximadamente 445 nucleótidos aguas abajo del codón de iniciación de VP3).

45 La molécula activa codificada por el fragmento Z es lo más probablemente una molécula difusible, es decir, una proteína designada AAP. Basándose en el código genético degenerado, los presentes inventores optimizaron la secuencia del fragmento Z para conseguir posiblemente mayor expresión de una supuesta proteína difusible posiblemente codificada dentro de Z en el primer marco de lectura (ORF1) que también codifica las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, dejando así la secuencia de AA de proteínas codificadas en ORF1 sin cambiar, pero alterando la secuencia de proteínas codificada por otros ORFs modificando la secuencia de ADN. Este fragmento optimizado en codones, sin embargo, podría no mediar en la formación de partículas ya que ya no se podrían detectar partículas de virus (Ejemplo 5, Fig. 6). Por otra parte, la inserción de codones de terminación en ORF1 dentro del fragmento Z, que conduce a la desactivación de la síntesis de proteínas de ORF1, pero que conduce solo a cambios secundarios en la secuencia de ADN de ORF1 y que no altera la síntesis de proteínas de ORF2, todavía permitió la eficiente formación de partículas (Ejemplo 6, Fig. 8).

50 Se prefiere esencialmente que la mutación del fragmento Z comprenda al menos un codón de terminación para la traducción de proteínas en el primer o tercer marco de lectura. Como consecuencia, no se puede traducir proteína con una longitud de 18 AA o superior a partir de estos marcos de lectura del fragmento Z, en particular no se puede generar ninguna proteína de VP2 o parte de ella. Por tanto, es una ventaja importante que no se incluya VP2 o parte de ella en las partículas.

Como un aspecto preferido de la presente divulgación, el principal codón de iniciación de la traducción ATG (AA 203, numeración según VP1 de AAV2, (Girod et al., 1999)) de VP3 dentro del fragmento Z o el ácido nucleico de la divulgación está mutado. Se prefiere además que también se muten uno o ambos de los codones de iniciación secundarios alternativos de VP3 (AA 211 y AA 235, (Warrington et al., 2004)). En un aspecto más preferido, se mutan todos los codones ATG que se pueden usar para el inicio de la traducción de VP3 (varios de los posibles se enumeran en Warrington *et al.*, 2004) para evitar completamente la traducción de VP3 a partir de la construcción de expresión que proporciona el fragmento Z.

Puesto que se caracterizó que el producto del fragmento Z y la función codificada del ácido nucleico de la invención era un elemento trans-actuante, que significa que el fragmento Z y el ácido nucleico de la invención codifican una molécula difusible, la secuencia del fragmento Z o el ácido nucleico de la invención se pueden proporcionar en la misma molécula de ácido nucleico o una diferente a la célula como el gen cap o parte del mismo, por ejemplo una cds de VP3.

En una realización preferida, el ácido nucleico de la invención se proporciona "*en cis*" con respecto a la cds de VP3. Si el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención se proporciona "*en cis*" con respecto a un casete de expresión que codifica VP3, significa que la expresión del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención y VP3 son conducidos por el *mismo* promotor. La secuencia del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención se pueden localizar aguas arriba o aguas abajo de la cds de VP3. Las secuencias que codifican el fragmento Z y VP3 se pueden unir directamente o separar por un número variable de nucleótidos (Fig. 3.1.).

En una realización más específica de la presente invención, el ácido nucleico de la invención se localiza directamente aguas arriba de la cds de VP3. Puesto que el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención comprende más de 242 nucleótidos aguas abajo del codón de iniciación de VP3 y esta secuencia no tiene que estar presente por duplicado, la cds de VP3 directamente siguiente solo tiene que proporcionar la secuencia restante de ADN del ORF de VP3 (se da un esquema en la Fig. 3.1.a)). En este caso, se expresan cantidades subestequiométricas de VP3 extendida en el extremo N y se presentan en la cápside (Ejemplo 4). Con el fin de no aumentar esta parte de VP3 extendida en el extremo N, es una realización importante de la presente invención no añadir nuevo(s) codón (codones) de iniciación o delecionar los existentes, respectivamente, en el extremo 5' o aguas arriba del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención.

Además, solo se puede mutar fácilmente la cds específica de VP3 que no se solapa con el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención. La mutación de la cds de VP3 que se solapa con el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención también cambia posiblemente la secuencia de la molécula difusible codificada por el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención. Como resultado, en algunos casos la molécula difusible ya no será activa. Las mutaciones en este contexto incluyen mutaciones silenciosas, así como, por ejemplo, la inserción de epítopes. Para aumentar las posibilidades de mutar la cds de VP3, es beneficioso minimizar el solapamiento, es decir, separar el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención y la cds de VP3. Esto se puede hacer en una situación en *cis* donde un promotor conduce la expresión de una cds de VP3 que no contiene los 44 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación de VP3 esencial para el fragmento Z, y de un sitio de fragmento Z separado antes de dicha cds de VP3 o después.

Se prefiere esencialmente que el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención se proporcione "*en trans*" con respecto a la cds de VP3. Si el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención se proporciona "*en trans*" con respecto a un casete de expresión que codifica VP3, significa que la expresión del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención y VP3 son conducidas por promotores *separados* (a diferencia de "*en cis*", véase antes). La secuencia del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención se puede localizar aguas arriba o aguas abajo de la cds de VP3 en la misma construcción, o en una construcción de expresión diferente de la cds de VP3 (los ejemplos se enumeran en la Fig. 3.2.).

En este caso, el fragmento Z comprende solo el extremo 5' de la cds de VP3 y, por tanto, es una ventaja importante que no se pueda expresar VP3 extendida en el extremo N (véase más adelante) e incorporar en la cápside. Por tanto, si la secuencia que codifica VP3 y el fragmento Z se proporcionan en *trans*, se supone que se puede obtener una composición de partículas más pura, que consiste preferentemente solo en la proteína estructural VP3.

Es una ventaja de la configuración en *trans* que la cds de VP3 se pueda modificar fácilmente, por ejemplo, para optimizar su uso de codones para la expresión de la línea celular para aumentar adicionalmente el rendimiento sin cambiar la secuencia del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención. También se pueden hacer otras modificaciones tales como mutaciones, inserciones, marcas, etc., sin afectar el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención. Se puede suponer que durante intentos previos por identificar sitios de inserción dentro de VP3 en secuencias solapantes del fragmento Z y la cds de VP3, no se identificaron sitios de inserción posiblemente útiles como una inserción, sino que interfirieron con la expresión del fragmento Z o con la función de AAP. Por consiguiente, la separación funcional de estas secuencias ya sea en un escenario en *cis* sin solapamiento o preferentemente en un escenario en *trans* permite la mutagénesis independiente de la secuencia codificante de VP3. Dicha mutagénesis tiene múltiples aplicaciones comerciales. En el contexto de la generación de novedosos vectores de terapia génica, se pueden vencer las limitaciones de la generación de secuencias de Cap quiméricas de parvovirus. Varios grupos han intentado la evolución directa de AAV que implica la generación de bibliotecas virales

mutagenizadas al azar en un serotipo (Koerber et al., 2008), usando STEP y métodos de barajado para crear múltiples especies de cápside aleatoriamente recombinadas usando secuencias de la cápside de serotipo de AAV conocido (Ward y Walsh, 2009, Li et al., 2008). De un modo similar, se puede usar expresión independiente de AAP para identificar sitios de inserción adicionales que toleran ligandos (que se van a usar para el direccionamiento a otras células), epítopes de linfocitos B (que se van a usar para generar vacunas específicas de epítopo), o delecciones/sustituciones (que se van a usar para el desdiseño del virus o para reducir la antigenicidad del virus).

Una ventaja adicional de la configuración en *trans* del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención y la cds de VP3 es que una construcción se puede transfectar establemente en una línea celular productora, mientras que la otra construcción se puede transfectar/transducir transitoriamente. Por ejemplo, un casete de expresión que comprende fragmento Z/el ácido nucleico de la invención se puede transfectar establemente en una línea celular adecuada para la eficiente expresión de VP3 generando una única línea celular de producción. Entonces, dicha línea celular de producción se puede transfectar/transducir transitoriamente (por ejemplo, infectar con un virus) con una cds de VP3 específica que conduce a la expresión de dicha VP3 y respectiva formación de partículas. Por consiguiente, se puede usar una línea celular de producción para la producción de diferentes partículas. Dado el tiempo y el coste que se necesita para la certificación de las líneas celulares de producción que se usan para la fabricación de medicamentos, esto constituye una ventaja reguladora considerable. Por este motivo, se prefiere esencialmente que el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención y la cds de VP3 se proporcionen en construcciones de expresión separadas.

Esta configuración se puede usar adicionalmente, por ejemplo, para generar AAV/partículas de parvovirus de un serotipo distinto proporcionando un casete de expresión que codifica VP3 de un serotipo específico en *trans* a las células que se han transfectado establemente con el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención de un serotipo. En general, se puede usar una cds de VP3 específica para un serotipo de AAV seleccionado del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 y AAV13 para la transfección de células que se han transfectado establemente con el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención de solo un serotipo, por ejemplo, AAV2. Así, se pueden generar fácilmente partículas de AAV que consisten en VP3 de un serotipo seleccionado, por ejemplo las partículas de AAV1. Para AAV1 y AAV2, los presentes inventores podrían confirmar que la expresión del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención media en el ensamblaje de cápside de VP3 no solo expresada de construcciones clonadas del mismo serotipo, sino también expresada de construcciones clonadas del otro serotipo, concretamente AAV2 y AAV1, respectivamente (Ejemplo 21). Sin embargo, no se puede esperar generalmente que cada serotipo se complemente entre sí, pero un experto en la técnica puede identificar fácilmente los pares respectivos de AAP de un parvovirus/serotipo y VP3 de uno diferente para conseguir el ensamblaje de VLPs de VP3 en ensayos de trans-complementación como se describe en el presente documento. Se puede usar complementación cruzada, por ejemplo, si se ha obtenido una línea celular estable que expresa un AAP específica que se puede usar para la producción de VLPs de VP3 de diferentes parvovirus o serotipos de AAV. Se pueden elegir combinaciones respectivas para la producción eficaz de VLP en términos de tiempo y coste.

Igual de bien es posible lo contrario y una cds de VP3 específica se puede transfectar en *trans* con un casete de expresión que proporciona el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención elegido de varias secuencias diferentes que codifican el fragmento Z, por ejemplo, de diferentes serotipos de AAV/parvovirus.

En otra realización preferida de la invención, la partícula parvoviral no contiene proteína Rep, particularmente ninguna proteína funcional Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78. Para detalles sobre esta realización, se dan en el presente documento en toda la descripción.

En otra realización preferida de la invención, solo/como máximo 1/50 de la proteína estructural expresada, preferentemente como máximo 1/100, más preferentemente como máximo 1/250 y esencialmente solo/como máximo 1/500 de las proteínas estructurales son versiones extendidas del extremo N de VP3. Se prefieren especialmente partículas de parvovirus que no contienen ninguna proteína estructural con versiones extendidas del extremo N de VP3 o, viceversa, ninguna de las proteínas estructurales son versiones extendidas del extremo N de VP3. Si las secuencias de fragmento Z y cds de VP3 se solapan y se expresan bajo el control del mismo promotor (situación *cis*), el codón de iniciación ATG de la cds de VP3 se usa principalmente como inicio para la traducción de proteínas, mientras que solo una porción muy pequeña de traducción de proteínas empieza aguas arriba. La pequeña parte resultante de proteínas contiene, además de la cds de VP3, una extensión del extremo N por varios Aas correspondientes a la parte 3' de la secuencia que codifica VP2, pero no VP3. Tomados conjuntamente, la expresión de estas versiones extendidas en 5' de VP3 fue visible en transferencias Western (Ejemplo 4) pero solo representó 1/50 de las proteínas estructurales, preferentemente 1/100, más preferentemente 1/250 y esencialmente solo 1/500 de las proteínas estructurales de la partícula de parvovirus.

En otro aspecto preferido de la divulgación, solo/como máximo 1/50 de la proteína estructural expresada, preferentemente como máximo 1/100, más preferentemente como máximo 1/250 y esencialmente solo/como máximo 1/500 de las proteínas estructurales, es un polipéptido según la invención, es decir, AAP o sus variantes. Aunque no se ha mostrado influencia específica de AAP sobre células hospedadoras que podrían tener un impacto

sobre las aplicaciones médicas de vectores o partículas de parvovirus, es en principio beneficioso tener tan pocas impurezas como sea posible.

Las proteínas Rep virales se unen a ADN genómico y viral y se habla de que desempeñan una función en la encapsidación de ADN. Para usar AAV como vacuna y evitar reacciones inespecíficas contra el ADN encapsidado o una transferencia génica no deseada, son especialmente preferidas las partículas parvovirales tan libres de ADN como sea posible. Por tanto, se producen partículas parvovirales en ausencia de expresión de proteínas Rep en la célula. Preferentemente, solo 1/100 de las partículas, preferentemente 1/1.000 y más preferentemente solo 1/10.000 de las partículas contiene ADN. Se prefiere especialmente que ninguna de las partículas de parvovirus contenga ADN. Preferentemente, como máximo 1/100, más preferentemente solo/como máximo 1/1.000, incluso más preferentemente solo/como máximo 1/10.000 de las partículas contienen algún ADN. Como resultado, no es necesaria etapa de inactivación para destruir el ADN encapsidado (por ejemplo, irradiación gamma o UV) antes de los fines de vacunación.

Los parvovirus para su uso según la presente invención se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en virus adeno-asociado (AAV), AAV bovino (b-AAV), AAV canino (CAAV) y AAV aviar (AAAV).

Se prefieren especialmente AAVs seleccionados del grupo que consiste en AAV-1, AAV-2, AAV-3b, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12 y AAV13, especialmente AAV-2. AAV1 a AAV12 especifican serotipos definidos de virus adeno-asociado (AAV). Como se describe en el presente documento con más detalle, se prefiere esencialmente que la cds de VP3 comprenda además al menos una mutación. La mutación se selecciona preferentemente, en comparación con la secuencia parvoviral natural respectiva, del grupo que consiste en una o más deleciones, una o más inserciones, una o más sustituciones, y una combinación de estas mutaciones.

La cds de VP3 puede comprender una o más mutaciones silenciosas. Es posible la introducción de mutaciones de ADN que no dan como resultado un cambio a la secuencia de AA de la proteína VP3 para optimizar el uso de codones de la cds de VP3, por ejemplo, para potenciar su expresión. Debido a la degeneración del código genético, un AA se puede especificar entonces por más de un codón, por ejemplo el ácido glutámico de AA se especifica por codones GAA y GAG. Por consiguiente, para cada AA de la proteína estructural VP3 se seleccionarían los codones que son traducidos con mayor eficiencia y mutarían la cds respectivamente. Como ya se ha tratado, estas mutaciones no cambian la secuencia de AA de la proteína, que es por lo que se denominan silenciosas, pero por supuesto cambian la secuencia de nucleótidos que incluye la molécula difusible codificada por el fragmento Z/el ácido nucleico de la invención. Por este motivo se prefiere especialmente que solo la parte de la cds de VP3 se modifique por inserción u optimización de uso de codones, por ejemplo, para conseguir mayor expresión de VP3 en la configuración elegida que no solapa con la secuencia del fragmento Z, o en una situación *trans* como se ha descrito anteriormente en cualquier otra parte dentro de la cds de VP3.

La una o más mutaciones de la cds de VP3 pueden conducir a una o más mutaciones situadas sobre la superficie de una VLP de VP3. Las regiones localizadas en la superficie de la proteína estructural se pueden determinar analizando la estructura cristalina, que se conoce como AAV2 (Xie et al., 2002). Si la estructura cristalina no está todavía disponible para el serotipo elegido, la secuencia de VP3 elegida se puede alinear con la secuencia de VP3 de al menos un serotipo diferente con una estructura cristalina ya conocida para identificar regiones homólogas de interés. El alineamiento se puede hacer usando un software comercialmente disponible como, por ejemplo, Multialign (Corpet, 1988) y los parámetros estándar descritos allí.

La una o más mutaciones de la cds de VP3 puede conducir a una o más mutaciones situadas en el extremo N de VP3. Preferentemente, el extremo N se define como los 10 aminoácidos del extremo N, preferentemente los 5 aminoácidos del extremo N, especialmente los 2 aminoácidos del extremo N de la VP3 respectiva. Se prefiere especialmente una inserción en o correspondiente a una inserción directamente en el extremo N o C, preferentemente directamente en el extremo C de AA 203 (I-203).

La(s) inserción (inserciones) se pueden insertar en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-453, I-459, I-471, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713 y I-716, preferentemente I-261, I-453, I-534, I-570, I-573 y I-587, especialmente I-587.

La nomenclatura usada I-### se refiere al sitio de inserción, mencionando ### el número de AA con respecto a la proteína VP1 de AAV-2, que significa sin embargo que la inserción se puede localizar directamente en el extremo N o C, preferentemente directamente en el extremo C de un AA en la secuencia de 5 Aas en el extremo N o C del AA dado, preferentemente 3, más preferentemente 2, especialmente 1 AA(s) del extremo N o C del AA dado. Para parvovirus distintos de AAV-2, los sitios de inserción correspondientes se pueden identificar realizando un alineamiento de AA o por comparación de las estructuras de la cápside, si están disponibles. Dicho alineamiento se ha realizado para los parvovirus AAV-1, AAV-2, AAV-3b, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-10, AAV-11, b-AAV, GPV, B19, MVM, FPV y CPV (Figura 3 del documento de patente WO 2008/145400).

Está subrayada la posición de AA después de la cual se introdujo la inserción y que nombró el sitio. También es

ES 2 742 180 T3

posible asimismo introducir una inserción en los cinco Aas directamente adyacentes localizados a continuación de los AA subrayados, debido a que estos están asimismo localizados dentro de un bucle en la cápside de AAV2.

5 Por ejemplo, el sitio de inserción I-587 corresponde a una inserción antes y/o después de uno de los siguientes Aas indicados para énfasis:

10 FQSSS TDPAT de AAV1,
 LQRGN₅₈₇ RQAAT de AAV2,
 LQSSN TAPTT de AAV-3b,
 LQSSS TDPAT de AAV-6,
 LQAAAN TAAQT de AAV-7,
 LQQQN TAPQI de AAV-8,
 LQQAN TGPIV de AAV10,
 15 NQNAI TAPIT de AAV11 y
 NQSSI TAPAT de AAV-5.

Además, el sitio de inserción I-453 corresponde a una inserción directamente en el extremo N o C de los diez siguientes Aas, preferentemente directamente en el extremo C de los AA indicados para énfasis

20 QNQSG SAQNK de AAV-1,
 NTPSG₄₅₃ TTTQS de AAV-2,
 GTTSG TTNQS de AAV-3b,
 QNQSG SAQNK de AAV-6,
 SNPGG TAGNR de AAV-7,
 QTTGG TANTQ de AAV-8,
 25 QSTGG TQGTQ de AAV-10,
 SGETL NQGNA de AAV-11 y
 FVSTN NTGGV de AAV-5.

30 Con referencia a la secuencia de AAV2, se enumeran en la Tabla 1 sitios de inserción para AAV y otros parvovirus englobados por la presente invención.

Tabla 1: Sitios de inserción para parvovirus

sitio de inserción	AA/secuencia correspondiente de AAV2		referencias
I-261	S ₂₆₁	YKQIS ₂₆₁ SQSGA	(Girod et al., 1999)
I-266	A ₂₆₆	SQSGA ₂₆₆ SNDNH	(Wu et al., 2000)
I-381	N ₃₈₁	YLTLN ₃₈₁ NGSQA	(Girod et al., 1999)
I-447	R ₄₄₇	YYLSR ₄₄₇ TNTPS	(Girod et al., 1999, Wu et al., 2000)
I-448	T ₄₄₈	YLSRT ₄₄₈ NTPSG	(Grifman et al., 2001)
I-453	G ₄₅₃	NTPSG ₄₅₃ TTTQS	WO 2008/145400
I-459	R ₄₅₉	TTQSR ₄₅₉ LQFSQ	(Shi et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-471	R ₄₇₁	ASDIR ₄₇₁ DQSRN	(Asokan y Samulski, 2006, Moskalenko et al., 2000)
I-534	F ₅₃₄	EKFF ₅₃₄ PQSGV	(Girod et al., 1999)
I-570	P ₅₇₀	RTTNP ₅₇₀ VATEQ	
I-573	T ₅₇₃	NPVAT ₅₇₃ EQYGS	(Girod et al., 1999)
I-584	Q ₅₈₄	STNLQ ₅₈₄ RGNRQ	(Shi et al., 2001, Shi and Bartlett, 2003)

(continuación)

sitio de inserción	AA/secuencia correspondiente de AAV2	referencias
I-587	N ₅₈₇ LQRGN ₅₈₇ RQAAT	(Girod et al., 1999, Shi et al., 2001, Maheshri et al., 2006, Ried et al., 2002, Grifman et al., 2001, Nicklin et al., 2001, Arnold et al., 2006)
I-588	R ₅₈₈ QRGNR ₅₈₈ QAATA	(Shi and Bartlett, 2003)
I-591	A ₅₉₁ NRQAA ₅₉₁ TADV N	(Wu et al., 2000)
I-657	P ₆₅₇ VPANP ₆₅₇ STTFS	
I-664	A ₆₆₄ TFSAA ₆₆₄ KFASF	(Wu et al., 2000)
I-713	T ₇₁₃ NVDFT ₇₁₃ VDTNG	
I-716	T ₇₁₆ FTVDT ₇₁₆ NGVYS	(Maheshri et al., 2006)

I-570 es especialmente adecuado como sitio de inserción que va junto con una delección de Aas dados de la proteína estructural de parvovirus en el sitio de inserción, que conduce a una sustitución completa. En este caso, los Aas RTTNPVATEQ se pueden sustituir por un epi- o mimótope.

Las inserciones se han hecho satisfactoriamente en serotipos de AAV distintos de AAV2.

Tabla 2: Inserciones en serotipos de AAV distintos de AAV2

serotipo de AAV	secuencia	sitio de inserción/ AA con respecto a AAV2	referencias
AAV1	FQSSS ₅₈₈ TDPAT	I-587	N ₅₈₇ Datos propios
AAV1	SSSTD ₅₉₀ PATGD	I-589	Q ₅₈₉ (Arnold et al., 2006, Stachler y Bartlett, 2006)
AAV-3	NNLQS ₅₈₆ -SNTAP	I-585	R ₅₈₅ (Arnold et al., 2006)
AAV-4	GGDQS ₅₈₄ -NSNLP	I-585	(Arnold et al., 2006)
AAV-5	TNNQS ₅₇₅ -STTAP	I-585	(Arnold et al., 2006)

Los sitios de inserción más preferidos son:

- i) I-587 ya que se han hecho diversas inserciones en la extensión de AA alrededor N₅₈₇ (LQRGN₅₈₇ RQAAT) de AAV2. Dentro de esta extensión se hicieron inserciones de diversos péptidos en el extremo C de los Aas Q₅₈₄, N₅₈₇, R₅₈₈ y A₅₉₁ en AAV2 y el extremo C de los Aas de otros serotipos de AAV correspondientes a R₅₈₅ y Q₅₈₉ de AAV2.
- ii) I-453 ya que los epítopes se han insertado satisfactoriamente en el extremo C de G₄₅₃ en AAV2.
- iii) FQSSS₅₈₈ TDPAT o SSSTD₅₉₀ PATGD de AAV1.
- iv) I-261 ya que según la presente invención los epítopes se han insertado satisfactoriamente en el extremo C de S₂₆₁ en AAV2.
- v) I-534 as según la presente invención epítopes se han insertado satisfactoriamente en el extremo C de F₅₃₄ en AAV2.
- vi) I-570 as según la presente invención epítopes se han insertado satisfactoriamente en el extremo C de P₅₇₀ en AAV2.
- vii) I-573 as según la presente invención epítopes se han insertado satisfactoriamente en el extremo C de T₅₇₃ en AAV2.

Los Aas correspondientes para todos los sitios de inserción especificados en el presente documento para parvovirus desvelados en el presente documento se pueden recuperar del alineamiento en la Figura 3 del documento de patente WO 2008/145400. Para los parvovirus no enumerados en el presente documento, se puede realizar un alineamiento en parámetros estándar como se usa aquí con la secuencia de AA proporcionada de dichos parvovirus y los AA correspondientes se pueden recuperar de dicho alineamiento.

Según la presente invención se pueden preferir dos inserciones y se hacen en dos posiciones seleccionadas del grupo que consiste en I-261, I-453, I-534, I-570, I-573 y I-587, preferentemente I-261 en combinación con I-587, I-261 en combinación con I-453 o I-453 en combinación con I-587. Con respecto a las inserciones triples, se hacen combinaciones preferidas en tres posiciones de VP3, preferentemente una inserción en la posición 453 en combinación con una inserción en la posición 587 y en combinación con una mutación adicional, más preferentemente en las posiciones I-453, I-587 combinadas con una de I-534, I-570 y I-573.

Particularmente para las aplicaciones de vacunación, se tienen que generar partículas de AAV que presentan el epítope seleccionado. Por tanto, se prefiere que la cds de VP3 comprenda al menos un epítope heterólogo al virus.

Se prefiere además que el epítotope de la proteína VP3 sea un epítotope de linfocitos B. Preferentemente, el epítotope de linfocitos B es una parte de un antígeno. Los antígenos preferidos son proteínas séricas, proteínas que se pueden encontrar al menos en ciertas condiciones (por ejemplo, en un estado de enfermedad) en la sangre, proteínas de la membrana, especialmente proteínas receptoras (por ejemplo, CD20, receptores de acetilcolina, IL13R, EGFR), y antígenos de superficie de agentes infecciosos, preferentemente epítotope no inmunodominantes de dichos antígenos de superficie. Los antígenos especialmente preferidos son IgE, antígenos tumorales (por ejemplo, Melan A, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW MAA), CA125, IL13R, Her2/NEU, molécula de adhesión celular L1), VEGF, EGFR, CD20, IL1, IL4, IL5, IL6, IL9, IL13, IL17, IL18, IL33, TSLP (linfopoyetina estromal tímica), CETP (proteína de transferencia de éster de colesterol), miembros de la familia TNF (por ejemplo, TNF- α), o β -amiloide.

La VP3 puede comprender al menos un epítotope de linfocitos B heterólogo al parvovirus, que preferentemente no es idéntico a un patógeno, particularmente a un epítotope de linfocitos B de un patógeno, en donde el epítotope de linfocitos B se localiza sobre la superficie del virus. Preferentemente, la VP3 es capaz de inducir una inmunoglobulina capaz de unirse al antígeno el epítotope de linfocitos B del que deriva.

Preferentemente, el epítotope de linfocitos B se inserta en I-453 y/o I-587, especialmente en I-453 y/o I-587 de AAV1, AAV2 o AAV4.

Se prefiere esencialmente que un epítotope de linfocitos B idéntico se inserte en dos o más sitios de inserción diferentes, si es clave que tengan un gran número de péptidos idénticos que se presenta óptimamente sobre la superficie de una cápside, especialmente en caso de que se deba requerir la reticulación directa de receptores de linfocitos B para el cebado de linfocitos B independiente de linfocitos T y la rotura de la tolerancia a linfocitos B contra auto-antígenos. Una mayor densidad de epítotope de linfocitos B aumenta la probabilidad de reticulación óptima de receptores de linfocitos B específicos de péptidos que requiere una distancia definida entre receptores de linfocitos B, y, por tanto, epítotope de linfocitos B respectivos que se presentan sobre una cápside de parvovirus.

Además, un mayor número de epítotope de linfocitos B insertados disminuye la probabilidad de reacciones inmunitarias no deseadas contra el esqueleto de parvovirus debido a i) enmascaramiento de epi-/mimótopes de linfocitos B de parvovirus natural y/o ii) ligeros cambios en la cápside estructural que convierten estos epi-/mimótopes de linfocitos B naturales en menos inmunogénicos. Por consiguiente, se prefieren específicamente proteínas estructurales de parvovirus que comprenden al menos tres inserciones.

Tomados conjuntamente, los sitios de inserción preferidos para presentación superficial de epítotope son las posiciones que siguen a los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos de AAV2 número I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-453, I-459, I-471, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713 y I-716, especialmente I-261, I-453, I-534, I-570, I-573, I-587 y I-588, lo más preferentemente I-453 y I-587.

Las inserciones, tanto terminales como externas, se pueden combinar con la delección de uno o más aminoácidos, que conducen a una sustitución parcial o 1:1 de aminoácidos por diferentes aminoácidos, en donde sustitución parcial significa que, por ejemplo, 8 aminoácidos están sustituidos por 6 aminoácidos diferentes, y una sustitución 1:1 significa que, por ejemplo, 8 aminoácidos están sustituidos por 8 aminoácidos diferentes.

El VP3 puede estar comprendido en una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada con una segunda proteína o péptido. En un ejemplo especialmente preferido, los epítotope de linfocitos B en epítotope particulares mayores de 20 aminoácidos se fusionan con el extremo N de VP3.

El VP3 puede comprender al menos una marca útil para unión a un ligando. En una realización especialmente preferida, dicha marca se introduce en la proteína estructural mutada de parvovirus por una mutación adicional. Dichas marcas se conocen bien en la técnica, Tabla 3.

Tabla 3: Marcas y ligandos correspondientes

Marca	Ligando
AU1	Anticuerpo monoclonal anti-AU1
HIS	Níquel
GST	Glutación
Proteína A	IgG
Biotina o estreptavidina	Estreptavidina
Péptido de unión a calmodulina	Calmodulina
Fc-Péptido de IgG	Proteína A
Flag	Péptido GLAG o 3xFLAG
HA (hemaglutinina)	Péptido HA

La VP3 puede comprender al menos una mutación adicional. La mutación puede ser cualquier mutación adecuada, tal como cualquiera de las definidas anteriormente.

Por ejemplo, una o varias mutaciones adecuadas de la VP3 podrían ser adecuadas para, por ejemplo, i) introducir epítopes de linfocitos B adicionales o incluso idénticos del mismo antígeno diana, y/o ii) epítopes de linfocitos B de una o más dianas de proteína adicionales (vacuna multi-diana), epítope(s) de linfocitos T para promover adicionalmente la respuesta inmunitaria deseada de linfocitos T, secuencia de péptido(s) para dirigir y/o activar las células presentadoras de antígenos, o para obtener mutantes de cápside con inmunogenicidad reducida de la partícula de núcleo. Lo último podría ser una posibilidad para establecer una pauta eficiente de sensibilización / refuerzo.

Además, se puede usar una mutación adicional de la proteína estructural mutada de parvovirus en una posición diferente para componer mimótopes más complejos, para modificar ciertas propiedades del virión, por ejemplo se puede usar para modificar su antigenicidad natural (por ejemplo, Huttner et al., 2003, y el documento de patente WO 01/05990), para modificar sus propiedades cromatográficas (por ejemplo, el documento de patente WO 01/05991), para insertar un segundo epítope de linfocitos B, para insertar un epítope de linfocitos T colaboradores, o para insertar un epítope de CTL. Dicha mutación adicional se selecciona de una mutación puntual, una delección interna o terminal, una inserción y una sustitución. Preferentemente, la (segunda) inserción adicional es internamente, por ejemplo, por una fusión de extremo N o C.

Otro aspecto de la divulgación es una partícula parvoviral obtenible de cualquiera de los métodos desvelados anteriormente. Basándose en los métodos anteriormente descritos, los presentes inventores fueron capaces de producir partículas parvovirales que esencialmente consistían solo en VP3 y no comprendían una señal de localización nuclear (NLS) heteróloga. Dichas partículas no contienen proteína Rep, particularmente Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78. Los métodos descritos permiten la producción de cantidades/rendimientos suficientes para la fabricación de medicamentos a escala comercial.

Otro aspecto de la invención se refiere a una partícula parvoviral que consiste esencialmente en VP3, en donde VP3 comprende opcionalmente una o más mutaciones en comparación con la VP3 natural correspondiente, y en donde la VP3 no contiene una señal de localización nuclear (NLS) heteróloga, y en donde la partícula no contiene proteínas Rep.

Se prefiere especialmente una partícula parvoviral en donde la cápside consista solo en VP3.

Con respecto a la una o más mutaciones, se refiere a las mutaciones que se describen antes.

La descripción proporciona un casete de expresión A que comprende una cds de VP3 como se define antes y un promotor heterólogo para la misma, en donde la transcripción de VP3 es conducida por el promotor heterólogo, y en donde el casete de expresión es capaz de expresar esencialmente solo VP3. Se prefieren especialmente casetes de expresión que expresan solo VP3. La construcción se usa para expresar VP3 mutada. La secuencia de VP3 se puede mutar como se describe. Como se entiende por el experto, el casete de expresión comprende además una secuencia de poli(A).

La descripción también proporciona un casete de expresión B que comprende un fragmento Z como se define antes y un promotor heterólogo para el mismo, en donde la transcripción de fragmento Z es conducida por el promotor heterólogo. La construcción se usa para expresar el fragmento Z. La secuencia del fragmento Z se puede mutar como se describe. Opcionalmente, este casete de expresión comprende además una secuencia de poli(A).

La descripción proporciona además un casete de expresión C que comprende (i) una cds de VP3 como se define antes y el fragmento Z como se define antes, y (ii) un promotor heterólogo para el mismo, en donde la expresión de VP3 y el fragmento Z es conducida por este promotor heterólogo.

Además, el ácido nucleico de la invención puede ser un casete de expresión que comprende un promotor heterólogo, una cds de VP3 como se ha descrito anteriormente y el ácido nucleico de la invención combinados, en donde la expresión de VP3 y del polipéptido codificado por el ácido nucleico (AAP o variante de AAP) es conducida por este promotor heterólogo. Opcionalmente, este casete de expresión comprende además una secuencia de poli(A).

Al menos un casete de expresión A/casete de expresión de VP3 y al menos un casete de expresión B/casete de expresión que comprende el ácido nucleico de la invención se pueden combinar en un kit. Combinando la expresión de VP3 parvoviral de la cds de VP3 y la expresión del fragmento Z/el ácido nucleico de la invención es posible generar partículas que consisten esencialmente solo en VP3 según la presente invención.

La descripción se refiere a un kit que comprende al menos un casete de expresión A de VP3 y al menos un ácido nucleico de la invención o un kit que comprende al menos un casete de expresión C para la expresión combinada y simultánea de VP3 y el fragmento Z en la célula y la generación de VLPs de VP3. Dichos kits contienen además preferentemente un manual.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a la partícula de parvovirus según la invención para su uso

como un medicamento. Dichos medicamentos tienen numerosas ventajas con respecto al estado de la técnica. El sistema inmunitario de un mamífero está especializado en generar fuertes respuestas de anticuerpos contra proteínas de la cápside viral debido a la co-evolución de mamíferos y su sistema inmunitario, por una parte, y el virus por otra parte. Las respuestas de anticuerpos fuertes significan títulos de 1.000 a >100.000 medidos en un ELISA convencional. Las partículas de tipo virus son altamente inmunogénicas debido al parecido con un virus, el patrón repetitivo y altamente estructural de antígenos, y la eficiente captación de dichas partículas por células presentadoras de antígenos. El tamaño del virión, la densidad y el orden simétrico de epítopes de linfocitos B y la distancia óptima de aproximadamente 50 a 100 Å entre cualesquiera dos epítopes de linfocitos B desempeña una función importante en relación con las muy fuertes respuestas de linfocitos B independientes de linfocitos T mediadas por la reticulación directa del receptor de linfocitos B respectivo que rompe incluso la tolerancia de linfocitos B contra auto-antígenos o tolerógenos (Szomolanyi-Tsuda y Welsh, 1998, Szomolanyi-Tsuda et al., 1998, Szomolanyi-Tsuda et al., 2000, Szomolanyi-Tsuda et al., 2001, Zinkernagel, 2002, Bachmann et al., 1993).

Tomados conjuntamente, dichos medicamentos son capaces de inducir una respuesta inmunitaria policlonal contra ciertos epítopes de linfocitos B que conducen a una respuesta inmunitaria activa que da como resultado altos títulos de anticuerpos y de larga duración. La estructura multimérica del virión contiene un gran número de epítopes idénticos densamente encapsidados que reticulan directamente el receptor respectivo sobre linfocitos B y, así, que induce una respuesta de linfocitos B independiente de linfocitos T. La estructura en partículas del medicamento soporta además la respuesta inmunitaria mediante la eficiente captación por células presentadoras de antígenos que activan linfocitos T que finalmente desencadenan el cambio de clase de IgG y la hipermutación de linfocitos B activados, que conduce a la persistente liberación de anticuerpos IgG de alta afinidad y la diferenciación de linfocitos B en células de memoria.

Usando los métodos de la presente invención, se pueden producir fácilmente dichos medicamentos.

La partícula de parvovirus según la invención para su uso como un medicamento según la presente invención puede además comprender adicionalmente uno o más excipientes. El excipiente es un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes son convencionales y pueden incluir tampones, estabilizadores, diluyentes, conservantes y solubilizantes. Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de las partículas (parvo)virales desveladas en el presente documento. En general, la naturaleza del vehículo o excipientes dependerá del modo particular de administración que se emplea. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitano.

En una realización adicional, el medicamento es una vacuna. En general, una vacuna es una preparación que consiste en antígenos de un agente causante de enfermedad que, cuando se introduce en el cuerpo, estimula la producción de anticuerpos específicos o células alteradas. Esto produce generalmente una respuesta inmunitaria como principio activo. Particularmente, las partículas de parvovirus ensambladas de VP3 comprenden al menos un epítope de linfocitos B heterólogo al parvovirus, preferentemente para prevenir o tratar una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, diabetes tipo 1), una enfermedad tumoral (los ejemplos son: melanoma: por ejemplo HMW MAA, glioblastoma multiforme: por ejemplo CA125, anti-IL13R, cáncer de colon: por ejemplo CA125 o anti-EGF Y/O, cáncer de mama: por ejemplo Her2/NEU, cáncer de ovario: por ejemplo, molécula de adhesión a L1, linfoma de linfocitos B: por ejemplo, CD20), una enfermedad alérgica (asma, alergias tales como rinitis alérgica, ejemplos de dianas son IgE, IL4, IL5, IL9, IL13, IL18, IL33, TSLP), una enfermedad metabólica (por ejemplo, colesterol alto, intervención en el metabolismo del colesterol (ejemplo de diana: CETP), obesidad, hipertensión (ejemplo de diana: angiotensina II), una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, ejemplos de diana IL6, IL17 y TNF- α), una enfermedad neurológica (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer; ejemplo de diana: β -amiloides) o para ser usadas en oftalmología (por ejemplo, AMD, ejemplo de diana VEGF).

También se engloba por la presente invención la partícula de parvovirus según la invención para su uso en métodos de vacunación y/o de tratamiento o prevención de las enfermedades especificadas en el presente documento administrando a un paciente una cantidad eficaz de partículas de parvovirus de la invención.

La vacuna puede comprender además uno o más adyuvantes, particularmente como una sustancia inmunoestimulante. El adyuvante se puede seleccionar basándose en el método de administración y puede incluir adyuvantes basados en aceite mineral tales como adyuvante completo e incompleto de Freund, adyuvante incompleto Montanide de Seppic tal como ISA, adyuvantes de emulsión de aceite en agua tales como el sistema de adyuvantes de Ribi, formulación de adyuvante Syntax que contiene muramildipéptido, o adyuvantes de sales de aluminio.

Una realización de la presente invención es la partícula de parvovirus según la invención para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad infecciosa, una enfermedad tumoral, una enfermedad alérgica, una enfermedad metabólica, una enfermedad inflamatoria (crónica), una enfermedad neurológica, adicción o que se va a usar en oftalmología. Las enfermedades autoinmunitarias preferidas y/o enfermedades inflamatorias crónicas son artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad de Crohn. Una enfermedad tumoral preferida es una enfermedad elegible para el tratamiento con un anticuerpo monoclonal, por ejemplo trastuzumab. Las enfermedades alérgicas preferidas son asma y alergias, por ejemplo rinitis alérgica. Los ejemplos para alérgenos preferidos son polen de abedul, ácaros del polvo doméstico y polen de pasto. Una enfermedad neurológica preferida es la enfermedad de Alzheimer. Una enfermedad metabólica preferida es aterosclerosis. Una enfermedad oftalmológica preferida es la degeneración macular senil. La partícula de parvovirus o el medicamento se pueden usar preferentemente en un método de rotura de la tolerancia de linfocitos B, que significa inducir anticuerpos contra un auto-antígeno.

La enfermedad tratada por el medicamento no es preferentemente una enfermedad infecciosa.

Además, la proteína estructural mutada de parvovirus del medicamento no se usa como vector en terapia génica.

La partícula parvoviral de la invención se puede usar para terapia génica.

Los siguientes ejemplos y figuras pretenden explicar la invención en detalle sin restringirla.

Figuras

FIG. 1: Organización esquemática del gen de la cápside de AAV.

Se muestra el ADN codificante para el gen *cap* en la primera línea, las proteínas Cap VP1, VP2 y VP3 en las siguientes. Los números de nucleótidos corresponden a la secuencia de genoma de AAV-2 dada por Ruffing et al. (1994) accesible de NCBI (número de entrada: NC_001401). Numeración de secuencias de aminoácidos (AA) según VP1 de AAV2 (Girod et al. 1999). Se marcan los sitios de restricción EcoNI y BsiWI. No a escala.

FIG. 2: Secuencias de nucleótidos del fragmento Z de diferentes AAVs.

Se dan las secuencias de nucleótidos del fragmento Z de los parvovirus AAV1 (NC_002077), AAV2 (AF043303), AAV3b (AF028705), AAV4 (U89790), AAV5 (NC_006152), AAV6 (AF028704), AAV7 (AF513851), AAV8 (AF513852), AAV10 (AY631965), AAV11 (AY631966) y b-AAV (NC_005889) (se dan los números de entradas de nucleótidos según NCBI entre paréntesis). +1 indica la posición del primer nucleótido que codifica el codón de iniciación ATG de VP3. Se muestran los 44 nucleótidos aguas arriba y los 242 nucleótidos aguas abajo de la posición +1. Está subrayado el codón de iniciación ATG de VP3.

FIG. 3: Representación esquemática de las diferentes construcciones de expresión adecuadas para el ensamblaje de partículas VP3.

Se muestran seis posibles construcciones de expresión que se diferencian en la configuración de la secuencia del fragmento Z y cds de VP3 por diferentes recuadros como se indica. En la situación *cis* se expresan bajo el mismo promotor mientras que en *trans* dos promotores separados conducen su expresión, como se indica por el círculo. +1 indica la posición del primer nucleótido que codifica el codón de iniciación ATG de VP3. Se recuadran el ADN del fragmento Z que comprende al menos 44 nucleótidos aguas arriba y más de 242 nucleótidos aguas abajo de la posición +1 (véase la Fig. 2). +1602 marca el número del último nucleótido del codón de terminación TAA en el extremo 3' de la cds de VP3 (como se expone resumidamente en la Fig. 1). Un número arbitrario de nucleótidos puede separar la cds de VP3 y el fragmento Z y se marca por //. No a escala.

FIG. 4: Organización esquemática de los genes *rep* y *cap*, así como la posición de diferentes sitios de restricción usados para clonar construcciones de expresión.

Representación esquemática de los genes *rep* y *cap* en el genoma de parvovirus. Se marcan la posición de los sitios de restricción R1 a R5 usados para clonar las diferentes construcciones de expresión, así como las posiciones de los codones de iniciación de la traducción de las tres proteínas de la cápside. No a escala

FIG. 5: Comparación del ensamblaje de cápside usando diferentes construcciones de expresión de proteína VP.

A) Representación esquemática de las construcciones de expresión del gen *cap* usadas para el análisis de expresión de proteínas VP y para estudiar el ensamblaje de cápside. Los plásmidos pCMV-VP3/1882 a pCMV-VP3/2809 derivan del plásmido pVP3. Los números indican las posiciones de nucleótidos en el genoma de AAV2 según Ruffing et al., 1994 (arriba). Las flechas representan los sitios de inicio de la traducción de las proteínas VP, los sitios de inicio de la traducción mutados se marcan con una cruz. La capacidad de las proteínas expresadas de estas construcciones de expresión para ensamblar cápsides se da en la columna derecha (correspondiente a la cuantificación en C, ++ corresponde a título máximo de cápsides, - significa que no se podrían detectar cápsides, + significa que el ensamblaje de cápside es detectable. B) Se realizó el análisis de transferencia Western de proteínas VP expresadas usando el anticuerpo B1 que detecta las tres proteínas de la cápside o el anticuerpo A69 que detecta solo VP1 y VP2. En cada carril se separa una construcción de expresión diferente, nombre según A. Se marca la posición de las tres proteínas de la cápside. C) Se cuantificó la

formación de cápsides por un ELISA basado en el anticuerpo monoclonal A20. Se muestran medias +/- desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes; el asterisco indica las construcciones para las que no se pudieron detectar cápsides.

5 FIG. 6: Complementación del ensamblaje de cápside de VP3 por VP2N-gfp.
 A) Representación esquemática de la construcción de fusión, pVP2N-gfp, así como de sus transcritos VP2N-gfp, VP3N-gfp y GFP como se indica. B) Detección por transferencia Western de VP3 (anticuerpo B1), proteína de fusión de VP3N-gfp (anticuerpo anti-gfp) y expresión de VP2N-gfp (anticuerpo A69) en células HeLa después de la co-transfección de pVP3/2809 (1) y cantidades decrecientes de pVP2N-gfp (1, 1/5, 1/50, 1/500, significando del 0) como se indica. C) Detección de la formación de cápsides por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo A20 en células HeLa co-transfectadas con pVP3/2809 y pVP2N-gfp en diferentes relaciones como se marca y se muestra en B. D) Cuantificación de la formación de cápsides en células HeLa co-transfectadas con pVP3/2809 y pVP2N-gfp en diferentes relaciones usando el ELISA de cápside basado en A20. Nuevamente, se marcan las diferentes relaciones de plásmido y corresponden a las mostradas en B y C. Para cada experimento, se muestran la concentración media de cápsides +/- desviaciones estándar de al menos dos experimentos independientes; el asterisco indica muestras para las que no se pudieron detectar cápsides.

FIG. 7: Incorporación subestequiométrica de VP2 truncada dentro de partículas VP3 en la situación cis. Análisis de transferencia Western de AAV wt purificada y cápsides derivadas de pVP3/2696 o pVP3/2809 trans-complementadas con pVP2N-gfp. La detección de VP1 y VP2 ocurrió con el anticuerpo A69. Se cargaron al gel las diferentes cantidades de cápsides como se indica para una estimación cualitativa de la relación de diferentes señales (VP2tru = VP2 truncada).

FIG. 8: Caracterización del plásmido auxiliar pVP2Ncm-gfp con uso alternativo de codones.

25 A) Alineamiento de secuencias de ADN de VP2N wt (VP2N, SEQ ID NO: 145) y de codones modificados (VP2Ncm, SEQ ID NO: 146) de las construcciones respectivas pVP2N-gfp (detalles en Fig. 6A) y pVP2Ncm-gfp.
 30 B) Transferencia Western de extractos de células 293-T después de la transfección de los plásmidos indicados con el anticuerpo monoclonal A69.
 C) Imágenes de fluorescencia de células HeLa transfectadas con pVP2N-gfp: Los paneles izquierdos superior e inferior representan la fluorescencia total de GFP. Los paneles derechos superior e inferior muestran la inmunofluorescencia indirecta de la parte de VP2 dentro de VP2N-gfp visualizada por el anticuerpo A69 y el anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con Cy3 secundario.
 35 D) Cuantificación de la formación de cápsides en células 293-T co-transfectadas con pCMV-VP3/2809 y los plásmidos indicados usando el ELISA de cápsides basado en A20. Se muestran medias +/- desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes; el asterisco indica muestra para la que no se pudieron detectar cápsides.

FIG. 9: Mutagénesis de codones de terminación dentro de la construcción de trans-complementación
 A) Representación esquemática de construcciones de pVP2N-gfp con codones de terminación de la traducción en el marco de lectura de VP2N en cuatro posiciones diferentes. Los números de los nucleótidos sustituidos se refieren a las posiciones de nucleótidos del genoma de AAV2. En pVP2N/parada A, el codón cag que empieza en el nucleótido 2770 y que codifica la glutamina se ha mutado a tag, en pVP2N/paradaB, el codón gga que empieza en el nucleótido 2797 y que codifica glicina se ha mutado a tga, en pVP2N/paradaC, el codón agt que empieza en el nucleótido 2821 y que codifica serina se ha mutado a tga, y en pVP2N/paradaD, el codón gga que empieza en el nucleótido 2878 y que codifica glicina se ha mutado a tga. B) Transferencia Western de extractos de células 293-T después de la co-transfección de pCMV-VP3/2809 y los plásmidos indicados con anticuerpos monoclonales B1 y A69. C) Cuantificación de la formación de cápsides en células 293-T co-transfectadas con pCMV-VP3/2809 y los plásmidos indicados usando el ELISA de cápsides basado en A20. Se muestran medias +/- desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes; el asterisco indica muestra para la que no se pudieron detectar cápsides.

FIG. 10: Localización celular de proteínas de la cápside y cápsides obtenidas por expresión de diferentes mutantes del gen *cap*.

Se visualizó la localización de proteínas de la cápside expresadas a partir de diferentes construcciones en células HeLa por inmunofluorescencia doble usando un antisuero de conejo policlonal que detecta proteínas totales de la cápside (VPs) y anticuerpo monoclonal A20 que detecta cápsides ensambladas. Los plásmidos transfectados se indican en el margen izquierdo.

La tinción por inmunofluorescencia de células HeLa transfectadas con el anticuerpo A20 mostró que la proteína VP del mutante pCMV-VP3/2696RKR168-170AAA era tan eficiente en el ensamblaje de cápside como AAV wt. Para la construcción pCMV-VP3/2696RKR168-170AAA, se mutó la NLS postulada convirtiendo el péptido RKR (AA 168-170).

Fig. 11: El ensamblaje de cápside de VP3 modificada por una NLS o una extensión del extremo N de albúmina de suero humano.

A) Representación esquemática de NLS-VP3 y HSA-VP3 usados para análisis de ensamblaje de cápside.
 B) Inmunofluorescencia doble indirecta de células HeLa transfectadas con los plásmidos indicados encima de las imágenes usando un antisuero de VP policlonal (VPs) para localizar proteínas de la cápside expresadas totales (fila superior) y anticuerpo A20 para detectar cápsides ensambladas (fila inferior). VP2N-egfp es un
 5 sinónimo de pVP2N-gfp.
 C) Análisis de inmunotransferencia puntual de fracciones obtenidas de extractos de células COS-1 separadas en gradientes de sacarosa. Las células se recogieron 48 h después de la transfección de los plásmidos indicados en el margen izquierdo. Obsérvese que la reacción con el anticuerpo A20 se realizó en condiciones no desnaturalizantes para detectar las cápsides ensambladas, mientras que la reacción con anticuerpo B1 se
 10 realizó después de la desnaturalización de las cápsides para detectar proteínas de la cápside individuales. Se indica la constante de sedimentación de la cápside viral (60 S).

Fig. 12: Producción de partículas VP3 en células de insecto

A) Representación esquemática de las construcciones usadas para la producción de AAV en células de insecto.
 B) Se realizó análisis de transferencia Western de proteínas VP expresadas usando el anticuerpo SA7885 (dilución 1:10000), un suero de conejo policlonal que detecta las tres proteínas de la cápside y posteriormente el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-HRP 1:2500 (Dianova, Hamburgo, Alemania).
 20 C) Se cuantificó la formación de cápsides por un ELISA basado en anticuerpo monoclonal A20. Se muestran medias +/- desviaciones estándar de 2 experimentos independientes (construcciones de VP2) o 4 (VP3 y VP1_Mod4).

Fig. 13: Análisis de transferencia Western de diferentes construcciones de AAV1

25 Análisis de transferencia Western de proteínas VP expresadas en lisados en bruto de células 293 transfectadas con diferentes construcciones de AAV1: pCI_VP2/2539_AAV1, pCI_VP3/2539_AAV1mutACG, pCI_VP3/2634_AAV1mutACG y pUCAV1. Se realizó la detección de proteínas VP usando el anticuerpo B1 (dilución: 1:250) (Progen Heidelberg, Alemania) y posteriormente el anticuerpo secundario anti-ratón IgG-HRP 1:2500 (Dianova, Hamburgo, Alemania).

30 Se cargaron 2E10 partículas por construcción según valoración de AAV1 por un ELISA de cápsides de AAV1 (Progen Heidelberg, Alemania).

La transferencia Western muestra que la construcción pUCAV1 expresa las tres proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 (carril 5) mientras que pCI_VP2/2539_AAV1 conduce a la expresión de VP2 y VP3 (carril 2) y dentro de lisados de células transfectadas con pCI_VP3/2539_AAV1mutACG y pCI_VP3/2634_AAV1mutACG solo pudo detectarse VP3 (carril 3 y 4).
 35

Fig. 14: Trans-complementación de una construcción de AAV1 VP2 con pVP2N-gfp de AAV2

40 Análisis de transferencia Western de extractos de células transfectadas con construcción de expresión de VP3 de AAV2 pCMV-VP3/2809 o de AAV1 pCMV-AAV1VP3/2828 (indicados en la figura como AAV2 o AAV1, respectivamente) con o sin cotransfección de pVP2N-gfp. Se detectó AAV1 y AAV2 VP3 por el anticuerpo B1 (Progen, Heidelberg, Alemania) que reconoce un epítipo completamente conservado entre AAV1 y AAV2. Se detectó la proteína VP2N-gfp por el anticuerpo A69 (Progen, Heidelberg, Alemania).

Fig. 15: Comparación de la eficiencia de producción de partículas usando diferentes vectores de expresión de pCMV-VP

45 A) Representación esquemática de las construcciones. Se clonaron pCI-VP, pCI-VP2 y pCI-VP3 por amplificación por PCR de las regiones codificantes de VP respectivas usando el cebador con nucleótidos protuberantes XhoI (5') y NotI (3') y subclonando los productos de PCR digeridos con XhoI/NotI en el vector digerido con XhoI/NotI pCI (PROMEGA). En caso de pCI-VP2, se cambió el codón de iniciación para VP2 de ACG a ATG al mismo tiempo.
 50 Para clonar las construcciones pCI-VP2mutACG, pCMV-NLS-VP3 y pCMV-VP3/2696, por favor refiérase a cualquier parte.

B) Para la transfección, se sembraron 5,0E+05 células 293-T en cada pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos en un volumen total de 3 ml de medio (DMEM que contiene 10 % de FCS y ABAM). Las células se cultivaron a 37 °C y 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada durante 24 h. Posteriormente, las células se transfectaron usando el protocolo de transfección con fosfato de calcio como se desvela en el documento de patente US 2004/0053410. Brevemente, para la transfección de un pocillo con células 293-T, se mezclaron 6 µg de los plásmidos indicados (pCI-VP, pCI-VP2, pCI-VP3, pCI-VP2 y pCI-VP3 en una relación molar 1:10, pCMV-NLS-VP3, pCI-VP2mutACG y pCMV-VP3/2696, respectivamente) en 150 µl de CaCl₂ 270 mM. Se añadieron a la mezcla 150 µl 2x BBS (BES 50 mM (pH 6,95), NaCl 280 mM y Na₂HPO₄ 1,5 mM) y se mezcló cuidadosamente la solución resultante pipeteando. La solución se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y luego se añadió gota a gota a las células. Las células se incubaron a 35 °C, 3 % de CO₂ en una atmósfera humidificada durante 18 h. Después de 18 h a 35 °C y 3 % de CO₂, las células se cultivaron durante 3 d adicionales a 37 °C, 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada. Posteriormente, se lisaron células 293-T en el medio por tres rondas de ciclos congelación (-80 °C) y descongelación (37 °C). Se
 55
 60
 65

aclaró el lisado (3 ml de volumen total) por centrifugación y se determinó el título de cápsides de VLP usando un ELISA comercialmente disponible (ELISA de valoración de AAV, Progen). Se indican los valores promedio de 4 a 6 transfecciones independientes por construcción con barras de error respectivas.

En particular, la eficacia de producción de partículas con la construcción pCMC-NLS-VP3 estuvo por debajo del límite de detección (aproximadamente $1E+09$ / ml) y, por tanto, al menos 3-4 logaritmos menos en comparación con los mejores vectores de producción de partículas VP3 descritos en la presente invención (pCI-VP2mutACG y pCMV-VP3/2696).

C) Para la transfección, se sembraron $5,0E+05$ células 293-T en cada pocillo de una placa de cultivo celular de 6 pocillos en un volumen total de 3 ml de medio (DMEM que contiene 10 % de FCS y ABAM). Las células se cultivaron a 37 °C y 5 % de CO₂ en una atmósfera humidificada durante 24 h. Posteriormente, las células se transfectaron usando el protocolo de transfección con fosfato de calcio como se desvela en el documento de patente US 2004/0053410. Brevemente, para la transfección de un pocillo con células 293-T, se mezclaron 6 µg de los plásmidos indicados (pCI-VP, pCI-VP2, pCI-VP3, pCI-VP2 y pCI-VP3 en una relación molar 1:10, pCMV-NLS-VP3, pCI-VP2mutACG y pCMV-VP3/2696, respectivamente) en 150 µl de CaCl₂ 270 mM. Se añadieron a la mezcla 150 µl 2x BBS (BES 50 mM (pH 6,95), NaCl 280 mM y Na₂HPO₄ 1,5 mM) y se mezcló cuidadosamente la solución resultante pipeteando. La solución se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y luego se añadió gota a gota a las células. Las células se incubaron a 35 °C, 3 % de CO₂, en una atmósfera humidificada durante 18 h. Después de 18 h a 35 °C y 3 % de CO₂, las células se cultivaron durante 3 d adicionales a 37 °C, 5 % de CO₂, en una atmósfera humidificada.

Posteriormente, se retiró el sobrenadante de células 293-T, las células se aclararon con PBS y finalmente se lisaron en 300 µl de tampón RIPA (Tris.Cl 25 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, 1 % de IGEPAL, 1 % de Na.DOC, 0,1 % de SDS). Se añadieron 100 µl 3x tampón de muestra Geba (Gene Bio-Application Ltd) y DTT 25 mM, y las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 min. Se centrifugaron las muestras y 30 µl de sobrenadante purificado se sometieron a SDS-PAGE (10 % de geles GeBa, Gene Bio-Application Ltd). Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (1 h, 230 mA) que se bloqueó durante 1 h a TA posteriormente. Se detectaron las proteínas VP con el anticuerpo B1 (Progen) por incubación durante la noche a 4 °C en tampón de bloqueo (dilución 1:500), posterior lavado e incubación con anticuerpo secundario (anti-ratón IgG-HRP; 1:2500 en tampón de bloqueo). Finalmente, se aclaró otra vez la membrana y se incubó con sustrato SuperSignal West Pico (Pierce) durante 5 min a TA. Las proteínas de la cápside de AAV se expresan como era de esperar a partir de los diferentes vectores de expresión de VP.

FIG. 16: Organización esquemática del gen de la cápside de AAV.

Se muestra la posición de ORF2 y la proteína codificada AAP en relación con la posición de codones de iniciación de la traducción de las proteínas Cap VP1, VP2 y VP3, así como los sitios de restricción EcoNI y BsiWI (como se da y se describe con más detalle en la Fig. 1). Las flechas marcan el sitio de inicio de la traducción e indican que VP1, VP2 y VP3 se traducen del mismo marco de lectura (llamado primer ORF, ORF1, en el presente documento) del gen cap, mientras que AAP se traduce de un marco de lectura diferente (ORF2). Para VP1, VP2 y VP3, se dan los números bien definidos de los puntos de inicio de la traducción.

FIG. 17: Secuencia de nucleótidos de ORF2 y secuencia de proteínas de AAP de AAV2.

Se da la secuencia de nucleótidos de ORF2 de AAV2 (número de entrada de NCBI NC_001401) desde la posición 2717 hasta 3343 (incluyendo el codón de terminación tga), así como la secuencia de proteínas respectiva de AAP obtenida tras la traducción de ORF2 empezando con el primer nucleótido de ORF2. 2809 marca la posición de nucleótidos del codón de iniciación ATG de VP3 que está subrayado y se da en negrita. También está subrayado y marcado en negrita el codón de iniciación de la traducción de AAP predicho CTG que codifica L (leucina).

Fig. 18: Secuencia de ORF1cm y ORF2cm.

A) Secuencia de ADN del fragmento de restricción EcoNI-BsiWI de codones modificados ORF1cm.

B) Secuencia de ADN del fragmento de restricción EcoNI-BsiWI de codones modificados ORF2cm.

Los codones de iniciación de la traducción de VP2 y VP3 están subrayados. Está marcado el inicio de ORF2 (↓) y la posición del codón de iniciación de la traducción de AAP no canónico predicho CTG intacto en ORF2cm está marcado por un marco. Y/o que el codón de iniciación de la traducción de AAP está mutado en CCG en ORF1cm.

Fig. 19: Trans-complementación del plásmido que expresa VP3 con pVP2N-gfp.

A) Representación esquemática de la construcción pVP2N-gfp, que contiene el fragmento *EcoNI-BsiWI* derivado del genoma de AAV2 y un casete *gfp*,

B) Se co-transfectó pVP2N-gfp con pCMV-VP3/2809 en cantidades decrecientes en células 293-T, empezando con relaciones equimolares, para complementar la expresión del plásmido de VP3 pCMV-VP3/2809. Para comparación se transfectaron vector vacío pBS (vector Bluescript comercialmente disponible) o el plásmido pCMV-VP3/2696. Se analizaron muestras por transferencia Western usando anticuerpos monoclonales B1 para la detección de VP3 y A69 para la detección de VP2N-gfp y VP2tru (VP2 truncada).

C) Se cuantificó la formación de cápsides por un ELISA basado en anticuerpo monoclonal A20. Se muestran

medias +/- desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes; los asteriscos indican muestras para las que no se pudieron detectar cápsides.

5 Fig. 20: Trans-complementación del plásmido que expresa VP3 con pVP2N/ ORF1cm y pVP2N/ORF2cm. Misma configuración experimental que se describe en la Fig. 19 con la diferencia de que las construcciones pVP2N/ORF1cm y pVP2N/ORF2cm se han usado para trans-complementación. Las secuencias de ADN de codones modificados (las secuencias detalladas se dan en Fig. 18) se representan como recuadros sombreados en A).

10 Fig. 21: Trans-complementación del plásmido que expresa VP3 con pORF2/CTG-AU1, pORF2/ATG-AU1 y pORF2/TTG-AU1. Misma configuración experimental que se describe en la Fig. 19 con la diferencia de que las construcciones pORF2/CTG-AU1, pORF2/ATG-AU1 y pORF2/TTG-A se han usado para trans-complementación. Comprenden el ORF2 entero del gen cap (como se da en la Fig. 17) fusionado con secuencias que codifican una marca AU1. 15 El codón de iniciación de la traducción de AAP predicho (CTG) se mutó adicionalmente a ATG y TTG. Anticuerpo monoclonal anti-AU1 para la detección de AAP-AU1 o suero anti-AAP policlonal para la detección de AAP-AU1 o AAP truncada en el extremo C (AAPtru).

20 Fig. 22: Trans-complementación del plásmido que expresa VP3 con pVP2N/ORF2paradaA, pVP2N/ORF2paradaB y pVP2N/ORF2paradaC. Se co-transfectaron derivados de pVP2N-gfp que alojan codones de terminación en ORF2 del fragmento del gen cap con el plásmido de expresión de VP3 pCMV-VP3/2809 en células 293-T.

25 A) Representación esquemática de las construcciones pVP2N/ORF2paradaA, pVP2N/ORF2paradaB y pVP2N/ORF2paradaC, respectivamente, que contienen codones de terminación en ORF2 del fragmento del gen cap en las posiciones indicadas. En pVP2N/ORF2paradaA, el codón tgg que empieza en el nucleótido 2810 se ha mutado a tag, en pVP2N/ORF2paradaB, el codón caa que empieza en el nucleótido 2831 se ha mutado a taa y en pVP2N/ORF2paradaC, el codón gaa que empieza en el nucleótido 2879 se ha mutado a tga. Ninguna mutación altera ORF1.

30 B) Se analizaron muestras por transferencia Western usando anticuerpos monoclonales B1 para la detección de VP3 y A69 para la detección de VP2N-gfp.

C) Se cuantificó la formación de cápsides por un ELISA basado en anticuerpo monoclonal A20. Se muestran medias +/- desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes; los asteriscos indican muestras para la que no se pudieron detectar cápsides.

35 Fig. 23: Trans-complementación del genoma de AAV2 de longitud completa deficiente en expresión de AAP con diferentes construcciones.

40 A) Representación esquemática del plásmido pTAV2.0, que aloja el genoma de AAV2 natural y del plásmido pTAV/ORF1cm, que contiene el fragmento EcoNI/BsiWI de codones modificados en ORF1 del gen cap (recuadro sombreado).

B) Se co-transfectaron plásmidos con las construcciones indicadas en células 293-T. Se realizó análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas VP usando el anticuerpo monoclonal B1. Se detectaron AAP y AAP truncada (AAPtru) con suero anti-AAP policlonal.

45 C) y D) Se cuantificó la formación de cápsides tras la co-transfección de plásmidos como se indica en células 293-T por un ELISA basado en anticuerpo monoclonal A20. Se muestran medias +/- desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes; los asteriscos indican muestras para la que no se pudieron detectar cápsides.

50 Fig. 24: Trans-complementación del genoma de AAV2 de longitud completa que contiene un codón de terminación en ORF2 del gen cap por genoma wt.

55 A) Representación esquemática del plásmido pTAV2.0, que aloja el genoma de AAV2 wt y del plásmido pTAV/ORF2paradaB, que contiene un codón de terminación en ORF2 del gen cap (posición equivalente como en el plásmido pVP2N/ORF2paradaB, Fig. 22).

B) Se co-transfectaron plásmidos con el vector vacío pBS o con pVP2N-gfp (como se indica) en células 293-T. Se realizó el análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas VP usando el anticuerpo monoclonal B1. Se detectaron AAP y AAPtru con suero anti-AAP policlonal.

60 C) Se cuantificó la formación de cápsides tras la co-transfección de plásmidos como se indica en células 293-T por un ELISA basado en anticuerpo monoclonal A20. Se muestran medias +/- desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes; los asteriscos indican muestras para la que no se pudieron detectar cápsides.

65 Fig. 25: Inmunofluorescencia imágenes para intralocalización celular de VP3 y NoLS-VP3, así como cápsides ensambladas.

A) Representación esquemática de la construcción usada para la expresión de VP3 fusionada con la señal de localización nucleolar de HIV Rev (NoLS-VP3) en comparación con la construcción que expresa NLS-VP3 debido a la fusión de VP3 a la señal de localización nucleolar del antígeno T grande de SV40 (como se usa en la Fig. 11).

B) Inmunofluorescencia doble indirecta de células HeLa transfectadas con plásmidos indicados en la izquierda usando un antisuero de VP policlona (VPs) para localizar proteínas de la cápside expresadas totales (imágenes izquierdas) y anticuerpo A20 para detectar cápsides ensambladas (imágenes derechas).

C) Inmunofluorescencia doble indirecta de células HeLa transfectadas con plásmidos indicados en la izquierda usando un anticuerpo monoclonal contra la marca AU1 (anti-AU1) para localizar AAP expresada (imagen izquierda) y anticuerpo contra fibrilarina policlona (anti-fibrilarina) como un marcador para la localización de nucléolos (imagen central). A la derecha se muestra la imagen de contraste de fase del mismo sector.

Fig. 26: Expresión y actividad de ensamblaje de cápside de VP3, NLS-VP3 y NoLS-VP3.

A) Se realizó el análisis de transferencia Western de extractos de células 293-T que expresan VP3 o proteínas de fusión de VP3 como se indica usando el anticuerpo monoclonal B1.

B) Se cuantificó la formación de cápsides en células 293-T por un ELISA basado en anticuerpo monoclonal A20. Se muestran medias +/- desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes; los asteriscos indican muestras para la que no se pudieron detectar cápsides.

Fig. 27: Comparación de secuencias de AAP de parvovirus.

Alineamiento de secuencias de proteínas de AAP predichas derivada de ORF2 del gen cap de diferentes parvovirus. Los aminoácidos conservados que son 100 % idénticos en al menos 60 % de las secuencias alineadas se representan como líneas en la fila inferior. La posición del inicio de la traducción predicho de AAP de AAV2 está marcado por un marco. También están incluidas las secuencias no traducidas aguas arriba de los posibles codones de iniciación de la traducción. Los números de entrada de NCBI de las secuencias de ADN correspondientes se enumeran en la Tabla 8.

Fig. 28: Análisis de EM de preparaciones de partículas vacías de AAV2

Partículas de tipo virus ensambladas de VP1, VP2 y VP3 (VP1,2,3 VLP) o ensambladas solo de VP3 (VLP de VP3) como se indica.

Fig. 29: Ensamblaje de cápside tras la trans-complementación

Se cuantificó la formación de cápsides en células 293-T de construcciones pCMV_VP3/2809 de AAV2 (AAV2-VP3), pCMV_AAV1VP3/2829 de AAV1 (AAV1-VP3) y una construcción de VP3 de AAV5 correspondiente (AAV5-VP3) co-transfectadas con pVP2N-gfp de AAV2, AAV1 y AAV5 como se indica por un ELISA basado en anticuerpo monoclonal A20. Se usó el vector Bluescript (pBS) como control negativo. Los asteriscos indican muestras para las que no se pudieron detectar cápsides.

Secuencias de aminoácidos

SEQ ID NO: 1

ILVRLTQTQ YLTPSLSDSH QQPPLWELI RWLQAVAHQW QTITRAPTEW VIPREIGIAI
PHGWATESSP PAPEPGPCPP TTTTSTNKFP ANQEPRTTIT TLATAPLGGI LTSTDSTATF
HHVTGKDSST TTGDS DPRDS TSSSLTFKSK RSRRTVRRR LPITL PARFR CLLTRSTSSR
TSSARRIKDA SRRSQQTSSW CHSMDTSP

SEQ ID NO: 2

SSRHKSQTPP RASARQASSP LKRDSILVRL ATQSQSPIHN LSENLQQPPL LWDLLQWLQA
VAHQWQTITK APTEWVMPQE IGIAIPHGWA TESSPPAPAP GPCPPTITTS TSKSPVLQRG
PATTTTTSAT APPGGILIST DSTATFHHVT GSDSSTTIGD SGPRDSTNS STSKSRRSRR
MMASQPSLIT LPARFKSSRT RSTSFRTSSA LRTRAASLRS RRTCS

SEQ ID NO: 3

ISVRLATQSQ SQTNLNSENH QQPQVWDLI QWLQAVAHQW QTITRVPMEW VIPQEIGIAI
PNGWATESSP PAPEPGPCPL TTTISTSKSP ANQELQTTT TLATAPLGGI LTLTDSTATS
HHVTGSDSLT TTGDSGPRNS ASSSSTSKLK RSRRTMARRL LPITL PARFK CLRTRSISRR
TCSGRRTKAV SRRFQRTSSW SLSMDTSP

SEQ ID NO: 4

ES 2 742 180 T3

LNPPSSPTPP RVSAKKASSR LKRSSFSKTK LEQATDPLRD QLPEPCLMTV RCVQQLAELQ
 SRADKVPMEW VMPRVIGIAI PPGLRATSRP PAPEPGSCPP TTTTSTSDSE RACSPTPTTD
 SPPPGDTLTS TASTATSHHV TGSDSSTTTG ACDPKPCGSK SSTSRSRRSR RRTARQRWLI
 TLPARFRSLR TRRTNCRT

SEQ ID NO: 5

5 TTTFQKERRL GPKRTPSLPP RQTPKLDPAD PSSCKSQPNQ PQVWELIQCL REVAAHWATI
 TKVPMEWAMP REIGIAIPRG WGTESSPSP EPGCCPATT TSTERSKAAP STEATPTPTL
 DTAPPGTTLT LTASTATGAP ETGKDSSTTT GASDPGPSES KSSTFKSKRS RCRTPPPPSP
 TTSPPPSKCL RTTTTSCPTS SATGPRDACR PSLRRSLRCR STVTRR

SEQ ID NO: 6

10 SSRHKSQTPP RALARQASSP LKRDSILVRL ATQSQSPHTN LSENLOQPPL LWDLLQWLQA
 VAHQWQTITK APTIEWVMPQE IGIAIPHWG TESSPPAPEH GPCPPITTT TSKSPVLQRG
 PATTTTTSAT APPGGILIST DSTAISHHVT GSDSSTTIGD SGPRDSTSSS STSKSRRSRR
 MMASRPSLIT LPARFKSSRT RSTSCRTSSA LRTRAASLRS RRTCS

SEQ ID NO: 7

15 SRHLSVPPTP PRASARKASS PPERDSISVR LATQSQSPTL NLENLQORP LVWDLVQWLQ
 AVAHQWQTIT KVPTIEWVMPQ EIGIAIPHWG ATESSLPPAPE PGPCPPTTTT STSKSPVKLQ
 VVPTTTPTSA TAPPGGILT TDSTATSHHV TGSDSSTTTG DSGPRSCGSS SSTSRSRRSR
 RMTALRPSLI TLPARFRYSR TRNTSCRTSS ALRTRAACL SRRTSS

SEQ ID NO: 8

20 SHHPSVLQTP LRASARKANS PPEKDSILVR LATQSQFQTL NLENLQORP LVWDLIQWLQ
 AVAHQWQTIT KAPTEWVVR EIGIAIPHWG ATESSPPAPE PGPCPPTTTT STSKSPTGHR
 EEPPTTPTS ATAPPGGILT LTDSTATFHH VTGSDSSTTT GDSGPRDSAS SSSTSRSRRS
 RRMKAPRPS ITSPAPSRCL RTRSTSCRTF SALPTRAACL RSRRTCS

SEQ ID NO: 9

25 SLLRNRTPP RVLANRVHSP LKRDSISVRL ATQSQSQTLN QSENLPQPPQ VWDLLQWLQV
 VAHQWQTITK VPMEWVPRE IGIAIPNGWG TESSPPAPEP GPCPPTTITS TSKSPTAHLE
 DLQMTTPTSA TAPPGGILTS TDSTATSHHV TGSDSSTTTG DSGLSDSTSS SSTFRSKRLR
 TTMESRPSPI TLPARSRRSR TQTISSRTCS GRLTRAASRR SQRTFS

SEQ ID NO: 10

TLGRLASQSQ SPTLNQSENH QQAPLVWDLV QWLQAVLQW QTITKAPTEW VVPQEIGIAI
 PHGWATESSP PAPEPGPCPP TTTTSTSKSP TGHREEAPT TPTSATAPP GILTSTDSTA
 TSHHVTGSDS STTTGDSGQK DSASSSSTSR SRRSRRMKAP RPSPITLPAR FRYLRTRNTS
 CRTSSAPRTR AACLRSRMS S

SEQ ID NO: 11

30 SHHSPTPPR ASAKKANNQP ERGSTLKR TL EPETDPLKDQ IPAPCLQTLK CVQHRAEMLS
 MRDKVPMEW MPRVIGIAIP PGLRARSQP RPEPGSCPPT TTTCTCVSEQ HQAATPTTDS
 PPPGDILTST DSTVTSHHVT GKDSSTTTGD YDQKPCALKS SISKLRSQR RTARLRLIT
 LPARFRYLRT RRMSSRT

SEQ ID NO: 12

35 KRLQIGRPTR TLGRPRPRKS KKTANQPTLL EGHSTLKTLE QETDPLRDHL PEKCLMLLR
 VRRQAEMLSR RDKVPMEWVM PPVIGIAIPP GQRAESPPPA PEPGYPRTT TTCTCESEQR
 PTATPTTDS PPGDTLTLTA STATFPATG SDSSTTTGDS GRNRCVLKSS TYRSRRSRRQ
 TARLRLITL PARFRSLRIR RMNSHT

SEQ ID NO: 13

ES 2 742 180 T3

SRVLKSQTPR AELARKANSL PERDSTLTTN LEPETGLPQK DHLPELCLLR LKCVQOLAEM
VAMRDKVPRE WVMPPVIGIA IPLGQRATSP PPQPAPGSCR PTTTTCTCGS ARATPATPST
DSPPPGDTLT LTASTATSRQ ETGKGSSTTT GDCAPKACKS ASSTSKLRRS RRLTGRRPYP
TTSPARSRL RTARTSSRT

SEQ ID NO: 14

5 VKPSSRPKRG FSNPLVWVKT QRRLRPETSG KAKTNLVCPT LLHRLPRKTR SLARKDLPAG
QKIRAKAPLP TLEQQHPPLV WDHLSWLKEV AAQWAMQARV PMEWAIPEI GIAIPNGWKT
ESSLEPPEPG SCPATTTTCT NESKDPAEAT TTTNSLDSAP PGDTLTTIDS TATFPRETGN
DSSTTTGASV PKRCALDSL T SRLKRSRST STPPSATTSP VRSRSLRTRT TNCRTSSDRL
PKAPSRRSQR ISTRSRSTGT AR

SEQ ID NO: 15

10 ILVRLATQSQ SQTLNHSDNL PQQPLVDLL QWLQAVAHQW QTITRVPMEW VIPQEIGIAI
PNGWATESSP PAPAAGPCPP TTITSTSKSP ANQEPPTTT TLATAPPGGI LTSTDSTATF
HHVTGKDSST TTGSDPRDS TSSSLTFKSK RSRRTVRRR LPITLPAFR CLLTPSTSSR
TSSARRIRDA SRRSQOTSSW SHSMDTSP

SEQ ID NO: 16

15 TRRTVSSLPL QRRPKLEALP PPAIWDLVRW LEAVARQSTT ARMVPMEWAM PREIGIAIPH
GWTTVSSPEP LGPGICQPTT TTSTNDSTER PPEKATSDS APPGDTLTST ASTVISPLET
GKDSSTITGD SDQRAYGSKS LTFKLKSRRT KTQRRSSPIT LPARFRYLRT RSTSSRT

SEQ ID NO: 17

LNNPTTRPGP GRSVFNASTT FSRKRRRPRP SKAKPLLKRA KTPEKEPLPT LDQAPPLVWD
HLSWLKEVAV QWAMQAKVPT EWAIPREIGI AIPNGWTES LPEPLEPGSC PATTTTCTSG
SKDREPTPT INSLDSAPPG GTLTTTDSTA TSPPETGND S TTTGASDPK RCALDSLTSR
LKKSLSKTPT PPSPTTSPAR SKSLRTRTTS CRTSSDRLQR APSRRSQRIS TRSRSMVTAR

SEQ ID NO: 18

20 TTTFQKERRL GPKRTPSLPP RQTPKLDPAD PSSCKSQHNQ PQVWELIQCL REVAAHWATI
TKVPMEWAMP REIGIAIPRG WGTSSPSPP APGCCPATTT TSTERSKAAP STEATPTPTL
DTAPPGGTTLT LTASTATGAP ETGKDSSTTI GASDPGLSES KSSTSKSKRS RCRTPPPPSP
TTSPPPSKCL RTTTTNSRTS SATGPRDACR PSPRRSLRCR STATRR

SEQ ID NO: 19

25 ASRSRSWLLQ SSVHTRPRKP QRTRRVSRDR IPGRRPRRGS SSPISLDLQQ TYLHPHNSPS
LPQGFPVWFL VRCLQEEALQ WTMLNKVPT E WAMPREIGIA IPNGWATEFS PDPPPGGCCP
ATTTTCTSR S QTPPACTASP GADTLATAPP GGTSTSIAS ATSRPETGSA SSITTGASDP
RDCESNSSTS RSRRSRLIR RPRSPTTSRA RSRSSQTTST SCR TSAATPP RDACRRSPRT
SSRCRSTATR R

SEQ ID NO: 20

30 KTEEPPRRAP NLWQHLKWQR EEAELWATLQ GVPMEWVMPR EIGIAIPNGW ETQSSQRPE
PGSQATTTT STKQLPVEPL KMQMSSMQDT VPPGGTLIST ASTATSPLET GRDLSTTIGE
SDPNLLNSRS SMSKSKKSQR RIKQRPLQTI SPQRFKSLRM MSINSRMSWA RLRKAPCRRS
RRMSMPCRST GTAQCTPTRM EHGSMTVVHS TA

SEQ ID NO: 21

KSLNYLKKTL LHPVIVEEKQ VQLPPKAPNL WQHLTWQREE AELWATLQGV PMEWVMPQEI
GIAIPNGWET QSLPRLQEPG SCQATTTTST KPSQAEQTQT QIPNMLDTAP PGGTLISTDS
TAISLQETGR DSSTTIGGLD RKHSNSRYSM CKLKKSRRT RQRLLLTTL P LQSRYSRIMN
TSCPMFWARP RRGRCHRSPQ MCMPCPSTAT AQCTPTRVEL DSMTEVPSIA

35 SEQ ID NO: 22

ES 2 742 180 T3

TNTILKLRP NKACRYQLHL KAEKKLHRH NLEGAQQVPI LAAHLSWLQE EAVRWQTITR
 APREWVIPQV IGI AIPSGWE TTSLSQPEL GCSPLTGIIS TGLSTLTAPQ VRVLMQPMQD
 TRLPGGTLTS IDSIATSPPE TGKDSSTTTQ ASGRKDSKSK SLTSKSKKLQ HKIQRKQLPT
 ISPAPYRSLR TRTTYHMY

SEQ ID NO: 143

LNNPTTRPGP GRSVFNASTT FSRKRRRPRP SKAKPLLKRA KTPEKEPLPT LDQAPPLVWD
 HLSWLKEVAV QWAMQAKVPT EWAI PREIGI AIPNGWTES LPEPLEPGSC PATTTTCTSG
 SKDREEPTPT INSLDSAPPG GTLTTTDDSTA TSPPETGNDS STTTGASDPK RCALDSLTSR
 5 LKKSLSKTPT PPSPTTSPAR SKSLRTRTTS CRTSSDRLQR APSRRSQRIS TRSRSMVTAR

Secuencias de ácidos nucleicos

SEQ ID NO: 23

10 ATTTTGGTCA GACTGGAGAC GCAGACTCAG TACCTGACCC CCAGCCTCTC GGACAGCCAC
 CAGCAGCCCC CTCTGGTCTG GGAAC TAATA CGATGGCTAC AGGCAGTGGC GCACCAATGG
 CAGACAATAA CGAGGGCGCC GACGGAGTGG GTAATTCCTC GGGAAATTGG CATTGCGATT
 CCACATGGAT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCCG AACCTGGGCC CTGCCCACCT
 ACAACAACCA CCTCTACAAA CAAATTTCCA GCCAATCAGG AGCCTCGAAC GACAATCACT
 ACTTTGGCTA CAGCACCCCT TGGGGGTATT TTGACTTCAA CAGATTCCAC TGCCACTTTT
 CACCACGTGA CTGGCAAAGA CTCATCAACA ACAACTGGGG ATTCCGACCC AAGAGACTCA
 ACTTCAAGCT CTTTAACATT CAAGTCAAAG AGGTCACGCA GAATGACGGT ACGACGACGA
 TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTT CAGG TGTTTACTGA CTCGGAGTAC CAGCTCCCGT
 ACGTCTCGG CTCGGCGCAT CAAGGATGCC TCCC GCCGT CCCAGCAGAC GTCTTCATGG
 TGCCACAGTA TGGATACCTC ACCCTGA

SEQ ID NO: 24

AGCAGTCGCC ACAAGAGCCA GACTCCTCCT CGGGCATCGG CAAGACAGGC CAGCAGCCCC
 CTA AAAAGAG ACTCAATTTT GGTCAGACTG GCGACTCAGA GTCAGTCCCC GATCCACAAC
 CTCTCGGAGA ACCTCCAGCA ACCCCCGCTG CTGTGGGACC TACTACAATG GCTTCAGGCG
 GTGGCGCACC AATGGCAGAC AATAACGAAG GCGCCGACGG AGTGGGTAAT GCCTCAGGAA
 ATTGGCATTG CGATTCCACA TGGCTGGGCG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGCACCT
 GGGCCTTGCC CACCTACAAT AACCACCTCT ACAAGCAAAT CTCCAGTGCT TCAACGGGGG
 CCAGCAACGA CAACCACTAC TTCGGCTACA GCACCCCTG GGGGTATTTT GATTTCAACA
 GATTCCACTG CCACTTTTCA CCACGTGACT GGCAGCGACT CATCAACAAC AATTGGGGAT
 TCCGGCCCAA GAGACTCAAC TTCAA ACTCT TCAACATCCA AGTCAAGGAG GTCACGACGA
 ATGATGGCGT CACAACCATC GCTAATAACC TTACCAGCAC GGTTCAAGTC TTCTCGGACT
 CGGAGTACCA GCTTCCGTAC GTCCTCGGCT CTGCGCACCA GGGCTGCCTC CCTCCGTTCC
 15 CGGCGGACGT GTTCATGA

SEQ ID NO: 25

ATTTCCGGTCA GACTGGCGAC TCAGAGTCAG TCCCAGACCC TCAACCTCTC GGAGAACCAC
 CAGCAGCCCC CACAAGTTTG GGATCTAATA CAATGGCTTC AGGCGGTGGC GCACCAATGG
 CAGACAATAA CGAGGGTGCC GATGGAGTGG GTAATTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
 CCCAATGGCT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCCG AACCTGGGCC CTGCCCACCT
 ACAACAACCA TCTCTACAAG CAAATCTCCA GCCAATCAGG AGCTTCAAAC GACAACCACT
 ACTTTGGCTA CAGCACCCCT TGGGGGTATT TTGACTTTAA CAGATTCCAC TGCCACTTCT
 CACCACGTGA CTGGCAGCGA CTCATTAACA ACAACTGGGG ATTCCGCCCC AAGAACTCA
 GCTTCAAGCT CTTCAACATC CAAGTTAAAG AGGTCACGCA GAACGATGGC ACGACGACTA
 TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTTCAAG TGTTTACGGA CTCGGAGTAT CAGCTCCCGT
 ACGTCTCGG GTCGGCGCAC CAAGGCTGTC TCCC GCCGT TCCAGCGGAC GTCTTCATGG
 20 TCCCTCAGTA TGGATACCTC ACCCTGA

SEQ ID NO: 26

ES 2 742 180 T3

TTGAATCCCC CCAGCAGCCC GACTCCTCCA CGGGTATCGG CAAAAAAGGC AAGCAGCCGG
 CTA AAAAGAA GCTCGTTTT GAAGACGAAA CTGGAGCAGG CGACGGACCC CCTGAGGGAT
 CAACTTCCGG AGCCATGTCT GATGACAGTG AGATGCGTGC AGCAGCTGGC GGAGCTGCAG
 TCGAGGGCGG ACAAGGTGCC GATGGAGTGG GTAATGCCTC GGGTGATTGG CATTGCGATT
 CCACCTGGTC TGAGGGCCAC GTCACGACCA CCAGCACCAG AACCTGGGTC TTGCCACCT
 ACAACAACCA CCTCTACAAG CGACTCGGAG AGAGCCTGCA GTCCAACACC TACAACGGAT
 TCTCCACCCC CTGGGGATAC TTTGACTTCA ACCGCTTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG
 ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACAACTGGG GCATGCGACC CAAAGCCATG CGGGTCAAAA
 TCTTCAACAT CCAGGTCAAG GAGGTACAGA CGTCGAACGG CGAGACAACG GTGGCTAATA
 ACCTTACCAG CACGGTTCAG ATCTTTGCGG ACTCGTCGTA CGAACTGCCG TACGTGA

SEQ ID NO: 27

ACGACCACTT TCCAAAAAGA AAGAAGGCTC GGACCGAAGA GGA CTCCAAG CTTCCACCT
 CGTCAGACGC CGAAGCTGGA CCCAGCGGAT CCCAGCAGCT GCAAATCCCA GCCCAACCAG
 CCTCAAGTTT GGGAGCTGAT ACAATGTCTG CGGGAGGTGG CGGCCCATTTG GGCGACAATA
 ACCAAGGTGC CGATGGAGTG GGCAATGCCT CGGGAGATTG GCATTGCGAT TCCACGTGGA
 TGGGGGACAG AGTCGTACC AAGTCCACCC GAACCTGGGT GCTGCCAGC TACAACAACC
 ACCAGTACCG AGAGATCAAA AGCGGCTCCG TCGACGGAAG CAACGCCAAC GCCTACTTTG
 GATACAGCAC CCCCTGGGGG TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACAGCCAC TGGAGCCCCC
 GAGACTGGCA AAGACTCATC AACAACTACT GGGGCTTCAG ACCCCGGTCC CTCAGAGTCA
 AAATCTTCAA CATTCAAGTC AAAGAGGTCA CGGTGCAGGA CTCCACCACC ACCATCGCCA
 ACAACCTCAC CTCCACCGTC CAAGTGTTTA CGGACGACGA CTACCAGCTG CCCTACGTGC
 TCGGCAACGG GACCGAGGGA TGCCTGCCG CTTCCCTCC GCAGGTCTTT ACGCTGCCG
 5 AGTACGGTTA CGCGACGCTG A

SEQ ID NO: 28

AGCAGTCGCC ACAAGAGCCA GACTCCTCCT CGGGCATTGG CAAGACAGGC CAGCAGCCCC
 CTA AAAAGAG ACTCAATTTT GGTGACTG GCGACTCAGA GTCAGTCCCC GACCCACAAC
 CTCTCGGAGA ACCTCCAGCA ACCCCCGCTG CTGTGGGACC TACTACAATG GCTTCAGGCG
 GTGGCGCACC AATGGCAGAC AATAACGAAG GCGCCGACGG AGTGGGTAAT GCCTCAGGAA
 ATTGGCATTG CGATTCCACA TGGCTGGGCG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGAAGCT
 GGGCCTTGCC CACCTATAAC AACCACTCT ACAAGCAAAT CTCCAGTGCT TCAACGGGGG
 CCAGCAACGA CAACACTAC TTCCGGCTACA GCACCCCTG GGGGTATTTT GATTTCAACA
 GATTCCACTG CCATTTCTCA CCACGTGACT GGCAGCGACT CATCAACAAC AATTGGGGAT
 TCCGGCCCCAA GAGACTCAAC TTCAAGCTCT TCAACATCCA AGTCAAGGAG GTCACGACGA
 ATGATGGCGT CACGACCATC GCTAATAACC TTACCAGCAC GGTTCAGTCT TTCTCGGACT
 CGGAGTACCA GTTGCCGTAC GTCCTCGGCT CTGCGCACCA GGGCTGCCTC CCTCCGTTCC
 10 CGGCGGACGT GTTCATGA

SEQ ID NO: 29

AGCCGTCACC TCAGCGTTCC CCCGACTCCT CCACGGGCAT CGGCAAGAAA GGCCAGCAGC
 CCGCCAGAAA GAGACTCAAT TTCGGTCAGA CTGGCGACTC AGAGTCAGTC CCCGACCCTC
 AACCTCTCGG AGAACCTCCA GCAGCGCCCT CTAGTGTGGG ATCTGGTACA GTGGCTGCAG
 GCGGTGGCGC ACCAATGGCA GACAATAACG AAGGTGCCGA CGGAGTGGGT AATGCCTCAG
 GAAATTGGCA TTGCGATTCC ACATGGCTGG GCGACAGAGT CATTACCACC AGCACCCGAA
 CCTGGGCCCT GCCACCTAC AACAAACCACC TCTACAAGCA AATCTCCAGT GAAACTGCAG
 GTAGTACCAA CGACAACACC TACTTCGGCT ACAGCACCCC CTGGGGGTAT TTTGACTTTA
 ACAGATTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACAACTGGG
 GATTCCGGCC CAAGAAGCTG CGGTTCAAGC TCTTCAACAT CCAGGTCAAG GAGGTACAGA
 CGAATGACGG CGTTACGACC ATCGCTAATA ACCTTACCAG CACGATTAGT GTATTCTCGG
 ACTCGGAATA CCAGCTGCCG TACGTCTCGG GCTCTGCGCA CCAGGGCTGC CTGCCTCCGT
 15 TCCCGGCGGA CGTCTTCATG A

SEQ ID NO: 30

ES 2 742 180 T3

AGCCATCACC CCAGCGTTCT CCAGACTCCT CTACGGGCAT CGGCAAGAAA GGCCAACAGC
 CCGCCAGAAA AAGACTCAAT TTTGGTCAGA CTGGCGACTC AGAGTCAGTT CCAGACCCTC
 AACCTCTCGG AGAACCTCCA GCAGCGCCCT CTGGTGTGGG ACCTAATACA ATGGCTGCAG
 GCGGTGGCGC ACCAATGGCA GACAATAACG AAGGCGCCGA CGGAGTGGGT AGTTCCTCGG
 GAAATTGGCA TTGCGATTCC ACATGGCTGG GCGACAGAGT CATCACCACC AGCACCCGAA
 CCTGGGCCCT GCCCACCTAC AACAACCACC TCTACAAGCA AATCTCCAAC GGGACATCGG
 GAGGAGCCAC CAACGACAAC ACCTACTTCG GCTACAGCAC CCCCTGGGGG TATTTTGACT
 TTAACAGATT CCAGTCCCAC TTTTCACCAC GTGACTGGCA GCGACTCATC AACAACTACT
 GGGGATTCCG GCCCAAGAGA CTCAGCTTCA AGCTCTTCAA CATCCAGGTC AAGGAGGTCA
 CGCAGAATGA AGGCACCAAG ACCATCGCCA ATAACCTCAC CAGCACCATC CAGGTGTTTA
 CGGACTCGGA GTACCAGCTG CCGTACGTTT TCGGCTCTGC CCACCAGGGC TGCCTGCCTC
 CGTTCGCCGGC GGACGTGTTC ATGA

SEQ ID NO: 31

AGCAGTCTCC TCAGGAACCG GACTCCTCCG CGGGTATTGG CAAATCGGGT GCACAGCCCG
 CTAAAAAGAG ACTCAATTTT GGTCTGACTG GCGACACAGA GTCAGTCCCA GACCCTCAAC
 CAATCGGAGA ACCTCCCGCA GCCCCTCAG GTGTGGGATC TCTTACAATG GCTTCAGGTG
 GTGGCGCACC AGTGGCAGAC AATAACGAAG GTGCCGATGG AGTGGGTAGT TCCTCGGGAA
 ATTGGCATTG CGATTCCCAA TGGCTGGGGG ACAGAGTCAT CACCACCAGC ACCCGAACCT
 GGGCCCTGCC CACCTACAAC AATCACCTCT ACAAGCAAAT CTCCAACAGC ACATCTGGAG
 GATCTTCAA TGACAACGCC TACTTCGGCT ACAGCACCCC CTGGGGGTAT TTTGACTTCA
 ACAGATTCCA CTGCCACTTC TCACCACGTG ACTGGCAGCG ACTCATCAAC AACAACTGGG
 GATTCGGGCC TAAGCGACTC AACTTCAAGC TCTTCAACAT TCAGGTCAA GAGGTACGG
 ACAACAATGG AGTCAAGACC ATCGCCAATA ACCTTACCAG CACGGTCCAG GTCTTACCGG
 ACTCAGACTA TCAGTCCCG TACGTGCTCG GGTGGCTCA CGAGGGCTGC CTCCCGCCGT
 TCCCAGCGGA CGTTTTCATG A

5

SEQ ID NO: 32

ACTTTGGGCA GACTGGCGAG TCAGAGTCAG TCCCGACCC TCAACCAATC GGAGAACCAC
 CAGCAGGCC CTCTGGTCTG GGATCTGGTA CAATGGCTGC AGGCGGTGGC GCTCCAATGG
 CAGACAATA CGAAGGCGCC GACGGAGTGG GTAGTTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
 CCACATGGCT GGGCGACAGA GTCATACCA CCAGCACCCG AACCTGGGCC CTGCCACCT
 ACAACAACCA CCTCTACAAG CAAATCTCCA ACGGGACATC GGGAGGAAGC ACCAACGACA
 ACACCTACT CGGCTACAGC ACCCCCTGGG GGTATTTTGA CTTCAACAGA TTCCACTGCC
 ACTTCTCACC ACGTFACTGG CAGCGACTCA TCAACAACAA CTGGGGATTC CGGCCAAAAA
 GACTCAGCTT CAAGCTCTTC AACATCCAGG TCAAGGAGGT CACGCAGAAT GAAGGCACCA
 AGACCATCGC CAATAACCTT ACCAGCACGA TTCAGGTATT TACGGACTCG GAATACCAGC
 TGCCGTACGT CCTCGGCTCC GCGCACCAGG GCTGCCTGCC TCCGTCCCG GCGGATGTCT
 TCATGA

10

SEQ ID NO: 33

AGTCACCACA AGAGCCCGAC TCCTCCTCGG GCATCGGCAA AAAAGGCAAA CAACCAGCCA
 GAAAGAGGCT CAACTTTGAA GAGGACTG GAGCCGGAGA CGGACCCCT GAAGGATCAG
 ATACCAGCGC CATGTCTTCA GACATTGAAA TCGGTGCAGC ACCGGGCGGA AATGCTGTGC
 ATGCGGGACA AGGTCCGAT GGAGTGGGTA ATGCCTCGGG TGATTGGCAT TGCGATTCCA
 CCTGGTCTGA GGGCAAGGTC ACAACAACCT CGACCAGAAC CTGGGTCTTG CCCACCTACA
 ACAACCACTT GTACCTGCGT CTCGGAACAA CATCAAGCAG CAACACCTAC AACGGATTCT
 CCACCCCTG GGGATATTTT GACTTCAACA GATTCCACTG TCACTTCTCA CCACGTGACT
 GGCAAAGACT CATCAACAAC AACTGGGGAC TACGACCAA AGCCATGCGC GTTAAATCT
 TCAATATCCA AGTTAAGGAG GTCACAACGT CGAACGGCGA GACTACGGTC GCTAATAACC
 TTACCAGCAC GGTTCAGATA TTTGCGGACT CGTCGTATGA GCTCCCGTAC GTGA

15

SEQ ID NO: 34

ES 2 742 180 T3

AAAAGACTCC AAATCGGCCG ACCAACCCGG ACTCTGGGAA GGCCCCGGCC AAGAAAAAGC
 AAAAAGACGG CGAACCAGCC GACTCTGCTA GAAGGACACT CGACTTTGAA GACTCTGGAG
 CAGGAGACGG ACCCCCTGAG GGATCATCTT CCGGAGAAAT GTCTCATGAT GCTGAGATGC
 GTGCGGCGCC AGGCGGAAAT GCTGTGAGG CGGGACAAGG TGCCGATGGA GTGGGTAAATG
 CCTCCGSTGA TTGGCATTGC GATTCCACCT GGTGAGAGG CCGAGTCACC ACCACCAGCA
 CCCGAACCTG GGTCTACCC ACGTACAACA ACCACCTGTA CCTGCGAATC GGAACAACGG
 CCAACAGCAA CACCTACAAC GGATTCTCCA CCCCCTGGGG ATACTTTGAC TTTAACCCTG
 TCCACTGCCA CTTTTCCCCA CGCGACTGGC AGCGACTCAT CAACAACAAC TGGGGACTCA
 GGCCGAAATC GATGCGTGT AAAATCTTCA ACATACAGGT CAAGGAGGTC ACGACGTCAA
 ACGGCGAGAC TACGGTTCGCT AATAACCTTA CCAGCACGGT TCAGATCTTT GCGGATTCTGA
 CGTATGAACT CCCATACGTG A

SEQ ID NO: 35

AGCAGAGTCC TCAAGAGCCA GACTCCTCGA GCGGAGTTGG CAAGAAAGGC AAACAGCCTG
 CCAGAAAGAG ACTCAACTTT GACGACGAAC CTGGAGCCGG AGACGGGCCT CCCCAGAAAG
 GACCATCTTC CGGAGCTATG TCTACTGAGA CTGAAATGCG TGCAGCAGCT GGCGGAAATG
 GTGGCGATGC GGGACAAGGT GCCGAGGGAG TGGGTAATGC CTCCGGTGAT TGGCATTGCG
 ATTCCACTTG GTCAGAGAGC CACGTCACCA CCACCTCAAC CCGCACCTGG GTCCTGCCGA
 CCTACAACAA CCACCTGTAC CTGCGGCTCG GCTCGAGCAA CGCCAGCGAC ACCTTCAACG
 GATTCTCCAC CCCCTGGGGA TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACTGCCAC TTCTCGCCAA
 GAGACTGGCA AAGGCTCATC AACAACCACT GGGGACTGCG CCCCAAAAGC ATGCAAGTCC
 GCATCTTCAA CATCCAAGTT AAGGAGGTCA CGACGTCTAA CGGGGAGACG ACCGTATCCA
 5 ACAACCTCAC CAGCACGGTC CAGATCTTTG CCGACAGCAC GTACGAGCTC CCGTACGTGA

SEQ ID NO: 36

GTAAAGCCAT CTTCCAGGCC AAAAAGAGGG TTCTCGAACC CTTTGGTCTG GTGGAAGACT
 CAAAGACGGC TCCGACCGGA GACAAGCGGA AAGGCGAAGA CGAACCTCGT TTGCCCGACA
 CTTCTTACA GACTCCCAAG AAAACAAGA AGCCTCGCAA GGAAAGACCT TCCGGCGGGG
 CAGAAGATCC GGGCGAAGGC ACCTCTTCCA ACGCTGGAGC AGCAGCACCC GCCTCTAGTG
 TGGGATCATC TATCATGGCT GAAGGAGGTG GCGGCCAGT GGGCGATGCA GGCCAGGGTG
 CCGATGGAGT GGGCAATTCC TCCGGAAATT GGCATTGCGA TTCCCAATGG CTGGAAAACG
 GAGTCGTAC TCGAACCACC CGAACCTGGG TCTTGCCCAG CTACAACAAC CACCTGTACA
 AACGAATCCA AGGACCCAGC GGAGGCGACA ACAACAACAA ATTCTTTGGA TTCAGCACCC
 CCTGGGGATA CTTGACTAC AATCGATTCC ACTGCCACTT TTCCCAGCGA GACTGGCAAC
 GACTCATCAA CAACAACCTGG GGCATCCGTC CCAAAGCGAT GCGCTTTAGA CTCTTTAACA
 TCCAGGTFAA AGAGGTACAG GTCCAAGACT TCAACCCAC CATCGGCAAC AACCTCACCA
 GTACGGTCCA GGTCTTTGCG GACAAGGACT ACCAAGTACC GTACGTCTC GGATCGGCTA
 CCGAAGGCAC CTTCCCGCCG TTCCCAGCGG ATATCTACAC GATCCCGCAG TACGGGTACT
 10 GCACGCTAA

SEQ ID NO: 37

ATTTTGGTCA GACTGGCGAC ACAGAGTCAG TCCCAGACCC TCAACCACTC GGACAACCTC
 CCGCAGCCCC CTCTGGTGTG GGATCTACTA CAATGGCTTC AGGCGGTGGC GCACCAATGG
 CAGACAATAA CGAGGGTGCC GATGGAGTGG GTAATTCCTC AGGAAATTGG CATTGCGATT
 CCCAATGGCT GGGCGACAGA GTCATCACCA CCAGCACCCG CACCTGGGCC CTGCCCACCT
 ACAACAATCA CCTCTACAAG CAAATCTCCA GCCAATCAGG AGCCACCAAC GACAACCACT
 ACTTTGGCTA CAGCACCCCC TGGGGGTATT TTGACTTCAA CAGATTCCAC TGCCACTTTT
 CACCACGTGA CTGGCAAAGA CTCATCAACA ACAACTGGGG ATTCCGACCC AAGAGACTCA
 ACTTCAAGCT CTTTAACATT CAAGTCAAAG AGGTCACGCA GAATGACGGT ACGACGACGA
 TTGCCAATAA CCTTACCAGC ACGGTTTACG TGTTTACTGA CTCCGAGTAC CAGCTCCCGT
 ACGTCTCTCG CTCGGCGCAT CAGGGATGCC TCCCAGCGTT CCCAGCAGAC GTCTTTCATGG
 15 TCCCACAGTA TGGATACCTC ACCCTGA

SEQ ID NO: 38

ES 2 742 180 T3

ACGAGGAGGA CCGTGAGTTC GCTGCCGCTG CAGCGGAGAC CGAAACTGGA AGCGCTCCCC
 CCACCGCAA TTTGGGACCT GGTACGATGG CTGGAGGCGG TAGCGCGCCA ATCGACGACG
 GCTCGTATGG TGCCGATGGA GTGGGCAATG CCTCGGGAGA TTGGCATTGC GATTCCACAT
 GGCTGGACAA CTGTGTCATC ACCCGAACCA CTCGGACCTG GAATCTGCCA ACCTACAACA
 ACCACATCTA CAAACGACTC AACGGAACGA CCTCCGGAGA CCAAAGCTAC TTCGGATTCA
 GCACCCCTG GGGATACTTT GACTTCAACC GCTTCCACTG TCATTTCTCC CCTCGAGACT
 GGCAAAGACT CATCAACAAT AACTGGGGAC TCCGACCAA GAGCCTACGG TTCAAATCT
 TTAACATTCA AGTTAAAGAA GTCACGACGC AAGACTCAAC GAAGATCATC TCCAATAACC
 TTACCAGCAC GGTTCAGGTA TTTGCGGACA CGGAGTACCA GCTCCCGTAC GTGA

SEQ ID NO: 39

TTGAACAACC CGACAACACG GCCGGGACCG GGGAGAAGCG TCCCGAACGC GTCGACGACT
 TTTTCCCGAA AAAGAAGAAG GCCAAGACCG AGCAAGGCAA AGCCCCTGCT CAAACGGGCG
 AAGACCCCGG AGAAGGAACC TCTTCCAACG CTGGATCAAG CGCCCCCTCT AGTGTGGGAT
 CATCTGTCAAT GGCTGAAGGA GGTGGCGGTC CAATGGGCGA TGCAGGCCAA GGTGCCGACG
 GAGTGGGCAA TTCCTCGGGA AATTGGCATT GCGATTCCCA ATGGCTGGAC AACGGAGTCG
 TTACCCGAAC CACTCGAACC TGGGTCTGTC CCAGCTACAA CAACCACTTG TACAAGCGGA
 TCCAAGGACC GGGAGGAACC GACCCCAACA ATAAATTCTT TGGATTCAGC ACCCCCTGGG
 GGTACTTTGA CTACAACCGA TTCCACTGCC ACTTCTCCCC CCGAGACTGG CAACGACTCA
 TCAACAACAA CTGGGGCATC CGACCCAAAG CGATGCGCTT TAGACTCTTT AACATCCAGG
 TTAAAGAAGT CACTGTCCAA GACTCCAACA CCACCATCGC CAACAACCTC ACCAGCACGG
 TCCAAGTCTT TGCGGACAAG GACTACCAGC TGCCGTACGT CCTCGGATCG GCTACAGAGG
 GCACCTFCCC GCCGTTCCCA GCGGATATCT ACACGATCCC GCAGTATGGT TACTGCACGC
 TAA

5

SEQ ID NO: 40

ACGACCACTT TCCAAAAAGA AAGAAGGCTC GGACCGAAGA GGACTCCAAG CCTTCCACCT
 CGTCAGACGC CGAAGCTGGA CCCAGCGGAT CCCAGCAGCT GCAAATCCCA GCACAACCAG
 CCTCAAGTTT GGGAGCTGAT ACAATGTCTG CGGGAGGIGG CGGCCATTG GGCACATA
 ACCAAGGTGC CGATGAGTG GGAATGCCT CCGGAGATTG GCATTGCGAT TCCACGAGG
 TGGGGACAG AGTCGTACC AAGTCCACC GCACCTGGGT GCTGCCCAGC TACAACAACC
 ACCAGTACCG AGAGATCAAA AGCGGCTCCG TCGACGGAAG CAACGCCAAC GCCTACTTTG
 GATACAGCAC CCCCTGGGGG TACTTTGACT TTAACCGCTT CCACAGCCAC TGGAGCCCC
 GAGACTGGCA AAGACTCATC AACAACTATT GGGGCTTCAG ACCCCGGTCT CTCAGAGTCA
 AAATCTTCAA CATCCAAGTC AAAGAGGTCA CGGTGCAGGA CTCCACCACC ACCATCGCCA
 ACAACCTCAC CTCCACCGTC CAAGTGTTTA CGGACGACGA C

10

SEQ ID NO: 41

GCGTCGAGGA GCCGGAGCTG GCTCCTCCAG TCAAGCGTCC ACACTCGCCC GAGAAAACCC
 CAGAGAACCA GAAGGGTCAG CCGCGACCGG ATCCCCGGAC GCCGGCCAAG AAGAGGCTCG
 AGTTCTCCGA TCAGCCTGGA TCTTCAGCAG ACTTACCTGC ATCTCACAA CAGTCCCAGC
 CTCCCGCAGG GGTTCCCGGT GTGGTTCCCTG GTACGATGTC TGCAGGAGGA GCGCTCCAG
 TGGACGATGC TCAACAAGGT GCCGACGGAG TGGGCAATGC CTCGGGAGAT TGGCATTGCG
 ATTCCAAATG GCTGGGCAAC CGAGTTCTCA CCCGATCCAC CCGGACCTGG GTGCTGCCCA
 GCTACAACAA CCACCTGTAC AAGCAGATCT CAGACGCCTC CGGCGTGCAC AGCCTCCCCG
 GGAGCCGATA CTTTGGCTAC AGCACCCCTT GGGGGTACTT CGACTTCAAT CGCTTCCACT
 GCCACTTCTC GCCCAGAGAC TGGCAGCGCC TCGTCAATAA CCACTGGGGC TTCCGACCCA
 AGAGACTGCG AGTCAAATC TTCAACATCC AGGTCAAGGA GGTACGACT ACTGATTGGA
 CGACCACGGT CTCCAACAAC CTCACGAGCA CGGTCCAGGT CTTACAGAC GACGAGTACC
 AGCTGCCGTA CGTCTGCGGC AACGCCACCG AGGGATGCCT GCCGCCGTTT CCCCAGGACG
 TCTTACGCT GCCGAGTAC GGCTACGCGA CGCTGA

15

SEQ ID NO: 42

AAGACGGAGG AGCCACCGCG GAGGGCACCG AACCTGTGGC AGCATCTGAA ATGGCAGAGG
 GAGGAGGCGG AGCTATGGGC GACTCTTCAG GGGGTGCCGA TGGAGTGGGT AATGCCTCGG
 GAAATGGGCA TTGCGATTCC CAATGGATGG GAAACACAGT CATCACAAAG ACCACCAGAA
 CCTGGGTCCCT GCCAAGCTAC AACAAACCACA TCTACAAAGC AATTACCAGT GGAACCTCTC
 AAGATGCAAA TGTCAGTAT GCAGGATACA GTACCCCTG GGGGTACTTT GATTTCAACC
 GCTTCCACTG CCACTTCTCC CCTAGAGACT GGCAGAGACT TATCAACAAC CATTGGGGAA

TCCGACCCAA ATCTCTTAAA TTCAAGATCT TCAATGTCCA AGTCAAAGAA GTCACAACGC
 AGGATCAAAC AAAGACCATT GCAAACAATC TCACCTCAAC GATTCAAGTC TTTACGGATG
 ATGAGCATCA ACTCCCGTAT GTCCTGGGCT CGGCTACGGA AGGCACCATG CCGCCGTTCC
 CGTCGGATGT CTATGCCCTG CCGCAGTACG GGTACTGCAC AATGCACACC AACCAGAATG
 GAGCACGGT CAATGACCGT AGTGCATTCT ACTGCTTAG

SEQ ID NO: 43

AAAAGCCTAA ATTATCTGAA GAAAACTCTC CTTCACCCAG TAATAGTGGA GGAGAAGCAA
 GTGCAGCTGC CACCGAAGGC TCCGAACCTG TGGCAGCACC TAACATGGCA GAGGGAGGAA
 GCGGAGCTAT GGGCGACTCT GCAGGGGGTG CCGATGGAGT GGGTAATGCC TCAGGAAATT
 GGCATTGCGA TTCCAATGG CTGGGAGACA CAGTCATTAC CAAGACTACA AGAACCTGGG
 TCCTGCCAAG CTACAACAAC CACATCTACA AAGCCATCAC AAGCGGAACA AACCCAGACA
 CAAATACCCA ATATGCTGGA TACAGCACCC CCTGGGGGTA CTTTGATTTC AACAGATTCC
 ACTGCCATTT CTCTCCAAGA GACTGGCAGA GACTCATCAA CAACCATTGG GGGATTAGAC
 CGAAAGCACT CAAATTC AATG ATATTCAATG TGCAAGTTAA AGAAGTCACG ACGCAAGACC
 AGACAAAAGC TATTGCTAAC AACCTTACCT CTACAATCCA GATATTCACG GATAATGAAC
 ACCAGCTGCC CTATGTTCTG GGCTCGGCCA CGGAGGGGAC GATGCCACCG TTCCCCTCAG
 ATGTGTATGC CTTGCCCCAG TACGGCTACT GCACAATGCA CACCAACCAG AGTGGAGCTA
 GATTCAATGA CAGAAGTGCC TTCTATTGCT TAG

5

SEQ ID NO: 44

ACGAATACTA TCCTAAAGCT AAAAAGGCCA AACAAGGCTT GCAGATACCA GCTCCACCTA
 AAGGCGGAGA AGAAGAAGCT ACATCGTCAC AATCTGGAGG GAGCCCAGCA GGTTCGATA
 CTAGCGGCAC ATCTGTCATG GCTACAGGAG GAGGCGGTCC GATGGCAGAC GATAACCAGG
 GCGCCGAGGG AGTGGGTAAT TCCTCAGGTG ATTGGCATTG CGATACCAAG TGGATGGGAG
 ACCACGTCAT TACAAAGTCA ACCAGAACTT GGGTGCTCCC CACTTACGGG AATCATCTCT
 ACGGGCCTAT CAACTTTGAC GGCACCACAG GTTCGGGTGC TAATGCAGCC TATGCAGGAT
 ACAAGACTCC CTGGGGGTAC TTTGACTTCA ATCGATTCCA TTGCCACTTC TCCCCCGAG
 ACTGGCAAAG ACTCATCAAC AACCACACAG GCATCAGGCC GAAAGGACTC AAAATCAAAG
 TCTTTAACGT CCAAGTCAAA GAAGTTACAA CACAAGATTC AACGAAAACA ATTGCCAACA
 ATCTCACCAG CACCGTACAG ATCTTTGCGG ACGAGAACTA CGACTTACCA TATGTATTAG

10

SEQ ID NO: 142

TTGAACAACC CGACAACACG GCCGGGACCG GGGAGAAGCG TCCCGAACGC GTCGACGACT
 TTTTCCCGAA AAAGAAGAAG GCCAAGACCG AGCAAGGCAA AGCCCCTGCT CAAACGGGCG
 AAGACCCCGG AGAAGGAACC TCTTCCAACG CTGGATCAAG CGCCCCCTCT AGTGTGGGAT
 CATCTGTCAT GGCTGAAGGA GGTGGCGGTC CAATGGGCGA TGCAGGCCAA GGTGCCGACG
 GAGTGGGCAA TTCCTCGGGA AATTGGCATT GCGATTCCCA ATGGCTGGAC AACGGAGTCG
 TTACCCGAAC CACTCGAACC TGGGTCTGTC CCAGCTACAA CAACCCTTGG TACAAGCGGA
 TCCAAGGACC GGGAGGAACC GACCCCAACA ATAAATTCTT TGGATTGAGC ACCCCCTGGG
 GGTACTTTGA CTACAACCGA TTCCACTGCC ACTTCTCCCC CCGAGACTGG CAACGACTCA
 TCAACAACAA CTGGGGCATC CGACCCAAAG CGATGCGCTT TAGACTCTTT AACATCCAGG
 TTAAAGAAGT CACTGTCCAA GACTCCAACA CCACCATCGC CAACAACCTC ACCAGCACGG
 TCCAAGTCTT TGCGGACAAG GACTACCAGC TGCCGTACGT CCTCGGATCG GCTACAGAGG
 GCACCTTCCC GCCGTTCCCA GCGGATATCT ACACGATCCC GCAGTATGGT TACTGCACGC
 TAA

15 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos ejemplifican la invención para AAV, especialmente para AAV2. Debido a las similitudes generales dentro de las estructuras de virus adeno-asociados y otros parvovirus, la invención se puede transferir fácilmente a otros parvovirus que codifican 3 proteínas de la cápside viral.

20

1. Métodos generales

1.1. Producción de (partículas de tipo) AAV en células de insecto

25 Para la producción de partículas de AAV en células Sf9 (cultivadas en Graces (JHR Bioscience, USA)/ 10 % de FCS), se transfectaron células con el vector plásmido pVL_VP1_MOD4, pVL_VP2 o pVL_VP3, derivados del vector de transferencia de baculovirus basado en el promotor de polihedrina pVL1393 (BD Bioscience, San Jose, CA, EE.UU.) que alojaba un marco de lectura abierto modificado de VP1 de AAV (la clonación de pVL_VP1_MOD4, pVL_VP2 y pVL_VP3 se describe en el Ejemplo 9)

La transfección se realizó usando el kit de transfección BaculoGold™ según el manual del fabricante (BD Bioscience, San Jose, CA, EE.UU.). Tras la transfección, las células se incubaron a 27 °C. 5 días después de la transfección, se usó el sobrenadante para la separación de clones individuales mediante un ensayo de dilución de punto final (EPDA). Para este fin, se cultivaron células Sf9 en placas de 96 pocillos (2x10⁴ células/pocillo) y se infectaron con diluciones sucesivas del sobrenadante de transfección. 7 días después de la incubación a 27 °C, el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos (placa maestra) y se guardó a 2-8 °C. Las células de EPDA se lisan con hidróxido sódico, se neutralizan con acetato sódico y se tratan con proteinasa K. Tras una inmunodetección con el kit DIG-DNA wash and Block Buffer (Roche, Mannheim, Alemania), se pudieron detectar clones individuales.

Para amplificar los clones individuales, se usó el pocillo correspondiente de la placa maestra para infectar células Sf9. La amplificación del baculovirus recombinante se realizó mediante varios pases. Cada pase se incubó durante 3 días a 27 °C antes del uso del sobrenadante para infectar células para el siguiente pase. En el primer pase, se infectaron 1,2x10⁵ células Sf9 (12 placas de pocillos) con 50 µl del sobrenadante del pocillo correspondiente de la placa maestra. Se usó el sobrenadante para infectar 2x10⁶ Sf9 (matraz T25) (pase 1B). Para el pase, se infectaron 2,2x10⁷ Sf9 (matrazes T175) con 1 ml de sobrenadante del pase 1B.

Se analizó el título de virus del sobrenadante de pase 2 (P2) mediante un ensayo de dilución de punto final. Para producir AAV, se infectaron 1x10⁶/pocillo de Sf9 (placas de 6 pocillos) con sobrenadante de P2 con una multiplicidad de infección (MOI) de 1. Los cultivos se incubaron a 27 °C durante 2-3 días. Se recogieron las células y se rompieron por un proceso de congelación y descongelación y se analizaron para la producción de AAV. Se analizó el título de AAV2 usando un kit de ELISA de valoración de AAV2 comercialmente disponible (Progen, Heidelberg, Alemania) según el manual del fabricante.

1.2. Producción de (partículas de tipo) AAV en células de mamífero

1.2.1. Plásmidos

• Plásmido auxiliar Ad

Se usó un plásmido auxiliar Ad que codifica las proteínas adenovirales E2, E4 y VAI-VAII para la fabricación de AAV en células 293 o 293-T. El plásmido auxiliar pUCAdE2/E4-VAI-VAII se construyó subclonando el fragmento de restricción BamHI que codifica el adenovirus (Ad) E2 y E4-ORF6 a partir de pAdEasy-1 (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) en el sitio BamHI de pUC19 (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). El plásmido resultante se denomina pUCAdE2/E4. Se amplificó el fragmento VAI-VAII de pAdVantage™ (Promega, Mannheim, Alemania) por PCR usando los cebadores

XbaI-VAI-780-3': 5'-TCT AGA GGG CAC TCT TCC GTG GTC TGG TGG-3' (SEQ ID NO: 59), y
XbaI-VAII-1200-5': 5'-TCT AGA GCA AAA AAG GGG CTC GTC CCT GTT TCC-3' (SEQ ID NO: 60)

clonados en pTOPO (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) y luego se subclonaron en el sitio XbaI de pUCAdE2/E4. Este plásmido se denominó pUCAdV.

• Plásmidos que codifican AAV

La construcción de pUCAV2 se describe en detalle en el documento de patente US 6.846.665. El plásmido pTAV2.0 se describe en (Heilbronn et al., 1990), pVP3 se describe en (Warrington et al., 2004). Plásmidos adicionales que codifican la proteína viral de AAV se describen dentro de los ejemplos respectivos.

1.2.2. Transfección para la producción de virus a gran escala

Se sembraron células 293-T (ATCC, Manassas, EE.UU.) (7,5 x 10⁶/placa) en placas de 15 cm (es decir, placa con un diámetro de 15 cm) 24 h antes de la transfección (cultivadas en DMEM/10 % de FCS). Las células se transfectaron por precipitación con fosfato de calcio como se describe en el documento de patente US 2004/0053410.

En caso de transcripción dependiente del promotor de AAV p40, se realizó una co-transfección con un plásmido adenoviral auxiliar. Para la co-transfección del plásmido que codifica AAV y pUCAdV, se eligió una relación molar de los plásmidos de 1:1. Para transfección de una placa de cultivo con células 293-T, se usó el protocolo de transfección con fosfato de calcio como se ha descrito anteriormente, se usaron 12 µg de plásmido que codifica Cap de AAV (pUCAV2, pTAV2.0 y pVP3, respectivamente) y 24 µg de pUCAdV. En caso de transcripción independiente de p40, las células se transfectaron con los plásmidos respectivos que codifican VP1, VP2 y/o VP3 de AAV. Para la transfección de una placa de cultivo de células 293-T, se usó el protocolo de transfección con fosfato de calcio como se desvela en el documento de patente US 2004/0053410, se mezclaron 36 µg de ADN total en 875 µl de CaCl₂ 270 mM. En resumen, se añadieron a la mezcla 875 µl de 2x BBS (BES 50 mM (ácido N,N-bis-(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico) (pH 6,95), NaCl 280 mM y Na₂HPO₄ 1,5 mM) y la solución resultante se mezcló

cuidadosamente pipeteando. La solución se incubó durante 20 min a temperatura ambiente (TA) y luego se añadió gota a gota a la placa de cultivo celular. Después de 18 h de incubación de células en una atmósfera humidificada a 35 °C y 3 % de CO₂, se cambió el medio en un DMEM sin suero (Invitrogen Carlsbad, EE.UU.) y las células se cultivaron durante 3 d adicionales a 37 °C, 5 % de CO₂, en una atmósfera humidificada.

5 Se recogieron células 293-T con un elevador de células, se transfirieron a tubos de plástico de 50 ml (Falcon) y se centrifugaron a 3000 g, 4 °C durante 10 min. El sedimento de células se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 8,5) por placa de 15 cm y se sometió a tres rondas de ciclos de congelación y descongelación (nitrógeno líquido/37 °C). Se clasificó el lisado celular por dos etapas de centrifugación (3700 g, 4 °C, 20 min) y se usó el sobrenadante que contenía AAV para más purificación. Alternativamente, las placas completas se sometieron a ciclos de congelación y descongelación (-50 °C/TA). Se recogió el sobrenadante restante y se purificó adicionalmente como se describen en 1.3.

1.2.3. Transfección a pequeña escala y preparación de sobrenadantes de virus

15 Se sembraron células (5 x 10⁵/placa) en placas de 6 cm 24 h antes de la transfección. Se transfectaron células 293-T por precipitación con fosfato de calcio como se describe en el documento de patente US 2004/0053410. Para las células HeLa y COS-1, las transfecciones se realizaron usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) según el manual del fabricante. En caso de la transcripción dependiente del promotor p40 del gen cap (pTAV2.0, sus derivados y pVP3), las células se infectaron con adenovirus tipo 5 (Ad5) (MOI=10). Después de la incubación adicional durante 24-48 h, las células se recogieron en el medio y se lisaron por tres ciclos de congelación-descongelación (-80 °C y 37 °C). Los lisados se incubaron a 56 °C durante 30 min para inactivar Ad5. Se retiró el residuo celular por centrifugación a 10000 g durante 5 min.

1.2.4. Cultivo celular

Se mantuvieron células HeLa y 293-T a 37 °C y 5 % de CO₂ en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y L-glutamina 2 mM.

1.3. Purificación

1.3.1 Filtración de flujo cruzado tangencial (TFF) y tratamiento con benzonasa

35 Después de la recogida, el medio de cultivo celular clarificado se concentró adicionalmente usando una unidad de filtración de flujo cruzado tangencial (sistema de flujo cruzado de mesa Sartoflow Slice 200, Sartorius Biotech GmbH, Göttingen, Alemania) usando una membrana de corte de 100 kDa (SARTOCON Slice 200). El concentrado de TFF resultante se reunió con el sobrenadante (obtenido como se describe en 1.2) y se trató inmediatamente con 100 U/ml de benzonasa (Merck, Darmstadt, Alemania) a 37 °C durante 2 h. Después del tratamiento con benzonasa, se clarificó el lisado celular por centrifugación a 3700 g, 4 °C durante 20 min. Se purificó el sobrenadante clarificado usando cromatografía de exclusión por tamaño (sistema ÄKTA explorer, GE Healthcare, Munich, Alemania).

1.3.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

45 Se separó el sobrenadante clarificado a través de una columna de cromatografía XK 50 rellena Superdex 200 (calidad preparativa) (250 mm de altura y 50 mm de diámetro; GE Healthcare, Munich, Alemania). Se recogieron fracciones de SEC (5 ml cada una) y se determinó el título de cápsides usando el ELISA de A20 específico de cápsides de AAV2 (Progen, Heidelberg, Alemania, Cat. N°: PRATV). Se reunieron las fracciones de SEC que contenían partículas de AAV2 y se purificaron adicionalmente usando ultracentrifugación de densidad de iodixanol o sacarosa.

(i) Purificación de partículas de AAV por centrifugación en gradiente de densidad usando iodixanol

55 Se transfirió el conjunto de SEC que contenía el virus a tubos de ultracentrifugación Quickseal (26 x 77 mm, Beckman Coulter, Marsella, Francia). Se dispusieron en capas soluciones de iodixanol (compradas de Sigma, Deisenhofen, Alemania) de diferentes concentraciones debajo del lisado que contenía el virus. Por esto se creó un gradiente de iodixanol compuesto por 6 ml de 60 % en el fondo, 5 ml de 40 %, 6 ml de 25 % y 9 ml de 15 % de iodixanol con la solución de virus encima. Se centrifugó el gradiente en una ultracentrífuga a 416000 g durante 1 h a 18 °C. Entonces se extrajo el 40 % de fase que contenía las partículas de AAV con una cánula por punción del tubo por debajo del 40 % de fase y dejando que la solución goteara en un tubo de recogida hasta que se alcanzó el 25 % de fase.

(ii) Análisis de gradiente de densidad de sacarosa

65 Se sembraron 1,5 x 10⁶ células en placas de 10 cm 24 h antes de la transfección. Se recogieron 48 h después de la transfección y se lisaron en 300 µl de PBS-MK (solución salina tamponada con fosfato: Na₂HPO₄ 18,4 mM, KH₂PO₄

10,9 mM, NaCl 125 mM complementado con MgCl₂ 1 mM, KCl 2,5 mM) durante cinco ciclos de congelación-descongelación (-80 °C y 37 °C). Después del tratamiento con 50 U/ml de benzonasa (Sigma, Deisenhofen, Alemania) durante 30 min a 37 °C y centrifugación a 3700 g durante 20 min, se cargó el sobrenadante sobre un gradiente de 11 ml de 5-30 % o 10-30 % de sacarosa (sacarosa en PBS-MK, EDTA 10 mM, que contenía una tableta de cOplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor (Roche, Mannheim, Alemania)) en tubos de centrifugadora de polialómero (14 por 89 mm; Beckman Coulter, Marsella, Francia). Después de la centrifugación a 160000 g durante 2 h a 4 °C (rotor SW41; Beckman), se recogieron fracciones de 500 µl del fondo de los tubos. Como referencia se analizaron cápsides de AAV2 vacías (60 S) en un gradiente separado. Para ensayo de inmunotransferencia puntual, se transfirieron 50 µl de alícuotas desnaturalizadas por calor (99 °C durante 10 min) o no desnaturalizadas de las fracciones a membranas de nitrocelulosa Protran (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) usando un sistema de transferencia a vacío. Las membranas se bloquearon durante 1 h en PBS que contenía 10 % de leche en polvo desnatada y luego se incubaron durante 1 h con anticuerpos monoclonales B1 (Progen, Heidelberg, Alemania, Cat. N°: 65158) para detectar las proteínas de la cápside desnaturalizadas o A20 para detectar cápsides no desnaturalizadas. Se aplicaron los anticuerpos B1 y A20 en diluciones 1:10. Las membranas se lavaron varias veces con PBS y se incubaron durante 1 h con un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa (dilución 1:5000) (Dianova, Hamburgo, Alemania). Entonces, se lavaron otra vez las membranas y se visualizó la reacción del anticuerpo usando un kit de detección de quimioluminiscencia potenciada (Amersham, Braunschweig, Alemania). Para el análisis de transferencia Western, se procesaron 15 µl por fracción para SDS-PAGE y luego se sondaron con anticuerpos monoclonales A69 (Progen, Heidelberg, Alemania, Cat. N°: 65157) o B1.

(iii) Purificación de partículas de AAV por cromatografía

Purificación de wtVP3[#] vacía y AAVLPs* modificadas

Los índices # y * se refieren a ligeras diferencias en el protocolo de purificación entre wtAAV[#] y AAVLPs* modificadas. Los componentes de tampón están marcados correspondientemente.

Cromatografía de intercambio catiónico (sistema AKTA explorer)

Se obtuvo lisado total que contenía wtVP3[#] vacía y AAVLPs* modificadas realizando tres ciclos de congelación-descongelación (-54 °C/37 °C). Se clarificó el lisado total por centrifugación a 4100 rpm, 4 °C, 20 min (MULTIFUGE L-R; Heraeus, Hanau, Alemania). Se ajustó el pH del sobrenadante clarificado resultante a 6. Además, se redujo la conductividad de la sal hasta aproximadamente 10 mS/cm añadiendo agua estéril.

Se rellenó una columna de cromatografía Fractogel EMD SO₃⁻ (M) (100 mm de altura; 15 mm de diámetro, XK16, GE Healthcare, Múnich, Alemania) y se equilibró usando 5 VC de tampón de electroforesis que consistía en NaCl 80 mM, 2 % de sacarosa, HEPES 50 mM (pH 6,0), MgCl₂ 2,5 mM.

Después del equilibrado, se separó el sobrenadante clarificado a través de la columna de cromatografía rellena Fractogel EMD SO₃⁻ (M) (caudal 10 ml/min). Después de la separación, se lavó la columna usando 5 VC del tampón de electroforesis mencionado anteriormente. Las partículas unidas (wtVP3 o AAVLPs modificadas) fueron eficazmente diluidas a una concentración de cloruro sódico de 350 mM (pico 1=45 ml).

Intercambio de tampón (sistema AKTA explorer)

Para ajustar el pH y la concentración de sales de las proteínas eluidas (pico 1) para cromatografía de intercambio aniónico sucesiva, se realizó intercambio de tampón usando una columna de cromatografía rellena Sephadex G25 (500 mm de altura; 15 mm de diámetro, XK26, GE Healthcare, Múnich, Alemania) (caudal 10 ml/min). Después del equilibrado de la columna usando 3 VC de tampón de electroforesis SOURCE 15Q que consistía en Tris 25 mM (pH 8,2), NaCl 150 mM[#]/NaCl 100 mM*, MgCl₂ 2,5 mM, se separó el pico 1 a través de la columna. Se recogió la fracción de proteína (≈120 ml).

Cromatografía de intercambio aniónico (sistema AKTA explorer)

Se equilibró una columna de cromatografía SOURCE 15Q (80 mm de altura; 15 mm de diámetro, XK16, GE Healthcare, Múnich, Alemania) usando 5 VC de tampón de electroforesis SOURCE 15Q que consistía en Tris 25 mM (pH 8,2), NaCl 150 mM[#]/NaCl 100 mM*, MgCl₂ 2,5 mM. Después del equilibrado, se cargó la fracción de proteína obtenida después del intercambio de tampón (aproximadamente 120 ml) y se separó a través de la columna de cromatografía (caudal 10 ml/min). Se recogió el flujo continuo que contenía 90 % de las partículas (aproximadamente 120 ml).

Concentración de partículas usando dispositivos de filtro centrífugo

Se concentró el flujo continuo que contenía wtVP3[#] o AAVLPs* modificadas usando dispositivos de filtro centrífugo Centricon Plus-70 (corte 100 kDa) (Millipore). La concentración se llevó a cabo usando un rotor de cubos oscilantes

(MULTIFUGE L-R; Heraeus, Hanau, Alemania) a 3500 g, 20 °C durante 15 min. El concentrado resultante (aproximadamente 45 ml) se separó inmediatamente a través de una cromatografía de exclusión por tamaño.

Cromatografía de exclusión por tamaño (sistema ÄKTA explorer)

Se rellenó una columna de cromatografía Superdex 200 (calidad preparativa) (500 mm de altura; 50 mm de diámetro, XK50, GE Healthcare, Múnich, Alemania) y se equilibró usando 2 VC de tampón de electroforesis que consistía en NaCl 200 mM, 2 % de sacarosa, HEPES 50 mM (pH 6,0), MgCl₂ 2,5 mM. Se separó el concentrado mencionado anteriormente (aproximadamente 45 ml) a través de la columna (caudal 10 ml/min). Eluyeron primero las partículas (fracción de SEC N° 1-13; cada una 5 ml). Se reunieron las fracciones de SEC con una pureza de partículas superior a 95 %, se esterilización por filtración (0,2 µm) (Minisart; Sartoriusstedim) y se guardaron a -84 °C.

1.4. Análisis de la expresión de proteínas por transferencia Western

Se procesaron porciones idénticas de células recogidas o cantidades idénticas de partículas purificadas para SDS-PAGE. La expresión de proteínas se analizó por ensayo de transferencia Western usando anticuerpos monoclonales A69, B1 (Progen, Heidelberg, Alemania), anti-AU1 (Covance, Emeryville, EE.UU.), anti-GFP (clon B-2; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.) o anticuerpo policlonal anti-AAP (véase 1.7.) como se describe previamente (Wistuba et al., 1995). Variaciones de los protocolos se indican dentro de la descripción de los ejemplos respectivos.

1.5. Análisis del título

Se determinaron los títulos de cápsides usando un kit de ELISA de valoración de AAV2 comercialmente disponible (Progen, Heidelberg, Alemania Cat. N°: PRATV) o el kit de ELISA de valoración de AAV1 respectivo (Progen, Heidelberg, Alemania Cat. N°: PRAAV1) según el manual del fabricante.

1.6. Análisis de inmunofluorescencia

Para el análisis de inmunofluorescencia, se cultivaron células HeLa durante 24 h sobre cubreobjetos, se transfectaron y en el caso de la transcripción dependiente del promotor p40 del gen cap (pTAV2.0 y pVP3) se infectaron con Ad5 (MOI=4). Después de 20-48 h, las células se fijaron con 100 % de metanol (10 min, -20 °C) y se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato: Na₂HPO₄ 18,4 mM, KH₂PO₄ 10,9 mM, NaCl 125 mM). Se realizó la incubación con anticuerpos primarios durante 1 h a TA o durante la noche a 4 °C. Como anticuerpos primarios se usaron sobrenadantes de hibridoma A20 o A69 para detectar cápsides ensambladas o VP2, respectivamente. Se usaron A20 y A69 sin diluir (Progen, Heidelberg, Alemania). Para la detección de cápsides sin ensamblar, se usó un suero policlonal de conejo en una dilución 1:500 para marcar las tres proteínas VP libres. Se lavaron tres veces los cubreobjetos con PBS y a partir de aquí se incubaron con anticuerpos secundarios apropiados (anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Cy 3 en dilución 1:400 o anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con FITC 1:150 comprados de Dianova, Hamburgo, Alemania o Molecular Probes, Leiden, Los Países Bajos) durante 1 h a TA. Se lavaron otra vez los cubreobjetos, se sumergieron en 100 % de etanol y se incorporaron en medio de montaje Permafluor (Beckman Coulter, Marsella, Francia). Se obtuvieron imágenes confocales (secciones de 0,3 µm) con un microscopio láser de barrido Leica TCS SP2 y se procesaron adicionalmente usando el software Adobe Photoshop CS. Las variaciones de los protocolos se indican dentro de la descripción de los ejemplos respectivos.

Para visualizar la expresión de GFP, se fijaron células con 2 % de paraformaldehído durante 15 min, se extinguieron dos veces con NH₄Cl 50 mM durante 5 min y se permeabilizaron con 0,2 % de Triton X-100 durante 10 min.

1.7. Preparación de anticuerpo policlonal

Se generó el anti-suero AAP policlonal (anti-AAP) por inmunización de una cobaya con un péptido que comprendía la secuencia GKDSSTTGDS DPRDSTS (SEQ ID NO: 61) conjugado con KLH (hemocianina de lapa californiana) siguiendo procedimientos convencionales.

1.8. Tinción negativa de partículas de virus para microscopía electrónica

Para microscopía electrónica según (Grinm et al., 1999, Grinm y Kleinschmidt, 1999, Mittereder et al., 1996), se realizó la tinción negativa de partículas de virus como se describe con detalle a continuación.

Se aplicaron cinco µl de muestra (aproximadamente 5x10¹⁰ partículas de virus) sobre el lado recién recubierto de carbono por descarga incandescente con aire de una rejilla y se incubó durante 2 min. Se retiró el exceso de solución por transferencia del borde de la rejilla sobre papel de filtro Whatman. Para evitar los precipitados de sal, la rejilla se lavó con 3 gotas de agua seguido por cuatro gotas de 2 % (p/v) de solución de acetato de uranio. Se dejó que la última gotita de la solución de tinción se asentara sobre la rejilla durante 5 min antes de la transferencia y el secado al aire. Se tomaron micrografías electrónicas con un microscopio Morgagni 268D FEI a 100 kV.

2. Análisis de la formación de VLP por análisis de deleciones del extremo N de VP2

Los estudios previos de los presentes inventores también informaron (véase anteriormente) de una ausencia de ensamblaje de cápside cuando VP3 se expresa de construcciones que comprenden la cds de VP3 sola. Puesto que la expresión de VP3 no es suficiente para la formación de VLP, los presentes inventores intentaron identificar secuencias adicionales que pudieran vencer este defecto. En este experimento, los presentes inventores comprobaron si una secuencia aguas arriba de la cds de VP3 era necesaria para la formación de VLP. Si sí, se debe caracterizar la secuencia.

2.1. Clonación de mutantes de deleción

Se han descrito previamente los plásmidos pTAV2.0 (Heilbronn et al., 1990), pVP3 (Warrington et al., 2004), pCMV-VP (Wistuba et al., 1997) y pKEX-VP3 (Ruffing et al., 1992). Se clonaron los mutantes de deleción pCMV-VP3/1882, pCMV-VP3/2193, pCMV-VP3/2596, pCMV-VP3/2611, pCMV-VP3/2696, pCMV-VP3/2765 y pCMV-VP3/2809 del plásmido pVP3. Los números detrás del nombre del plásmido pCMV-VP3 indican la posición de nucleótidos en el genoma de AAV2 según Ruffing et al. (1994). Las construcciones se muestran esquemáticamente en la Fig. 5A.

Para clonar los mutantes de deleción, se subclonó el fragmento HindIII/BsiVI de pVP3 (con codones de iniciación de la traducción de VP1 y VP2 mutados) en el esqueleto de HindIII/BsiVI de pCMV-VP dando como resultado la construcción pCMV-VP3/1882 (Fig. 5). Se generaron las construcciones pCMV-VP3/2193 y pCMV-VP3/2596 subclonando el fragmento DraI/BsiVI o EcoNI (romo)/BsiVI de pVP3 en el esqueleto de HindIII (romo)/BsiVI de pCMV-VP (los sitios EcoNI y HindIII se hicieron romos por digestión del nucleótido protuberante monocatenario) (la posición de los diferentes sitios de restricción usados para la clonación con respecto a la secuencia genómica se muestra en la Fig. 4). Para deleciones adicionales se usó pVP3 como molde para las reacciones de mutagénesis dirigida al sitio. Se realizó mutagénesis usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene, Ámsterdam, Los Países Bajos) según el manual del fabricante. Para cada mutación, se diseñaron dos cebadores de PCR complementarios para generar un nuevo sitio de restricción HindIII en el área diseñada. Secuencias de cebadores:

5'-CCTCTGGTCTGGGA ACTAAGCTTATGGCTACAGGCAGTGGCG-3' (SEQ ID NO: 62)
5'-CGCCACTGCCTGTAGCCATAAGCTTAGTCCAGACCAGAGG-3' (SEQ ID NO: 63)

Entonces se subclonaron los fragmentos HindIII/BsiVI de los plásmidos mutados en el esqueleto de HindIII/BsiVI de pCMV-VP dando como resultado las construcciones pCMV-VP3/2611, pCMV-VP3/2696, pCMV-VP3/2765 y pCMV-VP3/2809 (Fig. 5A).

2.2. Análisis de construcciones por transferencia Western y ELISA

Para el análisis de expresión de proteínas, se procesaron porciones idénticas de células recogidas para SDS-PAGE.

Como se muestra en la Fig. 5B, la transfección de células 293-T con todas las construcciones enumeradas en la Fig. 5A, excepto pTAV2.0 (AAV wt) y pCMV-VP, produjeron la expresión de solo VP3 cuando se analizó por transferencia Western usando el anticuerpo B1 que reacciona con las tres proteínas de la cápside. A diferencia, las células transfectadas con pTAV2.0 (AAV wt) o pCMV-VP, un plásmido en el que no se mutaron los sitios de inicio de la traducción correspondientes, se detectaron bien VP1 y VP2, además de VP3. El anticuerpo B1 reaccionó con dos bandas de polipéptido que migraron más lentas que VP3, por ejemplo para los plásmidos mutados pKEX-VP3, pCMV-VP3/2765 y pCMV-VP3/2809. Al menos para los plásmidos pKEX-VP3 y pCMV-VP3/2809, los polipéptidos correspondientes pueden no contener secuencias de aminoácidos de VP1 o VP2, puesto que las secuencias de nucleótidos que codifican VP1 o VP2 se delecionaron completamente. Además, VP1 y VP2 no se pudieron detectar tras la expresión de los tres plásmidos mutados, usando el anticuerpo A69. Por tanto, se pudo excluir claramente la presencia de VP1 y VP2 en estas muestras. Los presentes inventores llegaron a la conclusión de que las dos bandas de polipéptidos que migran más lentas que VP3 fueron una consecuencia de mayores niveles de VP3, que no fueron completamente desnaturalizadas.

Cuando, sin embargo, se sondaron los extractos de células transfectadas con pVP3 con anticuerpo A69 que detecta solo VP1 y VP2, omitiendo así la reacción con la abundante VP3, se pudieron detectar unas leves bandas en la región de VP1 y VP2 que estuvieron ausentes en los extractos de células transfectadas con pKEX-VP3. Este resultado sugiere que la transfección de la construcción de pVP3 conduce a la expresión de pequeñas cantidades de VP1 y VP2 o proteínas de tipo VP1 y VP2. Se tradujeron posiblemente de codones de iniciación de la traducción alternativos o por iniciación sin programar en los sitios de iniciación de la traducción VP1 y VP2 mutados.

El anticuerpo A69 reveló en todos los mutantes de deleción de pVP3 hasta pCMV-VP3/2696 una o varias bandas de polipéptidos, solo las transferencias Western con extractos de células transfectadas con pCMV-VP3/2765 y pCMV-VP3/2809 no mostraron reacción con A69 debido a que el epítope de anticuerpo ya estaba delecionado en estas proteínas.

El ensamblaje de cápside se confirmó por un ELISA de cápsides basado en el anticuerpo A20 (Fig. 5C). A diferencia, la expresión de VP3 por pKEX-VP3 no dio cantidades detectables de cápsides (Fig. 5C), aunque la cantidad de proteína VP3 expresada fue incluso más alta en comparación con pVP3 (Fig. 5B).

5 De acuerdo con los resultados previos de los presentes inventores, la expresión de VP3 sola transfectando pCMV-VP3/2809 - que es equivalente a pKEX-VP3 - no condujo a la formación detectable de cápsides (Fig. 5C). Se excluyó la formación de cápsides que podrían no reaccionar con el ELISA de A20 por análisis de extractos de células en gradientes de sacarosa, seguido por transferencia Western con el anticuerpo B1 (datos no mostrados).
 10 De forma interesante, el análisis de la eficiencia del ensamblaje de cápside en los diferentes mutantes de delección detectó que la eficiencia del ensamblaje de cápside aumentó de un mutante de delección al siguiente, antes de disminuir tras un cierto grado de delección. Se observaron las eficiencias pico en el ensamblaje de cápside para los mutantes pCMV-VP3/2596 y pCMV-VP3/2611 (Fig. 5A y C).

2.3 Conclusión

15 Este resultado muestra una clara correlación entre la presencia de la secuencia de VP3 extendida en el extremo N (debido a la presencia de la secuencia de ADN aguas arriba del codón de iniciación de VP3) y el ensamblaje de cápside. Los presentes inventores identificaron una secuencia de ADN de aproximadamente 44 nucleótidos aguas arriba de la cds de VP3 que tiene que estar presente además de la cds de VP3 para la formación de VLP de VP3.
 20 Estos 44 nt se confieren a la construcción pCMV-VP3/2765 que todavía es capaz de provocar el ensamblaje de cápside.

La presencia de algunas secuencias más de ADN aguas arriba del sitio 2765 aumenta la eficiencia del ensamblaje de cápside que está en línea con ORF2 que empieza en la posición de nucleótidos 2717 y el supuesto inicio de la AAP de longitud completa posiblemente localizada entre el nucleótido 2717 y 2765.
 25

3. El fragmento de secuencia del gen cap es capaz de inducir el ensamblaje de cápside en *trans*

30 En el Ejemplo 2, los presentes inventores identificaron alguna secuencia aguas arriba del codón de iniciación de VP3 (comprendida por el fragmento Z) que tenía que estar presente además de la cds de VP3 para la formación de partículas. Para demostrar la hipótesis de que el producto de fragmento Z funciona transitoriamente y en *trans*, los presentes inventores probaron si un fragmento de secuencia de cápside que comprendía el fragmento de restricción EcoNI/BsiVVI fusionado con la cds de GFP podía rescatar la deficiencia de ensamblaje de cápside de VP3.

3.1. Clonación de pVP2N-gfp para trans-complementación

35 Para la generación de la construcción pVP2N-gfp, se introdujeron sitios de restricción EcoNI y BsiVVI en el sitio de clonación múltiple del vector pEGFP-N1 (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica). Después se insertó el fragmento EcoNI/BsiVVI de pTAV2.0 (la posición de sitios de restricción se da en la Fig. 4) aguas abajo de un promotor del CMV y aguas arriba de la cds de GFP y su señal de poli(A). La expresión de esta construcción de fusión pVP2N-gfp da como resultado tres transcritos VP2N-gfp, VP3N-gfp y GFP, dependiendo del inicio de transcripción en uno de los tres codones de iniciación existentes para VP2, VP3 o GFP como se muestra esquemáticamente en la Fig. 6A.
 40

Se originaron varios derivados que contenían, por ejemplo, modificaciones de codón o codones de terminación a partir de pVP2N-gfp como se indica esquemáticamente en las figuras respectivas. Siempre incluyen la cds de GFP y se nombraron en consecuencia (con la adición -gfp). Para simplificar materia, este apéndice (-gfp) está ausente de los nombres de las construcciones respectivas en algunas figuras (por ejemplo las Figs. 20, 22, 23).
 45

3.2. Análisis de sustitución funcional en *trans*

50 Los siguientes experimentos se realizaron en células HeLa. Se co-transfectaron los plásmidos pCMV-VP3/2809 y pVP2N-gfp en diferentes relaciones molares y se analizaron para la expresión génica y el ensamblaje de cápside (Fig. 6). Mientras que el análisis de transferencia Western confirmó que la cantidad de VP3 era la misma en extractos de células transfectadas en cada relación molar de los dos plásmidos (detección con anticuerpo B1, Fig. 6B parte superior), VP2N-gfp (detección con anticuerpo A69, Fig. 6B parte inferior) solo se pudo detectar después de la transfección en una relación 1:1 o 1:1/5, respectivamente. En la relación 1:1 o 1:1/5, el anticuerpo anti-gfp (Fig. 6B, centro) detecta además los tres transcritos resultantes de la expresión de la construcción de fusión pVP2N-gfp como se muestra esquemáticamente en la Fig. 6A, concretamente VP2N-gfp, VP3N-gfp y GFP. Debido al fuerte codón de iniciación de VP3 y correspondiente a la situación *in vivo*, domina el transcrito de VP3N-gfp.
 55 Sorprendentemente, el ensamblaje de cápside se podría observar por inmunofluorescencia hasta una relación de pCMV-VP3/2809 de 1:1/50 con respecto al plásmido de fusión de GFP (Fig. 6C). La cuantificación de la formación de cápsides usando el ELISA de cápsides basado en anticuerpo A20 mostró que la formación de cápsides del mutante pCMV-VP3/2809 complementado con pVP2N-gfp fue similarmente eficiente al mutante pCMV-VP3/2696 donde se co-expresó VP3 extendida en el extremo N (Fig. 6D).
 60

3.3. Conclusión

65

Este resultado muestra que la presencia de un fragmento de restricción de EcoNI-BsiVI del gen cap en *trans* rescata el ensamblaje de cápside de construcciones que expresan VP3 como única proteína de la cápside. Puesto que el ensamblaje se podría detectar incluso a una cantidad 50 veces reducida del plásmido pVP2N-gfp co-transfectado, se puede suponer una acción subestequiométrica del factor auxiliar para el ensamblaje de cápside de VP3.

4. Proteínas VP2 truncadas en el extremo C se expresan en cantidades subestequiométricas y se incorporan en cápsides

Aquí se investigó si las partículas de tipo AAV generadas consistían en VP3 solo. Se produjeron partículas vacías a partir del plásmido pCMV-VP3/2696 o en un ensayo de trans-complementación de cotransfección de pCMV-VP/2809 y pVP2N-GFP. Las partículas se purificaron mediante almohadilla de sacarosa según Steinbach et al. (1997) con la modificación descrita por Kronenberg et al. (2001) y con la modificación de que las células 293 se transfectaron sin infección adenoviral y las células se recogieron después de 48 h. Se analizó la incorporación de proteína VP2 truncada por transferencia Western (Fig. 7).

No se pudo detectar pVP2N-GFP dentro de la carga máxima de 5×10^{11} partículas. Pero transfectando pCMV-VP3/2696 se detectó una señal de A69 que muestra que una VP2 truncada se incorpora en las cápsides subestequiométricamente.

4.1. Resultado

En conclusión, se generan partículas de solo VP3 dentro de la situación en *trans*. A diferencia, en la situación en *cis*, se incorpora subestequiométricamente una VP2 truncada. A partir de transferencia Western, la intensidad de señal de VP1 de 2×10^9 partículas de AAV wt es aproximadamente la misma que la señal de 1×10^{11} partículas generadas de pCMV-VP3/2696. Esto significa que la cantidad de VP2 truncada es aproximadamente 50 veces menor que la cantidad de VP1. Suponiendo una relación estequiométrica de VP1:VP2:VP3 de 1:1:10, dentro de una cápside wt existe aproximadamente 500 veces menos VP2 truncada que VP3. Puesto que una cápside está compuesta por 60 subunidades de VP, también deben existir cápsides que estén compuestas por VP3 solo.

4.2. Conclusión

Este resultado refuerza la conclusión de que la propia proteína VP2 truncada no es requerida por la propia cápside.

5. La modificación de codones de la construcción usada para trans-complementación puede inhibir el proceso de trans-complementación

Para investigar la naturaleza del agente de trans-complementación del fragmento Z, se modificó en los codones la parte de VP2N (parte entre los sitios de restricción EcoNI y BsiWI) dentro de pVP2N-gfp. Esto significa que la secuencia de ADN se alteró sin cambiar la secuencia de aminoácidos del primer ORF. La modificación en los codones se realizó por GENEART (Regensburg, Alemania). Los codones se modificaron para codones preferencialmente usados en células de mamífero. La secuencia se muestra en la Figura 8A. La identidad de la secuencia de ADN de pVP2N-gfp frente a pVP2N-gfp modificado en los codones (cm, pVP2Ncm-gfp) es 71 % mientras que la identidad de proteína es 100 %.

Se comparó la expresión de proteínas de pVP2Ncm-gfp en el análisis de transferencia Western (Fig. 8B) y por inmunofluorescencia dentro de células 293 transfectadas (Fig. 8C). Se probó la capacidad para rescatar la formación de cápsides de pCMV-VP3/2809 en ensayos de trans-complementación como se describe en el Ejemplo 3 (Fig. 8D). Los plásmidos se cotransfectaron en una relación molar de 1:1.

Resultado y conclusión

La transferencia Western mostró que la expresión de proteínas de la construcción modificada en los codones (pVP2Ncm-gfp) fue incluso superior a la expresión de proteínas de la construcción no modificada (pVP2N-gfp), que no era inesperado puesto que la modificación de codones se optimizó para células de mamífero (Fig. 8B). Tampoco se diferenció la localización dentro de las células de la proteína modificada en codones de la de la proteína no modificada (Fig. 8C). Sorprendentemente, pVP2Ncm-gfp perdió su capacidad para rescatar la formación de cápsides de pCMV-VP3/2809 (Fig. 8D).

Para excluir un efecto negativo de las grandes cantidades de proteína pVP2Ncm-gfp sobre el ensamblaje de cápside, los presentes inventores co-transfectaron el pVP2Ncm-gfp modificado en los codones con pCMV-VP3/2696. En esta combinación, el ensamblaje de cápside fue normal, que muestra que la actividad de ensamblaje no fue suprimida por la alta cantidad de pVP2Ncm-gfp (datos no mostrados). La expresión de menores cantidades de pVP2Ncm-gfp por transfección de cantidades reducidas de plásmido pVP2Ncm-gfp junto con pCMV-VP3/2809 tampoco rescató el ensamblaje de cápside (datos no mostrados).

Este resultado refuerza la hipótesis de que ninguna proteína traducida del primer ORF es responsable de la actividad de trans-complementación.

6. La inserción de codones de terminación en la construcción usada para la trans-complementación no inhibe el proceso de trans-complementación

Para analizar adicionalmente la naturaleza del agente de trans-complementación, se insertaron codones de terminación dentro del fragmento de restricción EcoNI-BsiWI. Para insertar codones de terminación se realizaron mutaciones puntuales.

6.1. Inserción de codones de terminación en pVP2N-gfp

Para la construcción de pVP2N/paradaA-gfp (también denominado pVP2N/ORF1paradaA-gfp), pVP2N/paradaB-gfp (idéntico a pVP2N/ORF1paradaB-gfp), pVP2N/paradaC-gfp (también denominado pVP2N/ORF1paradaC-gfp) y pVP2N/paradaD-gfp (idéntico a pVP2N/ORF1paradaD-gfp), se realizaron reacciones de mutagénesis dirigida al sitio (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange, Stratagene) usando el molde pVP2N-gfp y dos cebadores de PCR complementarios que incluyeron las sustituciones deseadas. En cada caso, el fragmento EcoNI/BsiVVI se clonó entonces en el esqueleto de EcoNI/BsiVVI de pVP2N-gfp.

Para la generación de Parada A, se substituyó citosina en la posición de nucleótido 2770 por timina dando como resultado un codón de terminación tag. Para la generación de Parada B, se substituyó adenina en la posición de nucleótido 2797 por timina dando como resultado un codón de terminación tga. Parada C se generó substituyendo adenina en la posición de nucleótido 2821 por timina y timina en la posición 2823 por adenina, dando como resultado un codón de terminación tga. Parada D se creó substituyendo guanina en la posición de nucleótido 2878 por timina dando como resultado un codón de terminación tga. Las posiciones son según Ruffing et al. (1994).

Pares de cebadores usados para la inserción de codones de terminación en cuatro sitios diferentes dentro de pVP2N-gfp

ParadaA 5'-CCA GCC TCT CGG ATA GCC ACC AGC AGC C-3' (SEQ ID NO: 64)
 i-ParadaA 5'-GGC TGC TGG TGG CTA TCC GAG AGG CTG G-3' (SEQ ID NO: 65)
 ParadaB 5'-GCC CCC TCT GGT CTG TGA ACT AAT ACG ATG GC-3' (SEQ ID NO: 66)
 i-ParadaB 5'-GCC ATC GTA TTA GTT CAC AGA CCA GAG GGG GC-3' (SEQ ID NO: 67)
 ParadaC 5'-CGA TGG CTA CAG GCT GAG GCG CAC CAA TGG C-3' (SEQ ID NO: 68)
 i-ParadaC 5'-GCC ATT GGT GCG CCT CAG CCT GTA GCC ATC G-3' (SEQ ID NO: 69)
 ParadaD 5'-GGA GTG GGT AAT TCC TCG TGA AAT TGG CAT TGC G-3' (SEQ ID NO: 70)
 i-ParadaD 5'-CGC AAT GCC AAT TTC ACG AGG AAT TAC CCA CTC C-3' (SEQ ID NO: 71)

La representación esquemática de los codones de terminación insertados se representa en la Fig. 9A. En pVP2N/paradaA-gfp el nucleótido C₂₇₇₀ se ha mutado a t, por tanto el codón cag que codifica glutamina se cambia a tag (mutación silenciosa en ORF2), en pVP2N/paradaB-gfp el nucleótido g₂₇₉₇ se ha mutado a t, por tanto el codón gga que codifica glicina se cambia a tga (mutación Trp → Cys en ORF2), en pVP2N/paradaC-gfp el nucleótido a₂₈₂₁ se ha mutado a t (silenciosa en ORF2) y el nucleótido t₂₈₂₃ se ha mutado a a, por tanto el codón agt que codifica serina se cambia a tga (mutación Val → Glu en ORF2), y en pVP2N/paradaD-gfp el nucleótido g₂₈₇₈ se ha mutado a t, por tanto el codón gga que codifica glicina se cambia a tga (silenciosa en ORF2). Las posiciones son según Ruffing et al. (1994). Ninguna sustitución altera ORF2. Se usaron las construcciones de parada de pVP2N-gfp resultantes para la trans-complementación de la construcción pCMV-VP3/2809 como se describe en Ejemplo 3. Los plásmidos pCMV-VP3/2809 y la construcción pVP2N/parada-gfp respectiva se cotransfectaron en una relación molar de 1:1.

Se probó la expresión adicional de proteínas de las construcciones de Parada por análisis de transferencia Western usando el anticuerpo A69.

6.2. Resultado y conclusión

El análisis de transferencia Western confirmó que VP3 se expresa en todas las muestras (detectadas por el anticuerpo monoclonal B1 en Fig. 9B). Como era de esperar, el vector Bluescript (pBS) no provocó el ensamblaje de cápside en el ensayo de trans-complementación y, por tanto, sirvió de control negativo (Fig. 9C). De forma interesante, aunque no se detectó expresión de proteínas para las construcciones pVP2N/parada-gfp a diferencia de la construcción pVP2N-gfp (Fig. 9B), la inserción de codones de terminación no influyó en la actividad de trans-complementación del fragmento de restricción EcoNI-BsiVVI del gen cap. Se pudieron ensamblar fácilmente las partículas VP3 (Fig. 9C). La reducción en los títulos de cápsides obtenidos con mutantes pVP2N/paradaB-gfp y pVP2N/paradaC-gfp podría ser debida a los cambios de los nucleótidos introducidos generando las mutaciones respectivas (paradaB en ORF1 condujo a una mutación Trp→Cys en ORF2, paradaC en ORF1 condujo a una mutación Val→Glu en ORF2). Estos experimentos muestran juntos que la secuencia de ácidos nucleicos del fragmento EcoNI-BsiVVI es la base para la actividad auxiliar de ensamblaje de cápside y no una proteína expresada

del primer ORF, puesto que todos los mutantes contienen codones de terminación en el primer ORF. Aunque las sustituciones que dan como resultado codones de terminación en ORF1 no pararon la síntesis de aminoácidos de AAP de ORF2, las diferencias en los títulos de cápsides indicaron que se influyó la funcionalidad de AAP.

5 7. La NLS postulada no es necesaria para la formación de VLP

Aunque el mutante pCMV-VP3/2696 formó altos niveles de cápside, el mutante ligeramente más corto pCMV-VP3/2765 se ensambló con cantidades claramente reducidas de cápsides (Fig. 5C). Este mutante más corto había perdido un grupo de AA que se había sugerido que funcionaba de NLS para las proteínas VP2 de AAV (Hoque et al., 1999a) y mostró transporte nuclear reducido de la proteína VP (Fig. 10) Para probar si la NLS postulada es responsable de esta diferencia, los presentes inventores sustituyeron el elemento de secuencia respectivo convirtiendo el péptido RKR (AA 168-170) en AAA en la construcción pCMV-VP3/2696 para destruir la actividad de NLS propuesta por mutagénesis dirigida al sitio según procedimientos convencionales usando dos cebadores de PCR complementarios que incluyeron las sustituciones deseadas. Cebadores usados para la sustitución de RKR por AAA:

BC3'ala directo: 5'-GGC GGG CCA GCA GCC TGC AGC AGC AGC ATT GAA TTT TGG
TCA GAC TGG-3' (SEQ ID NO: 72)
BC3'ala inverso: 5'-CCA GTC TGA CCA AAA TTC AAT GCT GCT GCT GCA GGC TGC
TGG CCC GCC-3' (SEQ ID NO: 73)

La inmunofluorescencia de células HeLa transfectadas con el anticuerpo A20 (Fig. 10) y el ELISA de cápside (datos no mostrados) mostró que la proteína VP del mutante pCMV-VP3/2696RKR168-170AAA era tan activa en el ensamblaje de cápside como AAV wt.

Esto respalda la interpretación de que el elemento de secuencia que comprende RKR168-170 no actúa de NLS en este contexto y podría desempeñar una función diferente en el ensamblaje de cápside.

25 8. La localización nuclear (y extensión del extremo N) de proteínas VP no es suficiente para el ensamblaje de cápside

Se ha informado que la fusión de una NLS derivada del antígeno T grande de SV40 con VP3 transloca VP3 en el núcleo y conduce al ensamblaje de cápside (Hoque et al., 1999a). Los presentes inventores repitieron este experimento y observaron la eficiente acumulación nuclear de proteína VP3, sin embargo, no hubo ensamblaje de cápside detectable con el anticuerpo A20 (Figs. 11A, 11B y 15B).

Además, se probó que una extensión heteróloga del extremo N aguas arriba de VP3 (HSA) restaura la competencia del ensamblaje a VP3.

Además, se transfectaron varias construcciones en células 293 para comparar la expresión de proteínas y la eficiencia del ensamblaje.

40 8.1. Clonación de construcciones

Se clonaron pCI-VP, pCI-VP2 y pCI-VP3 por amplificación por PCR de las regiones codificantes de VP respectivas usando el cebador con nucleótidos protuberantes de XhoI (5') y NotI (3') y subclonando los productos de PCR digeridos con XhoI/NotI en el vector digerido con XhoI/NotI pCI (PROMEGA). En caso de pCI-VP2, el codón de iniciación para VP2 se cambió de ACG a ATG al mismo tiempo.

La clonación de la construcción pCMV-NLS-VP3 se llevó a cabo por reacción de mutagénesis dirigida al sitio usando la construcción pCMV-VP3/2809 como molde y los cebadores de PCR complementarios

5'-GGAAT TCGAT ATCAA GCTTG CCATG GCACC ACCAA AGAAG AAGCG AAAGG TTATG
GCTAC AGGCA GTGG-3' (SEQ ID NO: 74) y 5'-CCACT GCCTG TAGCC ATAAC CTTTC
GCTTC TTCTT TGGTG GTGCC ATGGC AAGCT TGATA TCGAA TTCC-3' (SEQ ID NO: 75).

Entonces se subclonó el fragmento HindIII/BsiWI a partir del amplicón en el esqueleto de HindIII/BsiWI de pCMV-VP3/2809. El producto del gen cap NLS-VP3 contuvo la secuencia de aminoácidos de SV40 NLS MAPPKKKRKY en el extremo N de VP3.

55 La construcción pCMV-HSA-VP3 también se basa en pCMV-VP3/2809 y contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos 25-58 de albúmina de suero humano (HSA) directamente aguas arriba de la cds de VP3. Se obtuvo el fragmento

5'-GGTAC CAAGC TTACG GACGC CCACA AGAGC GAGGT GGCCC ACCGG TTCAA GGACC
 TGGGC GAGGA AAAC TCAAG GCCCT GGTGC TGATC GCCTT CGCCC AGTAC CTGCA
 GCAGT GCAAG CTTGA GCTC-3' (SEQ ID NO: 76)

(con un sitio de restricción HindIII en ambos extremos) mediante síntesis génica (Geneart, Regensburg, Alemania). Después de la digestión con HindIII del vector correspondiente, se subclonó el fragmento resultante de 111 pb en el esqueleto linealizado de pCMV-VP3/2809. Se inicia la traducción de VP3 en un codón de iniciación ATG convencional mientras que se inicia la traducción de HSA-VP3 (con estiramiento de 37 Aas en el extremo N de VP3) en un codón de iniciación ACG.

8.2. Análisis de construcciones por inmunofluorescencia y gradiente de sacarosa

Los presentes inventores transfectaron células HeLa con las diferentes construcciones: pCMV-NLS-VP3 o pCMV-VP3/2809 tanto solas como en una co-transfección con pVP2N-GFP. Adicionalmente se transfectó pCMV-HSA-VP3. Se analizó la expresión de proteínas de la cápside y la formación de cápsides por inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente usando un antisuero VP policlonal o el anticuerpo monoclonal A20. Se analizó la formación de cápsides adicional dentro del siguiente gradiente de sacarosa.

Resultados

De la misma manera que Hoque et al. (1999a) y comparable a las proteínas naturales (wt) y expresadas a partir de la construcción truncada en el extremo N pCMV/2696, los presentes inventores pudieron expresar VP3 a partir de la construcción pCMV-NLS-VP3 y observaron acumulación nuclear eficiente de proteína VP3. Sin embargo, a diferencia de la construcción wt y truncada en el extremo N pCMV/2696, los presentes inventores no pudieron detectar el ensamblaje de cápside usando el anticuerpo A20 (Fig. 11B).

Como era de esperar, se pudo detectar la expresión de la proteína VP3 con un extremo N prolongado que consistía en 36 AA de albúmina de suero humano (HSA-VP3), equivalente en longitud a la extensión del extremo N de VP3 del mutante pCMV-VP3/2696, por tinción de anticuerpo (Fig. 11B). En comparación con el producto de expresión de pCMV-NLS-VP3, los del mutante pCMV-HSA-VP3 mostraron una fracción mucho mayor de tinción citoplásmica. Nuevamente, los presentes inventores no pudieron detectar el ensamblaje de cápside usando el anticuerpo A20 (Fig. 11B).

La co-transfección de pVP2N-gfp indujo el ensamblaje de cápside, fácilmente detectable por el anticuerpo A20 (Fig. 11B).

El análisis de posibles productos de ensamblaje – que no reaccionan con el anticuerpo A20 – por sedimentación en gradiente de densidad de sacarosa mostró cantidades muy bajas de material que contenía proteína VP (sedimentación a lo largo de todo el intervalo del gradiente) que reaccionó con el anticuerpo B1 (Fig. 11C). Esto indica la formación de proteína VP incorrectamente ensamblada o agregada en cantidades bastante bajas, fácilmente detectables.

8.3. Análisis de construcciones por transferencia Western y ELISA

Se analizó un conjunto de construcciones diferentes para la expresión génica en transferencia Western y en ELISA para el ensamblaje de cápside (Fig. 15A):

- pCI-VP2: Se clonó la secuencia de VP2 de AAV2 en el sitio de clonación múltiple de pCI (Promega, Mannheim, Alemania). Se cambió el codón de iniciación de VP2 ACG a ATG.
- pCI-VP3: Se clonó la secuencia de VP3 natural en pCI.
- pCI-VP: Se clonó ORF de cap completo en pCI. No se mutaron los codones de iniciación de VP2 y VP3.
- pCMV-NLS-VP3: (descrito en el Ejemplo 8 y por Hoque et al. (1999a))
- pCI-VP2mutACG: Esto es una modificación de VP2 de pCI: se destruye el codón de iniciación de VP2 y se sustituye por un codón GAG
- pCMV-VP3/2696 (descrito en el Ejemplo 2)

Resultados

El análisis de transferencia Western mostró expresión similar de proteínas de la cápside de las diferentes construcciones con el tamaño esperado de las proteínas VP (Fig. 15C). La eficiencia en el ensamblaje de cápside fue, sin embargo, bastante diferente (Fig. 15B). El título de partículas obtenido con la construcción clonada, análogo a Hoque et al (pCMV-NLS-VP3), estuvo por debajo del límite de detección. Que también significa que las construcciones favorecidas pCI-VP2mutACG o pCMV-VP3/2696 son más de 3 logaritmos más eficientes en la eficiencia de formación de partículas VP3 cuando se comparan con la construcción de Hoque pCMV-NLS-VP3. La

construcción pCI-VP2 corresponde a pCMV-VP3/2611, excepto por una mutación del codón de iniciación ACG secundario a ATG en pCI-VP2, mientras que el codón ACG se deletiona completamente en pCMV-VP3/2611. Se reduce frecuentemente la eficiencia de formación de cápsides de la construcción pCI-VP2 (Fig. 15B). Los presentes inventores no analizaron si las partículas obtenidas de pCI-VP2 estaban principalmente compuestas por VP2, VP3 o una mezcla de ambas proteínas. La Fig. 15C muestra que VP3 se expresa todavía a partir de esta construcción incluso con eficiencia significativamente menor (aproximadamente 10 veces) en comparación con VP2. Los presentes inventores suponen que las partículas obtenidas consistían principalmente en VP3. El bajo título se explica por i) cantidades 10 veces reducidas de VP3 de pCI-VP2 en comparación con pCMV-VP3/2611. Además, los presentes inventores suponen que el codón de iniciación ATG en pCI-VP2 interfiere con la expresión de AAP ya que ATG domina probablemente el codón de iniciación no canónico de AAP. pCI-VP3 solo mostró baja eficiencia de formación de cápsides como era de esperar. La eficiencia del ensamblaje de partículas se podría rescatar parcialmente por co-transfección de pCI-VP3 con pCI-VP2 (Fig. 15B) en una relación de 10:1. Sin embargo, la formación global de partículas se reduce todavía en 1-2 logaritmos en comparación con pCI-VP2mutACG o pCMV-VP3/2696, que soporta la hipótesis de los presentes inventores de que el codón de iniciación ATG en la región codificante VP2 de pCI-VP2 interfiere con la expresión de AAP. La formación de partículas de pCI-VP es mucho menor cuando se compara con pCMV-VP (Fig. 5). Esto se explica del siguiente modo: pCI-VP se diferencia de pCMV-VP por carecer del sitio donante de corte y empalme. Por tanto, solo se transcribe un ARN mensajero de pCI-VP que expresa principalmente VP1, mientras que se transcriben dos ARN mensajeros de pCMV-VP. El transcrito secundario expresa principalmente VP1, mientras que el transcrito principal codifica VP2 y VP3 en una relación de 1:8. Por tanto, pCMV-VP expresa VP1:VP2:VP3 en la relación esperada de 1:1:8, mientras que VP2 y VP3 se pueden detectar difícilmente, si acaso, con la construcción pCI-VP.

Conclusión

Los resultados muestran que la acumulación nuclear de VP3 sola no es suficiente para el ensamblaje de cápside y que una extensión heteróloga del extremo N aguas arriba de VP3 no es capaz de provocar la competencia de ensamblaje por VP3.

Además, las construcciones favorecidas de los presentes inventores pCI-VP2mutACG o pCMV-VP3/2696 conducen a títulos de partículas VP3 más de 3 logaritmos más altos cuando se comparan con la construcción de fusión NLS-VP3 descrita por Hoque et al. (1999a). Estos experimentos también demuestran que las construcciones de fusión del extremo N de VP3 se pueden ensamblar en VLPs. Por tanto, I-203 es un sitio de inserción adecuado para secuencias de péptidos extrañas.

9. El ensamblaje de cápside de VP3 se puede lograr en células de insecto

9.1. Clonación del mutante de VP1 "Modificación 4"

Se generó la construcción pVL_VP1_MOD4 para producir partículas virales que consistían esencialmente en la proteína de la cápside VP3 en ausencia de cualquier expresión de Rep.

En detalle, se usó pUC19AV2 (descrito en detalle en el documento de patente US 6.846.665) como molde para amplificar VP1 según condiciones de PCR estándar en presencia de los siguientes cebadores:

Insect_mod_4_s: 5'-CAC CCG CGG GGA TCC **GCC** GCT GCC GAC GGT TAT CTA CCC

GAT TGG CTC-3' (SEQ ID NO: 77), y

E_VP2_rev: 5'-CGC GAA TTC CTA TTA CAG ATT ACG AGT CAG G-3' (SEQ ID NO: 78)

Así, se cambió el codón de iniciación de la traducción natural ATG (que codifica metionina) de VP1 a GCC (alanina) y se inactivó. El fragmento de EcoRI/BamHI resultante se clonó en pBSIIKS (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.). Este vector se usó para inactivar el codón de iniciación de la traducción de VP2 por mutagénesis dirigida al sitio según las instrucciones del kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II (Stratagene) usando los siguientes cebadores:

Insect-muta_4_s: 5'-ACC TGT TAA GAC AGC TCC GGG AAA AAA G-3' (SEQ ID NO: 79)

Insect-muta_4_as: 5'-CTT TTT TCC CGG AGC TGT CTT AAC AGG T-3' (SEQ ID NO: 80)

Así, se cambió el codón de iniciación de la traducción natural ACG de VP2 a ACA (ambos de los cuales codifican treonina). Se digirió la construcción resultante con enzimas de restricción BamHI y EcoRI y se clonaron en el vector de transferencia de baculovirus pVL1393. Como resultado, la construcción contuvo el gen cap de AAV completo con mutaciones de los codones de iniciación de VP1 y VP2, pero sin cds de rep (Fig. 12).

9.2. Clonación de pVL_VP2

Se amplificó VP2 de AAV2 usando los cebadores E_VP2_for y E_VP2_rev enumerados a continuación. Así, se cambió el codón de iniciación de la traducción de VP2 natural ACG (que codifica treonina) a ATG (metionina).

Cebadores:

E_VP2_for: 5'-CAC CCG CGG GGA TCC ACT ATGGCT CCG GGA AAA AAG AGG-3' (SEQ ID NO: 81)
 E_VP2_rev: 5'-CGC GAA TTC CTA TTA CAG ATT ACG AGT CAG G-3' (SEQ ID NO: 82)

Se clonó la construcción resultante en el vector de transferencia de baculovirus pVL1393.

5

9.3. Clonación de pVL_VP3

Se amplificó VP3 de AAV2 usando los cebadores E_VP3_for y E_VP3_rev enumerados a continuación. Cebadores:

E_VP3_for: 5'-CAC CCG CGG GGA TCC ACT ATG GCT ACA GGC AGT GGC GCA C-3' (SEQ ID NO: 83)
 E_VP2_rev: 5'-CGC GAA TTC CTA TTA CAG ATT ACG AGT CAG G-3' (SEQ ID NO: 84)

10

Se clonó la construcción resultante en el vector de transferencia de baculovirus pVL1393.

9.4. Análisis de producción de partículas

15 Se produjeron partículas de AAV como se describe en 1.1. Se investigaron los lisados celulares por análisis de transferencia Western para la expresión de proteínas. pVL_VP1_MOD4 solo mostró expresión de VP3, pVL_VP2 expresión de VP2, mientras que pVL_VP3 mostró, además de VP3, señales de degradación más pequeñas (Fig. 12 B). Se obtuvieron títulos por un ELISA de A20. Se observó un título de 1×10^{12} partículas/ml para la construcción de modificación 4, mientras que VP2 pVL_VP2 mostró un título de 9×10^8 partículas/ml y pVL_VP3 solo un título de 1×10^8 partículas/ml (Fig. 12 C).

20

Conclusión

25 Este resultado muestra que se pueden producir VLPs de AAV en células de insecto tan eficientemente como en células de mamífero. Los datos muestran que en células de insecto también parece que se requiere la secuencia de VP3 del extremo N y es suficiente para el eficiente ensamblaje de cápside de VP3. Adicionalmente, un cambio del codón de iniciación de VP2 de ACG a ATG va acompañado de pérdida de eficiencia en el ensamblaje de cápside (Fig. 12 C). Los presentes inventores especulan que el ensamblaje de partículas de pVL_VP2 va acompañado de menor expresión de VP3 iniciada a partir de un ATG de VP3 que se dejó intacto en la construcción.

30

10. Cápsides compuestas esencialmente de VP3 toleran inserciones de polipéptidos

10.1. Generación de partículas de tipo virus (VLP) que contienen epítopes en la posición I-587

35 Para clonar vectores de expresión que codifican VLPs compuestas de proteínas de la cápside de VP3 que contienen una secuencia de epítopes particular en la posición I-587, se clonó primero la secuencia de epítopes en la secuencia codificante de VP de pUCAV2 en el sitio correspondiente a I-587 (número de aminoácido con respecto a la proteína VP1 de AAV-2) y posteriormente se subclonó en el vector pCIVP2mutACG.

40 La generación de vector pUCAV2 se describe en detalle en el documento de patente US 6.846.665. Básicamente, este vector contenía el genoma completo de AAV2 (fragmento BglIII) derivado de pAV2 (Laughlin et al., 1983) clonado en el sitio de restricción BamHI de pUC19. pUCAV2 se modificó adicionalmente por introducción de un sitio de restricción NotI y Ascl que permitía la inserción de secuencias de epítopes en la posición I-587 de la cápside de AAV2 (documento de patente PCT/EP2008/004366). Además, un sitio de restricción FseI localizado entre la posición 453 (número de aminoácido con respecto a la proteína VP1 de AAV-2) y I-587 587 se introdujo en marco entre la secuencia codificante de VP del vector por mutagénesis dirigida al sitio.

45

50 Para la clonación de secuencias de epítopes en pUCAV2 modificado, se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido que codifican el epítope respectivo con una secuencia de adaptador de alanina o glicina y contienen una extensión de sitio de 5'. La extensión de sitio de 5' de los oligonucleótidos se diseñó de manera que la hibridación de los oligonucleótidos sentido y antisentido diera como resultado un ADNbc con nucleótidos protuberantes en el sitio 5' y el sitio 3' compatibles con nucleótidos protuberantes generados por restricción de NotI y Ascl de pUCAV2 modificado. Las secuencias de los oligonucleótidos y las secuencias de epítopes respectivas se resumen en la Tabla 4. Cada uno de los epítopes insertados está flanqueado por un adaptador según el siguiente esquema (X_n representa la secuencia de epítopes):

55

Adaptador tipo I: (Ala)₂-(Gly)₃-X_n-(Gly)₄-Ala
 Adaptador tipo II: (Ala)₂-(Gly)₄-X_n-(Gly)₄-Ala
 Adaptador tipo III: (Ala)₃-(Gly)₅-X_n-(Gly)₅-(Ala)₂
 Adaptador tipo IV: (Ala)₅-X_n-(Ala)₅

60

Para hibridar los oligonucleótidos, se mezclaron 50,0 µg del oligonucleótido sentido y 50,0 µg del oligonucleótido

antisentido en un volumen total de 200 µl de 1x tampón de PCR (Qiagen) y se incubaron durante 3 min a 95 °C en una termomezcladora. Después de 3 min a 95 °C, se apagó la termomezcladora y los tubos se dejaron en la estufa de incubación durante 2 h adicionales para permitir la hibridación de los oligonucleótidos durante el enfriamiento de la estufa de incubación. Para clonar los oligonucleótidos hibridados en pUCAV2 en I-587, se linealizó el vector por restricción con NotI y Ascl y se realizó la reacción de clonación usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche). Brevemente, se diluyeron los oligonucleótidos hibridados 10 veces en 1x tampón de dilución de ADN y se incubaron durante 5 min a 50 °C. Se usaron 100 ng de los oligonucleótidos hibridados y 50 ng de vector linealizado con NotI /Ascl pUCAV2 en la reacción de ligación, que se realizó según las instrucciones del fabricante del kit Rapid DNA Ligation (Roche). Se transformaron XL1 blue o DH5a de *E. coli* con una alícuota de la reacción de ligación y se sembraron en placas de agar de LB-Amp. Se prepararon los plásmidos según procedimientos convencionales y se analizaron por secuenciación.

Para la generación de VLPs vacíos compuestos por proteínas VP3 que contienen una secuencia de epítopes en I-587, se subclonó el fragmento de restricción BsiVVI / XcmI de pUCAV2 que contenía el epítipo en I-587 en el vector pCIVP2mutACG según procedimientos convencionales. El vector pCIVP2mutACG contenía las secuencias codificante solapantes de VP2 y VP3 de AAV2 clonadas en el sitio XhoI /NotI de pCI (Promega). En pCIVP2mutACG, se destruye el codón de iniciación ACG de VP2 y se sustituye por un codón GAG. La sustitución se realizó por amplificación por PCR de las secuencias codificantes de VP2 y VP3 de AAV2 usando cebadores específicos de VP2 y el plásmido pCIVP2 como molde (el vector pCIVP2 contenía la secuencia codificante de VP2 y VP3 natural clonada en el policonector de pCI). El cebador directo usado para la PCR se hibrida con el sitio 5' de la secuencia codificante de VP2 y contiene la sustitución del codón de iniciación ACG de VP2 por un codón GAG. Además, el cebador directo contiene una secuencia de reconocimiento de XhoI en el sitio 5'. Se hibridó el cebador inverso con el extremo 3' de la secuencia codificante de VP2 / VP3 y contuvo una secuencia de reconocimiento de NotI en su sitio 5'. El producto de PCR resultante se clonó en el sitio XhoI / NotI de pCI.

Se usaron los vectores resultantes para la producción de VLPs por transfección de células 293-T. Se sembraron células (5 x 10⁵/placa) en placas de 6 cm 24 h antes de la transfección. Se transfectaron células 293-T por precipitación con fosfato de calcio como se describe en el documento de patente US 2004/0053410. Posteriormente, se lisaron células 293-T en el medio durante tres rondas de ciclos de congelación (-80 °C) y descongelación (37 °C). Se clarificó el lisado (3 ml de volumen total) por centrifugación y se determinó el título de cápsides de VLP usando un ELISA comercialmente disponible (ELISA de valoración de AAV; Progen, Heidelberg, Alemania). Los títulos de VLP variaron entre 2,1 E+12 y 9,8 E+12 cápsides/ml (Tabla 5). Se usó el clon TP18 de VLP directamente para encapsidación a gran escala (como se describe en el Ejemplo 1). Contuvo 1,2E+13 cápsides/ml dentro del lisado en bruto (Tabla 5).

10.2. Generación de partículas de tipo virus (VLP) que contienen epítopes en la posición I-587 y I-453 de la cápside

Para clonar vectores de expresión que codifican VLPs compuestas de proteínas de la cápside VP3 que contienen secuencias de epítopes en la posición I-453 y I-587 (número de aminoácido con respecto a la proteína VP1 de AAV-2), se clonó la primera secuencia de epítopes en pCIVP2mutACG en el sitio correspondientes a I-587 como se ha descrito anteriormente.

La segunda secuencia de epítopes se clonó inicialmente en el sitio de restricción NotI / Ascl del vector pCIVP2-I453-NotI-Ascl (descrito en: documento de patente WO 2008/145400). Brevemente, se creó el vector pCI-VP2-I453-Not-Ascl por amplificación por PCR del gen de VP2 de AAV2 y clonación del producto de PCR respectivo en el sitio XhoI / NotI del vector pCI (Promega). El vector resultante pCIVP2 se modificó por destrucción del sitio de restricción NotI del sitio de clonación por mutagénesis dirigida al sitio. El vector se modificó adicionalmente por introducción de un sitio de restricción NotI y Ascl singular novedoso que permitió la inserción de secuencias de epítopes en la posición I-453 de la cápside de AAV2. Además, se introdujo en el marco un sitio FseI localizado entre I-453 y I-587 en la secuencia codificante de VP de pCIVP2-I453-NotI-Ascl por mutagénesis dirigida al sitio. Para clonar secuencias de epítopes en el sitio NotI / Ascl del vector, se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido que codifican el epítipo respectivo con una secuencia adaptadora de alanina / glicina y contienen una extensión del sitio 5'. La extensión del sitio 5' de los oligonucleótidos se diseñó de manera que la hibridación de los oligonucleótidos sentido y antisentido diera como resultado un ADNbc con nucleótidos protuberantes del sitio 5' y del sitio 3' compatibles con nucleótidos protuberantes generados por restricción con NotI y Ascl de pCIVP2-I453-Not-Ascl. La clonación de los oligonucleótidos hibridados se realizó como se ha descrito anteriormente.

Las secuencias de los oligonucleótidos y las secuencias de epítopes respectivas se resumen en la Tabla 6. Cada uno de los epítopes insertados está flanqueado por un adaptador según el siguiente esquema (X_n representa la secuencia de epítopes):
(Ala)₂-(Gly)₃-X_n-(Gly)₄-Ala

Para la generación de epítopes que presentan VLPs bivalentes (epítipo murino de TNFα o IL-17) en I-453 y I-587, se subclonó el fragmento BsiWI / FseI de pCIVP2-I453-NotI-Ascl que contenía un epítipo dado insertado en I-453 en el vector pCIVP2mutACG que contenía un epítipo particular insertado en I-587 (descritos anteriormente). El vector resultante se usó para la producción de VLPs bivalentes por transfección de células 293-T como se ha

descrito anteriormente (Ejemplo 1.2) (escala de placa de 6 pocillos). La producción de partículas se analizó por ELISA (ELISA de valoración de AAV2; Progen). Los resultados se muestran en la Tabla 7. Estos datos demuestran que se pueden producir VLPs compuestas de proteínas VP3 con inserciones de epítopes en I-453 y I-587 con altos títulos de cápsides.

5

Tabla 4: Oligonucleótidos usados para la clonación de secuencias de epítopos en I-587

Nombre / Sec. de péptido	Tipo	oligonucleótido sentido	oligonucleótido antisentido	Adaptador
CETP TP-18 DISVTGAPVIT ATYL	Epítoto de CETP de conejo	5'GGCCGGCGGAGGTGACAT CAGGTGACCCGGTGACCCG TGATCACCCACCTACCTG GGGGTGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 85)	5'CGCGCACCGCCACCCCC CAGGTAGGTGGCGGTGATC ACGGGTGCACCGGTACCGC TGATGTCACTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 86)	Tipo I
3Dept-3 DSNPRGVSAY LSR	Epítoto de IgE humana	5'GGCCGGCGGAGGTGATGA CAGCAACCCTAGAGGCGTGA GGCCTACTTGAGCAGAGGG GGTGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 87)	5'CGCGCACCGCCACCCCC TCTGCTCAGGTAGGCGCTC ACGCCTCTAGGGTTGCTGT CACCACTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 88)	Tipo II
Kricek VNL TWSRAG	Epítoto de IgE humana	5'GGCCGGCGGAGGTGAA CCTGACTGGAGCAGACCT CCGGCGCGCGGCGCGG 3' (SEQ ID NO: 89)	5'CGCGCGCGCGCGCGCGC GCCGGAGGCTCTGCTCCAG GTCAGGTTACCGCGCGCTG C3' (SEQ ID NO: 90)	Tipo IV
TNF α -V1 SSQNSSDKPV AHVVANHQVE	Epítoto de TNF α murino	5'GGCCGGCGGAGGTAGCAG CCAGAACAGACGACAAAGC CCGTGGCCACGTTGGTCT AACCAACAGGTGAGGGGG TGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 91)	5'CGCGCACCGCCACCCCC CTCCACCTGGTGGTTAGCC ACCACGTGGGCCACGGGCT TGTCGCTGCTGTTCTGGCT GCTACCTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 92)	Tipo I
IL-17-V1 NAEGLDHH MNSVL	Epítoto de IL-17 murina	5'GGCCGGCGGAGGTAAACGC CGAGGGCAAGCTTGACCACC ACATGAACAGCGTCTGGGG GGTGGCGGTG 3' (SEQ ID NO: 93)	5'CGCGCACCGCCACCCCC CAGCACGCTGTTTCAATGFG TGGTCAAGCTTGCCCTCGG CGTTACCTCCGCC 3' (SEQ ID NO: 94)	Tipo I
IL-6-V2 LEEFLKVTLSR	Epítoto de IL-6 murina	5'GGCCGGCGGAGGTCTGGA GGATTCCTGAAGGTGACCC TGAGAAAGCGGGGTGGCGGT G 3' (SEQ ID NO: 95)	5'CGCGCACCGCCACCCCC GCTTCTCAGGGTCACTTC AGGAATTCCTCCAGACCTC CGCC 3' (SEQ ID NO: 96)	Tipo I
A β (1-9) DAEFRHDSG	Epítoto de amiloide- β humano	5'GGCCGGCAGCGGAGGGGG AGGCGACCGCGAGTTCAGAC ACGACAGCGGCGGAGGG GGAGGGCGGG 3' (SEQ ID NO: 97)	5'CGCGCGCGCGCTCCCCC TCCGCCCGCGCTGTGCTGT CTGAACCTCGGCTCGCCTC CCCCCTCCGCCCTGC 3' (SEQ ID NO: 98)	Tipo III

Tabla 5: Producción a pequeña escala de diferentes VLPs

Nombre	Epítoto en I-587	Título (cápsides/ml)
VLP-TP18	CETP TP18 DISVTGAPVITATYL (SEQ ID NO: 99)	1,2 E+13(*)
VLP-3Dipi3	3Dipi-3 DSNPRGVSAVLSR (SEQ ID NO: 100)	2,1 E+12
VLP-Kricek	Kricek VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 101)	2,6 E+12
VLP-TNF α	TNF α -V1 SSQNSSDKPVAHWANHQVE (SEQ ID NO: 102)	9,8 E+12
VLP-IL-17	IL-17-V1 NAEGKLDHMMNSVL (SEQ ID NO: 103)	5,6 E+12
VLP-IL-6	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 104)	5,6 E+12
VLP-A β	A β (1-9) DAEFRHDSG (SEQ ID NO: 105)	6,2 E+12
(*) Encapsidación a gran escala		

Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la clonación de secuencias de epítopos en I-453

Nombre / Sec. de péptido	Tipo	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
TNF α -V1 SSQNSSDKPVA HWANHQVE	Epítipo de TNF α murina	5' GGCCGCCGGTGGAGGCAG CAGCCAGAACAGCAGCGACA AGCCCGTGGCCACCGTGGTG GCTAACCAACAGGTGGAGGG CGGTGGAGG 3' (SEQ ID NO: 106)	5' CGCGCCCTCCACCGCCCTCCAC CTGGTGGTTAGCCACACCGTGGGC CACGGGCTTGTGCTGCTGTTCTG GCTGCTGCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 107)
IL-17-V1 NAEKLDHMHN SVL	Epítipo de IL-17 murina	5' GGCCGCCGGTGGAGGCAG CGCCGAGGCCAAGCTTGACC ACCACATGAACAGCGTGTGCTG GGCGGTGGAGG 3' (SEQ ID NO: 108)	5' CGCGCCCTCCACCGCCCTCCAC GCTGTTCAATGTTGGTCAAGCTT GCCCTCGGGGTTGCCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 109)
IL-6-V2LEEFLLKVTLS	Epítipo de IL-6 murina	5' GGCCGCCGGTGGAGGCCT GGAGGAATTCCTGAAGGTGA CCCTGAGAAAGCGCGGTGGA GGG 3' (SEQ ID NO: 110)	5' CGCGCCCTCCACCGCGGCTTCT CAGGGTCACCTTCAGGAATTCCTC CAGGCCTCCACCGGC 3' (SEQ ID NO: 111)

Tabla 7: Producción de VLPs que llevan epítopes en I-453 y I-587

combinación	Epítope en I-453	Epítope en I-587	Título (cápsides/ ml)
TNF- α / IL-17	TNF α -V1 SSQNSSDKPVAHWANHQVE (SEQ ID NO: 112)	IL-17-V1 NAEGKLDHHMNSVL (SEQ ID NO: 113)	7,9E+12
TNF- α / IL-6	TNF α -V1 SSQNSSDKPVAHWANHQVE (SEQ ID NO: 114)	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 115)	8,5E+12
IL-17 / TNF- α	IL-17-V1 NAEGKLDHHMNSVL (SEQ ID NO: 116)	TNF α -V1 SSQNSSDKPVAHWANHQVE (SEQ ID NO: 117)	1,0E+13
IL-6 / TNF- α	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 118)	TNF α -V1 SSQNSSDKPVAHWANHQVE (SEQ ID NO: 119)	1,0E+13
IL-17 / IL-6	IL-17-V1 NAEGKLDHHMNSVL (SEQ ID NO: 120)	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 121)	3,9E+12
IL-6 / IL-17	IL-6-V2 LEEFLKVTLRS (SEQ ID NO: 122)	IL-17-V1 NAEGKLDHHMNSVL (SEQ ID NO: 123)	8,9E+12

10.3. Conclusión

5 Las partículas VP3 toleran inserciones y se pueden usar, por tanto, como un medicamento tal como una vacuna, por ejemplo, por inserción de epítopes de linfocitos B.

11. Ensamblaje de cápside de VP3 de diferentes serotipos de AAV

10 11.1. Construcciones de delección de AAV1

Para analizar si estos hallazgos pueden ser conferidos a otros serotipos, se probó una configuración análoga de construcciones para AAV1.

15 Se clonaron las siguientes construcciones:

- pCI_VP2/2539_AAV1: Se clonaron VP2 de AAV1 completo más 95 pb de VP1 en pCI (Promega, Mannheim, Alemania). No se mutó el codón de iniciación ACG de VP2.
- 20 • pCI_VP3/2539_AAV1mutACG: Se clonaron VP2 de AAV1 completo más 95 pb de VP1 en pCI. Se mutó el codón de iniciación ACG de VP2 a ACC.
- pCLVP3/2634_AAV1mutACG: Se delecionó completamente la parte de VP1 y se mutó el codón de iniciación ACG de VP2 a ACC.

25 Clonación

Se realizó la clonación de todas las construcciones por procedimientos convencionales de mutagénesis dirigida al sitio usando cebadores modificados (los cebadores usados para mutagénesis dirigida al sitio se enumeran a continuación).

30 Se generó pCI_VP2/2539_AAV1 insertando un sitio NheI de 95 pb aguas arriba del codón de iniciación ACG de VP2 y un sitio XmaI aguas abajo del codón de terminación de VP3. Se generaron mutaciones dentro de pUCrep/fs/cap_AAV1_I588 (descrito dentro del documento de patente PCT/EP2008/004366). El plásmido resultante se digirió con NheI y XmaI. El fragmento generado se clonó en el vector pCI-VP2 (descrito en el documento de patente PCT/EP2008/004366). Cebadores:

AAV1 NheI VP2plus95bp: 5'-GAG CGT CTG CTA GCA GAT ACC TCT TTT GGG G-3' (SEQ ID NO: 124)
AAV1 VP3 Xma rev: 5'-GAA ACG AAT CAC CCG GGT TAT TGA TTA AC-3' (SEQ ID NO: 125)

40 Se generó pCI_VP3/2539_AAV1mutACG mutando el codón de iniciación ACG a ACC dentro de pCIVP2/2539_AAV1. Cebador:

AAV1 VP2ko for: 5'-GGC GCT AAG ACC GCT CCT GGA AAG-3' (SEQ ID NO: 126)
AAV1 VP2ko rev: 5'-CTT TCC AGG AGC GGT CTT AGC GCC-3' (SEQ ID NO: 127)

Se generó pCI_VP3/2634_AAV1mutACG delecionando los 95 pb directamente aguas arriba del codón de iniciación ACG de VP2 y mutando por la misma etapa el codón de iniciación ACG a ACC dentro de pCIVP2_AAV1. Cebador:

AAV1 VP2ko VP1del for: 5' -ACG ACT CAC TAT AGG CTA GCA GGC GCT AAG ACC
 GCT CCT GGA AAG-3' (SEQ ID NO: 128)
 AAV1 VP2ko VP1del rev: 5' -CTT TCC AGG AGC GGT CTT AGC GCC TGC TAG CCT
 ATA GTG AGT CGT-3' (SEQ ID NO: 129)

5 Se controló el ensamblaje de las cápsides de AAV1 dentro de lisados en bruto después de la transfección de células 293 con el plásmido respectivo. Se determinó el título de cápsides por un ELISA de valoración de AAV1 (Progen, Heidelberg, Alemania) según el manual del fabricante. Fue comparable la eficiencia de ensamblaje de las tres construcciones de AAV1. La construcción pCI_VP3/2634_AAV1mutACG dio un título de 10^{13} partículas/ml, confirmando el hecho de que la generación de cápsides de partículas de AAV1 es generalmente más eficiente que la de partículas de AAV2. En el análisis de transferencia Western fueron detectables proteínas VP2 y VP3 para la construcción pCI_VP2/2539_AAV1 y solo VP3 fue detectable para pCI_VP3/2539_AAV1 mutACG y pCI_VP3/2634_AAV1 mutACG, respectivamente (Fig. 13).

15 Como control para la expresión de proteínas de la cápside, se transfectó pUCAV1. pUCAV1 contenía el marco de lectura abierto de Cap de AAV1 completo que codifica VP1, VP2 y VP3 de AAV1. pUCAV1 se describe en detalle en la presentación de PCT PCT/EP2008/004366 (aquí se denomina "pUCAV1_Agel").

11.2. Trans-complementación de construcciones de VP3 de AAV1 conducidas por pCMV

20 Para ver si los experimentos de trans-complementación descritos en el Ejemplo 5 pueden ser conferidos a otros serotipos, se clonaron construcciones análogas de pCMV-VP3/2809 (AAV2) para AAV1.

11.2.1. Clonación

25 Se clonó pCMV_AAV1VP3/2829 como sigue: por mutagénesis se introdujo directamente un sitio de restricción HindIII antes del codón de iniciación ATG de VP3 del plásmido pUCrep/fs/cap_AAV1 (descrito dentro del documento de patente PCT/EP2008/004366) usando los cebadores indicados a continuación. El plásmido resultante se digirió con AgeI. Se terminó como el sitio Age I con polimerasa de Klenow y la construcción se digirió posteriormente con HindIII. Se clonó el fragmento generado en el esqueleto de pBSCMV digerido con HindIII/HincII. Se generó pBSCMV por inserción de un promotor BamHI de 650 pb del fragmento de CMV en el sitio BamHI del vector BluescriptII SK+ (Stratagene, Ámsterdam, Los Países Bajos) descrito por Wistuba et al, 1997. Cebador de mutagénesis de Hind III:

Directo: 5'-CGC TGC TGT GGG ACC TAA GCT TAT GGC TTC AGG CGG TGG CG-3' (SEQ ID NO: 130)
 Inverso: 5'-CGC CAC CGC CTG AAG CCA TAA GCT TAG GTC CCA CAG CAG CG-3' (SEQ ID NO: 131)

11.2.2. Ensayo de trans-complementación

35 Se realizó trans-complementación con la construcción pVP2N-gfp de AAV2 como se describe en el Ejemplo 3. Se transfectaron las células con el plásmido pCMV-VP3 de o bien AAV2 (pCMV_VP3/2809) o AAV1 (pCMV_AAV1VP3/2829) con o sin cotransfección de pVP2N-gfp (Fig. 14). Se transfectaron las mismas relaciones molares de construcción de VP3 y pVP2N-gfp. Se analizó la expresión de proteínas por transferencia Western y se midió la eficiencia de formación de partículas por ELISA.

11.2.3. Resultado y conclusión

45 Se rescató el ensamblaje de partículas de AAV1 analizado por un ELISA de AAV1 (Progen, Heidelberg) por trans-complementación con pVP2N-gfp derivada de AAV2. No se puede indicar la eficiencia del rescate ya que los presentes inventores no compararon la cotransfección de pCMV_AAV1VP3/2829 y pVP2N-gfp con la transfección de pCIVP3/2634_AAV1mutACG (véase el Capítulo 11.1 anteriormente). Por tanto, los presentes inventores todavía no clonaron ni probaron un plásmido de trans-complementación de AAV1 pVP2N-Gfp. El título de partículas medido para VP3 de AAV2 trans-complementada fue $2,1E11$. Para VP3 de AAV1, el título obtenido fue $3,4E10$ (no es posible una comparación directa de los títulos de AAV1 y AAV2 debido al uso de diferentes ELISAs).

50 Los resultados indican que AAV1 hace uso del mismo mecanismo para el ensamblaje de cápside que AAV2 y que el fragmento Z y VP3 son intercambiables con diferentes serotipos de AAV.

11.3. La inserción de polipéptidos dentro de I588 de AAV1 es tolerada

55 Aquí se investigó si partículas AAV1 vacías, esencialmente VP3, toleran inserciones dentro de la posición de

aminoácidos 588.

Para clonar secuencias de epítopes en pUCAV1-AgeI-1588 (descrito en el documento de patente PCT/EP2008/004366), se diseñaron oligonucleótidos sentido y antisentido que codifican el epítipo respectivo con una secuencia de adaptador de glicina. Tras la hibridación de ambos oligonucleótidos, se generan nucleótidos protuberantes de 5' y 3' que son compatibles con los nucleótidos protuberantes generados por restricción de NotI y Ascl de pUCAV1-AgeI-1588. Las secuencias de los oligonucleótidos y las secuencias de epítipes respectivas investigadas se resumen en la Tabla 4. Cada uno de los epítipes insertados está flanqueado por un adaptador según el siguiente esquema (X_n representa la secuencia de epítipes): Ser(588)-(Ala)₂-(Gly)₅-X_n-(Gly)₅-Thr(589)

Oligonucleótidos para la clonación del epítipo de IgE humana "Kricek"

Secuencia de aminoácidos: VNLTWSRASG
 Oligonucleótido sentido: 5'-g gcc gca gcc gca gtg aac ctg acc tgg agc aga gcc tcc ggc gcg gca gct gca gct-3' (SEQ ID NO: 132)
 Oligonucleótido antisentido: 5'-c gcg agc tgc agc tgc cgc gcc gga ggc tct gct cca ggt cag gtt cac tgc ggc tgc-3' (SEQ ID NO: 133)

Oligonucleótidos para la clonación del epítipo de IgE humana "3Depi-3"

Secuencia de aminoácidos: DSNPRGVSA YLSR
 Oligonucleótido sentido: 5'-GGCC GGC GGT GGA GGC GGT GAC AGC AAC CCT AGA GGC GTG AGC GCC TAC CTG AGC AGA GGA GGC GGT GGA GGG-3' (SEQ ID NO: 134)
 Oligonucleótido antisentido: 5'-CGCG CCC TCC ACC GCC TCC TCT GCT CAG GTA GGC GCT CAC GCC TCT AGG GTT GCT GTC ACC GCC TCC ACC GCC-3' (SEQ ID NO: 135)

El procedimiento preciso de clonación usado corresponde al protocolo usado para la inserción de epítipes en I587 de AAV2 descrito en el Ejemplo 10.

Para la generación de VLPs vacías de AAV1 compuestas de esencialmente proteínas VP3 que contienen una secuencia de epítipes en I-588, se subclonó el fragmento de restricción BsiVVI / SphI de pUCAV1-AgeI-1588 que lleva el epítipo en I-588 en el vector pCIVP3/2634_AAV1 mutACG (descrito en el Ejemplo 11.1) según procedimientos convencionales.

Se usaron los vectores resultantes para la producción de VLPs de AAV1 por transfección de células 293-T como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 1.2.) Los títulos se determinaron por un ELISA de AAV1 comercial (Progen, Heidelberg, Alemania). Se obtuvieron altos títulos de 3,6E13/ml (Kricek) y 9,2E13/ml (3Depi-3), que indica que las inserciones dentro de AAV1 588 (que son homólogas a AAV2 587) son bien toleradas y que las partículas VP3 de AAV1 se pueden usar como vehículo de vacuna.

12. ORF2 comprende el fragmento Z y codifica AAP.

El detallado análisis de secuencias reveló que el fragmento Z codifica una parte significativa de la nueva "proteína activadora del ensamblaje" (AAP). La Fig. 16 da una visión general y la Fig. 17 muestra con más detalle la posición de ORF2 y la proteína codificada AAP en relación con el gen cap y la posición de los codones de iniciación de la traducción de las proteínas Cap VP1, VP2 y VP3, así como la localización del fragmento Z y los sitios de restricción EcoNI y BsiWI. Las tres proteínas Cap VP1, VP2 y VP3 se traducen del mismo ORF del gen cap (también denominado el primer ORF, ORF1), mientras que AAP se traduce de un marco de lectura diferente (denominado el segundo ORF, ORF2). Para VP1, VP2 y VP3, se dan los números de los puntos de inicio de la traducción bien definidos, mientras que para AAP no se conoce definitivamente.

En la Fig. 17 se da la secuencia de ORF2 (627 nucleótidos, SEQ ID NO: 23) y la secuencia de proteínas de AAP respectiva (208 aminoácidos, SEQ ID NO: 1) para AAV2 como se extrae del número de entrada de NCBI NC_001401.

Se extrajeron las secuencias de los marcos de lectura abiertos respectivos y las proteínas de algunos otros parvovirus de las secuencias de genes de la cápside disponibles en la base de datos de NCBI y se dan en detalle en

SEQ ID NO: 2-44 como se enumera en la Tabla 8.

Tabla 8: Números de entrada de NCBI y números de SEQ IDs de AAP correspondientes que codifican secuencias de nucleótidos y de proteínas de diferentes parvovirus.

parvovirus	Nº de entrada de nt en NCBI	ORF2 respectivo	Longitud de ORF2 / nt	proteína codificada AAP	Longitud de AAP / AA
AAV2	NC_001401	SEQ ID NO: 23	627	SEQ ID NO: 1	208
AAV1	NC_002077	SEQ ID NO: 24	678	SEQ ID NO: 2	225
AAV3b	AF028705	SEQ ID NO: 25	627	SEQ ID NO: 3	208
AAV4	NC_001829	SEQ ID NO: 26	597	SEQ ID NO: 4	198
AAV5	NC_006152	SEQ ID NO: 27	681	SEQ ID NO: 5	226
AAV6	AF028704	SEQ ID NO: 28	678	SEQ ID NO: 6	225
AAV7	NC_006260	SEQ ID NO: 29	681	SEQ ID NO: 7	226
AAV8	NC_006261	SEQ ID NO: 30	684	SEQ ID NO: 8	227
AAV9	AY530579	SEQ ID NO: 31	681	SEQ ID NO: 9	226
AAV10	AY631965	SEQ ID NO: 32	606	SEQ ID NO: 10	201
AAV11	AY631966	SEQ ID NO: 33	594	SEQ ID NO: 11	197
AAV12	DQ813647	SEQ ID NO: 34	621	SEQ ID NO: 12	206
b-AAV (bovino)	NC_005889	SEQ ID NO: 35	600	SEQ ID NO: 13	199
AAV aviar ATCC VR-865	AY186198	SEQ ID NO: 36	789	SEQ ID NO: 14	262
Cepa DA-1 de AAV aviar	AY629583	SEQ ID NO: 142	723	SEQ ID NO: 143	240
AAV13	EU285562	SEQ ID NO: 37	627	SEQ ID NO: 15	208
AAV1 de ratón	DQ100362	SEQ ID NO: 38	534	SEQ ID NO: 16	177
Cepa DA-1 de AAV aviar	AY629583	SEQ ID NO: 39	723	SEQ ID NO: 17	240
Cepa aislada de AAV1 caprino	AY724675	SEQ ID NO: 40	581	SEQ ID NO: 18	226
AAV-Go.1					
AAV1 de rata	DQ100363	SEQ ID NO: 41	756	SEQ ID NO: 19	251
Cepa DB3 de parvovirus de ganso	EU088102	SEQ ID NO: 42	639	SEQ ID NO: 20	212
Cepa 90-0219 de parvovirus de pato	AY382892	SEQ ID NO: 43	693	SEQ ID NO: 21	230
Parvovirus 1 de serpiente	AY349010	SEQ ID NO: 44	600	SEQ ID NO: 22	199

5 Para la comparación de secuencias, en la Fig. 27 se da un alineamiento de las secuencias de proteínas de AAP predichas derivadas de ORF2 del gen cap de algunos parvovirus.

10 En la construcción pVP2N-gfp, se insertó el fragmento EcoNI/BsiVVI de pTAV2.0 aguas abajo de un promotor del CMV y aguas arriba de la cds de GFP del vector pEGFP-N1 (Ejemplo 3.1/Fig. 6A y Ejemplo 13/Fig. 19A). Puesto que el sitio BsiVVI se localiza aproximadamente 90 nucleótidos aguas arriba del extremo 3' de ORF2, el vector pVP2N-gfp codifica la AAP troncada del extremo C (denominada AAPtru) que es tan activa en trans-complementación como AAP expresada de ORF2 de longitud completa (véase, por ejemplo, la Fig. 21).

15 13. La modificación de codones confirma que la expresión de proteína funcional de ORF2 es necesaria para la trans-complementación

20 Para investigar la naturaleza de la actividad de trans-complementación de ORF2, se modificó en los codones (cm) la secuencia entre el fragmento de restricción EcoNI/BsiVVI.

25 La primera secuencia de ADN mutante se denominó ORF1cm. Se alteró la secuencia de ADN del mutante de tal forma que el primer marco de lectura que codifica la proteína de la cápside siguiera intacto, mientras que se cambió el segundo marco de lectura que codifica AAP. Como resultado, la secuencia codifica proteína de la cápside natural pero ya no AAP funcionalmente activa. La identidad de la secuencia de ADN de pVP2N-gfp frente a pVP2N/ORF1cm-gfp es 71 %, mientras que la identidad de proteína en el primer marco de lectura es 100 %.

30 La segunda secuencia de ADN mutante se denominó ORF2cm y se alteró en el primer marco de lectura, que significa que ya no codificó una proteína de la cápside funcionalmente activa, pero se pudo expresar la AAP funcionalmente intacta. La identidad de la secuencia de ADN de pVP2N-gfp frente a pVP2N/ORF2cm-gfp es 79 %, mientras que la identidad de proteínas en el segundo marco de lectura es 100 %.

35 Las secuencias de ORF1cm y ORF2cm se dan en las Figs. 18A y 18B, respectivamente. Como ya se ha descrito en el Ejemplo 5, se realizó la modificación en los codones por GENEART (Regensburg, Alemania). Los codones se modificaron para los codones preferencialmente usados en células de mamífero.

Como se describe en el Ejemplo 3.1, se generó pVP2N-gfp insertando el fragmento de restricción EcoNI/BsiVVI de pTAV2.0 en el sitio de clonación múltiple de pEGFP-N1. Se generaron las construcciones pVP2N/ORF1cm-gfp y

pVP2N/ORF2cm-gfp de la misma forma, con la diferencia de que los fragmentos EcoNI/BsiVVI de codones modificados se insertaron en el esqueleto de vector correspondiente.

Se comparó la expresión de proteínas de pVP2N/ORF1cm-gfp y pVP2N/ORF2cm-gfp (Fig. 20A) con la de pVP2N-gfp no modificada (Fig. 20B) en análisis de transferencia Western. Se probó la capacidad de rescatar la formación de cápsides de pCMV-VP3/2809 en ensayos de trans-complementación como se describe en el Ejemplo 3. Se cotransfectaron los plásmidos en una relación molar de 1:1 (Fig. 20C).

Resultado y conclusión

Como ya se ha descrito en el Ejemplo 3 y mostrado en la Fig. 6, el análisis de transferencia Western usando el anticuerpo monoclonal A69 confirmó la expresión de una proteína de la cápside que comprende el extremo N de VP2 (VP2N-gfp, Fig. 19B) en la construcción de fusión de GFP pVP2N-gfp (Fig. 19A). La complementación del plásmido pCMV-VP3/2809 con diferentes relaciones molares de pVP2N-gfp en células 293-T correspondientes a cantidades decrecientes de pVP2N-gfp co-transfectadas mostró ensamblaje de cápside decreciente tras su cuantificación (Fig. 19C). La determinación del número de cápsides ensambladas también reveló que el mutante de delección pCMV-VP3/2809 co-transfectado con pVP2N-gfp fue casi tan eficiente en el ensamblaje de cápside como el mutante pCMV-VP3/2696, el mutante de delección que mostró formación de cápsides normal (Fig. 5). El ensamblaje se podría detectar incluso a una cantidad 500 veces reducida de plásmido pVP2N-gfp co-transfectado.

Por tanto, es evidente que se puede proporcionar en *trans* la actividad promotora del ensamblaje asociada a las construcciones que contienen secuencias de *cap* aguas arriba del sitio de iniciación de la traducción de VP3.

Como ya se ha descrito por el Ejemplo 5, la expresión de proteínas de la construcción pVP2N/ORF1cm de codones modificados de la Fig. 8B de construcciones de codones modificados fue incluso superior a la expresión de proteínas de la construcción pVP2N-gfp no modificada, puesto que la modificación de los codones se optimizó para células de mamífero. Los niveles de VP3 de pCMV-VP3/2809 co-expresada fueron normales. Sin embargo, no se detectó el ensamblaje de cápside cuando se usa la construcción auxiliar pVP2N/ORF1cm (Fig. 20C). La expresión reducida de la proteína respectiva transfectando menores cantidades de pVP2N/ORF1cm tampoco soportó la formación de cápsides de VP3 (datos no mostrados).

A diferencia, la cápside ensamblada se podría detectar usando la construcción auxiliar pVP2N/ORF2cm (Fig. 20C). Como se ha descrito anteriormente, solo ORF2cm expresa funcionalmente AAP intacta, mientras que en pVP2N/ORF1cm la secuencia de AAP no es funcional y esta construcción de codones modificados codifica únicamente la proteína de la cápside. Por consiguiente, solo pVP2N/ORF2cm rescató el ensamblaje de cápside en la trans-complementación.

Este resultado indica claramente que la actividad de trans-complementación del fragmento Z está mediada por su proteína codificada AAP en ORF2. Los experimentos de codones modificados confirmaron que la expresión de proteína funcional de la cápside en ORF1 no es necesaria para la trans-complementación, pero sí la expresión de AAP funcional en ORF2.

14. Mutación del codón de iniciación predicho de la traducción de AAP

Se analizó en detalle la secuencia de ORF2 como se da en la Fig. 17 para caracterizar adicionalmente el ensamblaje de cápside que media en AAP. ORF2 no contuvo un ATG antes del codón de iniciación de VP3. Se tiene que suponer que se utiliza un codón de iniciación no canónico que está aguas arriba del extremo 5' mínimo definido del fragmento Z en nt 2765. Teniendo en cuenta los requisitos de secuencia en el entorno local de un codón de iniciación, es decir, como se define por Kozak (2002), los presentes inventores predicen que el quinto codón en la posición 2729-2731, que es CTG y codifica una leucina (subrayada en la Fig. 17), es el codón de iniciación no canónico para la traducción de AAP. Para observar su influencia sobre la eficiencia de expresión, el sitio se mutó en ATG y TTG.

Se comparó la expresión de proteínas de versiones marcadas con AU1 de ORF2, concretamente pORF2/CTG-AU1, pORF2/ATG-AU1 y pORF2/TTG-AU1 (Fig. 21A), con la de pVP2N-gfp sin modificar en el análisis de transferencia Western (Fig. 21B). Se probó la capacidad para rescatar la formación de cápsides de pCMV-VP3/2809 en ensayos de trans-complementación como se describe en el Ejemplo 3. Se cotransfectaron los plásmidos en una relación molar de 1:1 (Fig. 21C).

Las construcciones pORF2/CTG-AU1, pORF2/ATG-AU1 y pORF2/TTG-AU1 comprenden todo el ORF2 del gen *cap* (AAV2 nt2717-3340) fusionado con secuencias que codifican una marca de AU1 (Fig. 21A).

Para la generación de construcciones, se realizaron PCRs de pORF2/CTG-AU1, pORF2/ATG-AU1 y pORF2/TTG-AU1 con el molde pTAV2.0 y cebador directo

5'-GGATCGCAAGCTTATTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCC-3' (SEQ ID NO: 136),

5'-GGATCGCAAGCTTATTTTGGTCAGAATGGAGACGCAGACTCAG-3' (SEQ ID NO: 137),
 o
 5'-GGATCGCAAGCTTATTTTGGTCAGATTGGAGACGCAGACTCAG-3' (SEQ ID NO: 138)
 y cebador inverso

5`-GCGGTGTCTCGAGTTATATATAGCGATAGGTGTCGGGTGAGGTATCC
 ATACTGTGGCACCATGAAGAC-3` (SEQ ID NO: 139).

Se insertaron los productos de amplificación digeridos con HindIII/XhoI en el esqueleto de HindIII/XhoI de pBS-CMV-sentido, que se generó por inserción de un fragmento del promotor de citomegalovirus humano (CMV) BamHI de 560 pb de pHCMV-Luci (amablemente proporcionado por K. Butz, German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania) en el sitio BamHI del plásmido Bluescript II SK+ (pBS, Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.).

Resultados y conclusión

Se pudo demostrar la expresión de las proteínas postuladas usando un anticuerpo monoclonal contra la marca AU1 (anti-AU1) para las construcciones pORF2/CTG-AU1 y pORF2/ATG-AU1 (Fig. 21B), mientras que la expresión de la construcción pORF2/TTG estuvo por debajo del nivel de detección. La co-transfección de ORF2 que contenía los plásmidos pORF2/CTG-AU1, pORF2/ATG-AU1 y pORF2/TTG-AU1 con el plásmido de expresión de VP3 pCMV-VP3/2809 dio la formación de cápsides (Fig. 21C) en donde el número de cápsides ensambladas medido por volumen se correlacionó con la cantidad de proteína expresada estimada a partir de la transferencia Western. Los títulos de cápsides obtenidos después de la transfección de pORF2/ATG-AU1 con pCMV-VP3/2809 fueron comparables a los obtenidos después de la co-transfección de pVP2N-gfp con pCMV-VP3/2809. A diferencia, el codón de iniciación TTG que codifica el plásmido estimuló el ensamblaje de cápside en un factor de aproximadamente 10^3 veces menos en comparación con el plásmido pVP2N-gfp. Un antisuero policlonal dirigido contra un péptido de ORF2 indicó claramente la expresión de AAP y detectó, además de la AAP de longitud completa marcada con AU1, también la AAP truncada en el extremo C (AAPtru) expresada de pVP2N-gfp (Fig. 21B).

Tomados conjuntamente, la mutación del supuesto codón de iniciación CTG no canónico en un codón de iniciación ATG fuerte potenció la síntesis de proteínas y el ensamblaje de cápside, mientras que la mutación en un codón que normalmente no es preferido como el codón de iniciación para la síntesis de proteínas redujo significativamente los niveles de proteína y el número de cápsides ensambladas. Este resultado no solo corrobora la conclusión de los presentes inventores de que el producto de proteína de ORF2 promueve el proceso de ensamblaje de cápside. Los resultados indican además que es probable que el codón de iniciación CTG no canónico se use como inicio para la traducción, ya que su mutación en TTG conduce a una reducción significativa de la expresión de AAP.

15. La inserción de codones de terminación en ORF2 confirma que la expresión de AAP funcional es necesaria para la trans-complementación

Además, se realizaron mutaciones en la AAP que codifican el marco de lectura por introducción de codones de terminación en ORF2 para confirmar que la expresión de AAP funcional es necesaria para la trans-complementación.

Se crearon los plásmidos pVP2N/ORF2paradaA-gfp, pVP2N/ORF2paradaB-gfp y pVP2N/ORF2paradaC-gfp por mutagénesis dirigida al sitio (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange, Stratagene) del molde pVP2N-gfp usando dos cebadores de PCR complementarios que incluyeron las sustituciones deseadas. En pVP2N/ORF2paradaA-gfp, se ha mutado el codón tgg₂₈₁₁ a tag, en pVP2N/ORF2paradaB-gfp se ha mutado el codón c_{2831aa} a taa, y en pVP2N/ORF2paradaC-gfp se ha mutado el codón g_{2879aa} a tga (Fig. 22A). Las posiciones son según Ruffing et al. (1994). Ninguna de las mutaciones altera ORF1. En cada caso, el fragmento EcoNI/BsiVVI se clonó luego en el esqueleto de EcoNI/BsiWI de pVP2N-gfp.

Resultados y conclusión

El análisis de transferencia Western confirmó que VP3 se expresa en todas las muestras (detectadas por el anticuerpo monoclonal B1 en la Fig. 22B). Nuevamente, el vector Bluescript (pBS) no provocó el ensamblaje de cápside en el ensayo de trans-complementación (Fig. 22C). La introducción de codones de terminación en ORF2 del gen cap en los tres sitios diferentes (como se indica en la Fig. 22A) no influyó en la expresión de VP2N-gfp (Fig. 22B), mientras que los mutantes que alojan los codones de terminación en ORF2 no mostraron ninguna actividad en el ensamblaje de cápside (Fig. 22C).

Por consiguiente, la expresión de Cap de pVP2n-gfp no es suficiente para el ensamblaje de cápside en el ensayo de trans-complementación. Este resultado soporta claramente la existencia de AAP expresada de un marco de lectura (ORF2) diferente que se solapa con el gen cap, que proporciona la función auxiliar del ensamblaje de cápside.

16. La expresión de AAP funcional rescata el ensamblaje de cápside en el contexto del genoma de AAV

A continuación, los presentes inventores quisieron analizar si la expresión de la "proteína activadora del ensamblaje" AAP recién descubierta era necesaria para el ensamblaje de cápside en el contexto del genoma de AAV completo. Por tanto, se creó la construcción pTAV/ORF1cm clonando el fragmento EcoNI/BsiWI de pVP2N/ORF1cm-gfp (Ejemplo 13) en el esqueleto de EcoNI/BsiWI de pTAV2.0 (Ejemplo 1.2.1.). Por tanto, el plásmido pTAV/ORF1cm (mostrado esquemáticamente en la Fig. 23A) codifica la cápside de AAV2 conocida y proteínas Rep, pero debe ser deficiente en la síntesis de AAP, debido a que los codones del gen cap se modificaron en el segunda marco de lectura (ORF2) sin cambiar el primero que codifica las proteínas Cap (ORF1).

Resultados y conclusión

De hecho, las cuatro proteínas Rep (Rep40, Rep52, Rep68, y Rep78) se expresaron correctamente (datos no mostrados). El análisis de transferencia Western mostró que el patrón de expresión de las tres proteínas VP estaba ligeramente alterado. Se demostró directamente la expresión de AAP endógena del plásmido pTAV2.0 natural, pero no del modificado en los codones pTAV/ORF1cm, usando suero anti-AAP policlonal (Fig. 23B). Como era de esperar, la AAP truncada es detectable tras la co-expresión de pVP2N-gfp.

Se comparó el ensamblaje de cápside de las dos construcciones después de la co-transfección del plásmido pTAV2.0 natural y el plásmido pTAV/ORF1cm de codones modificados con el vector vacío Bluescript (pBS) o con pVP2N-gfp. Como era de esperar, la transfección de pTAV/ORF1cm con pBS no mostró formación de cápsides detectables, puesto que pTAV/ORF1cm expresa las tres proteínas de la cápside pero ni pTAV/ORF1cm ni pBS expresan AAP funcionalmente activa. A diferencia, la transfección de pTAV/ORF1cm con pVP2N-gfp restauró el ensamblaje de cápside al menos parcialmente (Fig. 23C), puesto que AAP truncada en el extremo C, pero activa, se expresa de pVP2N-gfp.

La complementación de pTAV/ORF1cm que es deficiente en la expresión de AAP activa funcional con plásmidos mutantes como pVP2N/ORF1cm-gfp (como se describe en el Ejemplo 13) y pVP2N/ORF2paradaA-gfp (véase el Ejemplo 15), que fueron ambos incapaces de expresar la proteína AAP (debido a la modificación de codones o introducción de un codón de terminación, respectivamente), tampoco condujo a la formación de cápsides. A diferencia, además de pVP2N-gfp, se puede expresar AAP funcionalmente activa de los plásmidos pVP2N/ORF2cm-gfp (descritos en el Ejemplo 13), pORF2/CTG-AU1 y pORF2/ATG-AU1 (véase el Ejemplo 14) y rescató el ensamblaje de cápside en la trans-complementación (Fig. 23D).

Tomados conjuntamente, la formación de cápsides en el contexto del genoma viral completo depende de la expresión de AAP endógeno o complementado.

17. Es necesaria la expresión de AAP funcional para el ensamblaje de cápside en el contexto del genoma de AAV

Para demostrar además que AAP es necesaria para el ensamblaje de cápside en el contexto del genoma completo de AAV, se introdujo un codón de terminación en la secuencia de aminoácidos de AAP que altera ORF2.

Por tanto, se creó la construcción pTAV/ORF2paradaB clonando el fragmento EcoNI/BsiVVI de pVP2N/ORF2paradaB-gfp (para detalles véase el Ejemplo 15) en el esqueleto de EcoNI/BsiVVI de pTAV2.0. (Ejemplo 1.2.1). En pVP2N/ORF2paradaB-gfp, se mutó el codón caa que empieza en el nucleótido 2831 en un codón de terminación taa. Por tanto, el plásmido pTAV/ORF2paradaB (mostrado esquemáticamente en Fig. 24A) codifica la cápside de AAV2 conocida y las proteínas Rep, pero debe ser deficiente en la síntesis de AAP, debido al codón de terminación insertado.

Resultados y conclusión

Nuevamente, se pudo detectar la correcta expresión de las cuatro proteínas Rep en el análisis de transferencia Western (datos no mostrados), así como un patrón de expresión ligeramente alterado de las tres proteínas VP. Se demostró directamente la expresión de AAP endógena del plásmido natural pTAV2.0, pero no del que contenía el codón de terminación, usando suero anti-AAP policlonal (Fig. 24B). Se comparó el ensamblaje de cápside de las dos construcciones después de la co-transfección del plásmido pTAV2.0 natural y el plásmido mutante pTAV/ORF2paradaB con el vector vacío Bluescript (pBS) o con pVP2N-gfp. Como era de esperar, la transfección de pTAV/ORF2paradaB con pBS no mostró formación detectable de cápsides, puesto que pTAV/ORF2paradaB expresa las tres proteínas de la cápside, pero ni pTAV/ORF2paradaB ni pBS expresan funcionalmente AAP activa. A diferencia, la transfección de pTAV/ORF2paradaB con pVP2N-gfp restauró el ensamblaje de cápside al menos parcialmente (Fig. 24C), puesto que AAP truncada en el extremo C, pero activa, se expresa de pVP2N-gfp.

Este resultado confirmó además que la formación de cápsides en el contexto del genoma viral completo depende de la expresión de AAP funcional.

18. La "proteína activadora del ensamblaje" AAP dirige proteínas VP al nucléolo.

Además del Ejemplo 8, se transfectaron varias construcciones en células 293-T para comparar la localización de

proteínas expresadas dentro de la célula transfectada y la eficiencia del ensamblaje.

18.1. Clonación de construcciones

5 La clonación de la construcción pCMV-NLS-VP3 se describe en el Ejemplo 8.1. El enfoque para la generación de pCMV-NoLS-VP3 estuvo de acuerdo con el de pCMV-NLS-VP3, con la diferencia de que se usó el par de cebadores complementario

5`-GGAAT TCGAT ATCAA GCTTG CCATG GCACG GCAGG CCCGG CGGAA TAGAC GGAGA
CGGTG GCGGG AACGG CAGCG GATGG CTACA GGCAG TGG-3` (SEQ ID NO: 140),

10 y

5`-CCACT GCCTG TAGCC ATCCG CTGCC GTTCC CGCCA CCGTC TCCGT CTATT CCGCC
GGGCC TGCCG TGCCA TGGCA AGCTT GATAT CGAAT TCC-3` (SEQ ID NO: 141)

15 Por consiguiente, el producto de gen *cap* NoLS-VP3 contuvo la secuencia de aminoácidos de la señal de localización nucleolar de HIV Rev MARQARRNRRRRWRERQR en el extremo N de VP3. Ambas construcciones se muestran esquemáticamente en la Fig. 25A.

18.2. Análisis de construcciones por inmunofluorescencia

20 Análogo a la configuración experimental descrita en el Ejemplo 8, se transfectaron células HeLa con las diferentes construcciones como se indica. Se analizó la expresión de proteínas de la cápside y la formación de cápsides por inmunofluorescencia como se ha descrito anteriormente usando un antisuero de VP policlonal o el anticuerpo monoclonal A20.

25 18.3. Resultados y conclusión

A partir de la bibliografía que analiza la infección de AAV productiva (por ejemplo, Wistuba et al., 1997), se conoce que el ensamblaje de cápside se puede detectar primero en los nucléolos de células infectadas. Se distribuyó la proteína de la cápside VP3 expresada de pCMV-VP3/2809 en células HeLa a través del núcleo celular y el citoplasma y se excluyó de los nucléolos (como se muestra en Fig. 11B) y no fueron detectables cápsides en estas células tras la tinción con anticuerpo monoclonal A20 específico de cápside. Pero si AAP se co-expresa co-transfectando pVP2N-gfp, se podrían detectar la translocación de una parte significativa de la proteína VP3 a nucléolos y la formación de cápsides.

35 Como se describe en el Ejemplo 8, los presentes inventores expresaron la construcción pCMV-NLS-VP3 y observaron la fuerte acumulación nuclear de VP3 fusionada con la señal de localización nucleolar (NLS) de SV40, que sin embargo se excluyó de los nucléolos y no provocó el ensamblaje de cápside (Fig. 11B). La co-expresión de AAP del plásmido pVP2N-gfp dirigió, sin embargo, otra vez una porción de proteínas NLS-VP3 a los nucléolos donde fue detectable la formación de cápsides.

40 De forma interesante, la proteína AAP expresada de pORF2/ATG-AU1 (descrita en el Ejemplo 14) y teñida con anticuerpo anti-AU1 se co-localizó con fibrilarina en los nucléolos (Fig. 25C, la imagen de contraste de fases a la izquierda confirma la localización de los nucléolos en el sitio de tinción).

45 Este resultado sugirió que AAP co-transporta proteínas VP a los nucléolos, que es un requisito previo para el posterior ensamblaje de cápside.

50 Cuando se expresó la construcción pCMV-NoLS-VP3, los presentes inventores observaron localización al menos parcialmente nucleolar de VP3 fusionada con la señal de localización nucleolar derivada de HIV REV, pero sorprendentemente no se pudo detectar el ensamblaje de cápside (Fig. 25B). Por tanto, pareció que la transferencia de proteínas VP a los nucléolos no es suficiente para la formación de cápsides. Otra vez, la co-expresión de AAP de pVP2N-gfp promovió la formación de cápsides, que confirma que AAP no solo dirige proteínas VP a los nucléolos, sino que desempeña una función positiva adicional en la reacción de ensamblaje. Este ejemplo también muestra que las inserciones del extremo N de VP3 (1-203) son toleradas, aunque una secuencia de NoLS 17-mera altamente positivamente cargada parece interferir parcialmente con los títulos de VLP.

19. La expresión de AAP funcional es necesaria para el ensamblaje de cápside.

60 Además de las imágenes de inmunofluorescencia observadas en el Ejemplo 18, los presentes inventores analizaron la expresión de proteínas de las construcciones mutantes respectivas pCMV-NLS-VP3 y pCMV-NoLS-VP3 en transferencias Western. Además, los presentes inventores cuantificaron la actividad de ensamblaje de cápside de

las construcciones respectivas por ELISA de cápsides de anticuerpo monoclonal A20.

Resultados y conclusión

5 El análisis de transferencia Western confirmó la expresión de VP3 de pCMV-VP3/2809 y las proteínas NLS-VP3 y NoLS-VP3 ligeramente más largas de pCMV-NLS-VP3 y pCMV-NoLS-VP3, respectivamente (Fig. 26A).

10 Como ya se ha observado en el Ejemplo 18, ni NLS-VP3 ni NoLS-VP3 rescatan la formación de cápsides tras la cotransfección con el vector Bluescript (pBS), mientras que en presencia de expresión de AAP (de pVP2N-gfp) fue detectable la formación de cápsides (Fig. 26B).

15 Este resultado confirma que AAP no solo dirige VP proteínas a los nucléolos (que también se lleva a cabo por la construcción de fusión NoLS-VP3 que no conduce al ensamblaje de cápside), sino que también desempeña una función esencial en la propia reacción de ensamblaje.

20. Ensamblaje de VLPs naturales y de VP3

20 Para comparar la morfología de partículas de tipo virus ensambladas de VP1, VP2 y VP3 (VLP de VP1.2.3) con la de VLPs ensambladas solo de VP3 (VP3 VLP), se han investigado las muestras respectivas por microscopía electrónica después de tinción negativa usando 2 % de acetato de uranilo como se ha descrito anteriormente.

25 Se produjeron partículas de tipo virus ensambladas de VP1, VP2 y VP3 correspondientes a la cápside natural en células 293-T por expresión del gen cap completo. Se produjeron VLPs ensambladas solo de VP3 por cotransfección de pCMV-VP3/2809 y pVP2N-gfp (VP3 VLP).

Resultados y conclusión

30 Las imágenes de microscopio electrónico confirmaron que la morfología de partículas de tipo virus ensambladas de VP1, VP2 y VP3 (VP1.2.3 VLP) es comparable a la de VLPs ensambladas solo de VP3 (VLP de VP3, Fig. 28). En ambas imágenes, no es visible tinción del interior, confirmando, por tanto, claramente que todas las partículas están vacías. Se muestra una imagen de partículas completas (que contienen ADN) en comparación con partículas vacías, por ejemplo, en Xie et al.(2004).

35 21. Trans-complementación de AAP y VP3 clonadas de diferentes serotipos

Para confirmar que la expresión de AAP de un parvovirus es capaz de mediar en el ensamblaje de cápside de VP3 de otros parvovirus, los presentes inventores usaron las secuencias respectivas de AAV1, AAV2 y AAV5 en ensayos de trans-complementación.

40 Se realizó la clonación de pVP2N-gfp de AAV1 y AAV5 análogamente a la de AAV2 (véase 3.1) con la diferencia de que se seleccionaron pares de cebadores para amplificar las secuencias respectivas para AAV1 y AAV5 como se da en SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 27, respectivamente. Para trans-complementación, se transfectaron las células con el plásmido pCMV-VP3 de cualquiera de AAV2 (pCMV_VP3/2809), AAV1 (pCMV_AAV1VPS/2829) como se ha descrito anteriormente o una construcción de expresión de VP3 de AAV5 correspondiente con o sin cotransfección de pVP2N-gfp del serotipo de AAV respectivo (Fig. 29). Se transfectaron las mismas relaciones molares de la construcción de VP3 y pVP2N-gfp. Se midió la eficiencia de formación de partículas por ELISA.

Resultados y conclusión

50 Se comparó el ensamblaje de cápside de VP3 clonada de AAV1, AAV2 y AAV5, respectivamente, después de la cotransfección de pVP2N-gfp clonada de AAV2 y AAV1, respectivamente, o vector Bluescript (pBS) (véase Fig. 29). Como era de esperar, la expresión de VP3 en ausencia de cualquier otra proteína viral (control de pBS) no mostró formación de cápsides detectable, independientemente de su origen. A diferencia, la expresión de AAP (expresada a partir de la construcción de pVP2N-gfp respectiva) de serotipo AAV1 restauró completamente el ensamblaje de VP3 de AAV2 (en comparación con el ensamblaje mediado por AAP de AAV2). También viceversa, AAP de AAV2 restauró completamente el ensamblaje de VP3 de AAV1 (en comparación con el ensamblaje mediado por AAP de AAV1). AAP de AAV5 solo fue parcialmente capaz de complementar el ensamblaje de VP3 de AAV2 y dejó de complementar el ensamblaje de VP3 de AAV1. Además, AAP de AAV2 y AAV1 dejaron de complementar el ensamblaje de VP3 de AAV5. El fallo de trans-complementación con respecto a construcciones de AAV5 puede ser debido al hecho de que las AAPs en estos experimentos se fusionaron con GFP, que conduce a una corta delección del extremo C de AAP que podría interferir con la complementación de parvovirus más distantes mientras que la actividad es suficiente para serotipos estrechamente relacionados. Una posible explicación adicional es que serotipos de AAV más distantes solo son parcialmente capaces de complementarse entre sí con respecto al ensamblaje de VP3. Mientras que AAP de AAV1 y AAV2 tienen un 71,5 % de identidad y 81,0 % de similitud (alineamiento de Smith-Waterman), AAV2 y AAV5 solo tienen un 56,2 % de identidad y 60,8 % de similitud. Estos números son incluso más bajos con respecto a AAV1 en comparación con AAV5 (53,8 % de identidad y 58,1 % de

similitud). Por consiguiente, el experto será capaz de seleccionar AAPs funcionalmente activas de diferentes serotipos y/u otras variantes funcionalmente activas buscando identidades / similitudes de AAP.

5 Todavía, además del Ejemplo 11, estos resultados confirman que parvovirus distintos de AAV2 codifican AAP funcional y hacen uso del mismo mecanismo para el ensamblaje de cápside. Además, AAP y VP3 son en principio intercambiables entre diferentes parvovirus, especialmente entre virus estrechamente relacionados.

Bibliografía

- 10 ARNOLD, G. S., SASSER, A. K., STACHLER, M. D. & BARTLETT, J. S. (2006) Metabolic biotinylation provides a unique platform for the purification and targeting of multiple AAV vector serotypes. *Mol Ther*, 14, 97-106.
- ASOKAN, A. & SAMULSKI, R. J. (2006) AAV does the shuffle. *Nat Biotechnol*, 24, 158-60.
- BACHMANN, M. F., ROHRER, U. H., KUNDIG, T. M., BURKI, K., HENGARTNER, H. & ZINKERNAGEL, R. M. (1993) The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science*, 262, 1448-51.
- 15 BECERRA, S. P., KOCZOT, F., FABISCH, P. & ROSE, J. A. (1988) Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol*, 62, 2745-54.
- BECERRA, S. P., ROSE, J. A., HARDY, M., BAROUDY, B. M. & ANDERSON, C. W. (1985) Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 7919-23.
- 20 CORPET, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16, 10881-90.
- GIROD, A., RIED, M., WOBUS, C., LAHM, H., LEIKE, K., KLEINSCHMIDT, J., DELEAGE, G. & HALLEK, M. (1999) Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med*, 5, 1438.
- 25 GRIEGER, J. C., JOHNSON, J. S., GURDA-WHITAKER, B., AGBANDJE-MCKENNA, M. & SAMULSKI, R. J. (2007) Surface-exposed adeno-associated virus Vp1-NLS capsid fusion protein rescues infectivity of noninfectious wild-type Vp2/Vp3 and Vp3-only capsids but not that of fivefold pore mutant virions. *J Virol*, 81, 7833-43.
- GRIEGER, J. C. & SAMULSKI, R. J. (2005) Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 99, 119-45.
- 30 GRIFMAN, M., TREPEL, M., SPEECE, P., GILBERT, L. B., ARAP, W., PASQUALINI, R. & WEITZMAN, M. D. (2001) Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids. *Mol Ther*, 3, 964-75.
- GRIMM, D. (2002) Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods*, 28, 146-57.
- 35 GRIMM, D., KERN, A., PAWLITA, M., FERRARI, F., SAMULSKI, R. & KLEINSCHMIDT, J. (1999) Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Ther*, 6, 1322-30.
- GRIMM, D. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1999) Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther*, 10, 2445-50.
- 40 HEILBRONN, R., BURKLE, A., STEPHAN, S. & ZUR HAUSEN, H. (1990) The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J Virol*, 64, 3012-8.
- HOQUE, M., ISHIZU, K., MATSUMOTO, A., HAN, S. I., ARISAKA, F., TAKAYAMA, M., SUZUKI, K., KATO, K., KANDA, T., WATANABE, H. & HANDA, H. (1999a) Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *J Virol*, 73, 7912-5.
- 45 HOQUE, M., SHIMIZU, N., ISHIZU, K., YAJIMA, H., ARISAKA, F., SUZUKI, K., WATANABE, H. & HANDA, H. (1999b) Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 266, 371-6.
- HUTTNER, N. A., GIROD, A., PERABO, L., EDBAUER, D., KLEINSCHMIDT, J. A., BUNING, H. & HALLEK, M. (2003) Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies. *Gene Ther*, 10, 2139-47.
- 50 KING, J. A., DUBIELZIG, R., GRIMM, D. & KLEINSCHMIDT, J. A. (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J*, 20, 3282-91.
- KOERBER, J. T., JANG, J. H. & SCHAFFER, D. V. (2008) DNA shuffling of adeno-associated virus yields functionally diverse viral progeny. *Mol Ther*, 16, 1703-9.
- 55 KOZAK, M. (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299, 1-34.
- KRONENBERG, S., KLEINSCHMIDT, J. A. & BOTTCHER, B. (2001) Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Rep*, 2, 997-1002.
- LAUGHLIN, C. A., TRATSCHIN, J. D., COON, H. & CARTER, B. J. (1983) Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene*, 23, 65-73.
- 60 LI, W., ASOKAN, A., WU, Z., VAN DYKE, T., DIPRIMIO, N., JOHNSON, J. S., GOVINDASWAMY, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., LEICHTLE, S., REDMOND, D. E., JR., MCCOWN, T. J., PETERMANN, K. B., SHARPLESS, N. E. & SAMULSKI, R. J. (2008) Engineering and selection of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. *Mol Ther*, 16, 1252-60.
- 65 MAHESHRI, N., KOERBER, J. T., KASPAR, B. K. & SCHAFFER, D. V. (2006) Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. *Nat Biotechnol*, 24, 198-204.

- MITTEREDER, N., MARCH, K. L. & TRAPNELL, B. C. (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol*, 70, 7498-509.
- MOSKALENKO, M., CHEN, L., VAN ROEY, M., DONAHUE, B. A., SNYDER, R. O., MCARTHUR, J. G. & PATEL, S. D. (2000) Epitope mapping of human anti-adenovirus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol*, 74, 1761-6.
- MUZYCZKA, N. & BERNS, K. I. (2001) Parvoviridae: the viruses and their replication. IN KNIPE, T. M. & HOWLEY, P. M. (Eds.) *Fields Virology*. Fourth Edition ed. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- NICKLIN, S. A., BUENING, H., DISHART, K. L., DE ALWIS, M., GIROD, A., HACKER, U., THRASHER, A. J., ALI, R. R., HALLEK, M. & BAKER, A. H. (2001) Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells. *Mol Ther*, 4, 174-81.
- NYGREN, P. A. & SKERRA, A. (2004) Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods*, 290, 3-28.
- RABINOWITZ, J. E., XIAO, W. & SAMULSKI, R. J. (1999) Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus. *Virology*, 265, 274-85.
- RIED, M. U., GIROD, A., LEIKE, K., BUNING, H. & HALLEK, M. (2002) Adeno-associated virus capsids displaying immunoglobulin-binding domains permit antibody-mediated vector retargeting to specific cell surface receptors. *J Virol*, 76, 4559-66.
- RUFFING, M., HEID, H. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1994) Mutations in the carboxy terminus of adeno-associated virus 2 capsid proteins affect viral infectivity: lack of an RGD integrin-binding motif. *J Gen Virol*, 75 (Pt 12), 3385-92.
- RUFFING, M., ZENTGRAF, H. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1992) Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol*, 66, 6922-30.
- SHI, W., ARNOLD, G. S. & BARTLETT, J. S. (2001) Insertional mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and generation of AAV2 vectors targeted to alternative cell-surface receptors. *Hum Gene Ther*, 12, 1697-711.
- SHI, W. & BARTLETT, J. S. (2003) RGD inclusion in VP3 provides adeno-associated virus type 2 (AAV2)-based vectors with a heparan sulfate-independent cell entry mechanism. *Mol Ther*, 7, 515-25.
- STACHLER, M. D. & BARTLETT, J. S. (2006) Mosaic vectors comprised of modified AAV1 capsid proteins for efficient vector purification and targeting to vascular endothelial cells. *Gene Ther*, 13, 926-31.
- STEINBACH, S., WISTUBA, A., BOCK, T. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1997) Assembly of adeno-associated virus type 2 capsids in vitro. *J Gen Virol*, 78 (Pt 6), 1453-62.
- SZOMOLANYI-TSUDA, E., BRIEN, J. D., DORGAN, J. E., GARCEA, R. L., WOODLAND, R. T. & WELSH, R. M. (2001) Antiviral T-cell-independent type 2 antibody responses induced in vivo in the absence of T and NK cells. *Virology*, 280, 160-8.
- SZOMOLANYI-TSUDA, E., BRIEN, J. D., DORGAN, J. E., WELSH, R. M. & GARCEA, R. L. (2000) The role of CD40-CD154 interaction in antiviral T cell-independent IgG responses. *J Immunol*, 164, 5877-82.
- SZOMOLANYI-TSUDA, E., LE, Q. P., GARCEA, R. L. & WELSH, R. M. (1998) T-Cell-independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles. *J Virol*, 72, 6665-70.
- SZOMOLANYI-TSUDA, E. & WELSH, R. M. (1998) T-cell-independent antiviral antibody responses. *Curr Opin Immunol*, 10, 431-5.
- WARD, P. & WALSH, C. E. (2009) Chimeric AAV Cap sequences alter gene transduction. *Virology*, 386, 237-48.
- WARRINGTON, K. H., JR., GORBATYUK, O. S., HARRISON, J. K., OPIE, S. R., ZOLOTUKHIN, S. & MUZYCZKA, N. (2004) Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. *J Virol*, 78, 6595-609.
- WISTUBA, A., KERN, A., WEGER, S., GRIMM, D. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1997) Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol*, 71, 1341-52.
- WISTUBA, A., WEGER, S., KERN, A. & KLEINSCHMIDT, J. A. (1995) Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *J Virol*, 69, 5311-9.
- WU, P., XIAO, W., CONLON, T., HUGHES, J., AGBANDJE-MCKENNA, M., FERKOL, T., FLOTTE, T. & MUZYCZKA, N. (2000) Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism. *J Virol*, 74, 8635-47.
- XIE, Q., BU, W., BHATIA, S., HARE, J., SOMASUNDARAM, T., AZZI, A. & CHAPMAN, M. S. (2002) The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10405-10.
- XIE, Q., HARE, J., TURNIGAN, J. & CHAPMAN, M. S. (2004) Large-scale production, purification and crystallization of wild-type adeno-associated virus-2. *J Virol Methods*, 122, 17-27.
- ZINKERNAGEL, R. M. (2002) Uncertainties - discrepancies in immunology. *Immunological Reviews*, 185, 103-125.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido denominado proteína activadora del ensamblaje (AAP), comprendiendo el polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, y SEQ ID NO: 22, o que codifica un polipéptido que comprende una variante funcionalmente activa de cualquiera de estas secuencias de aminoácidos, en donde la variante funcionalmente activa es capaz de promover el ensamblaje de una cápside parvoviral que consiste esencialmente en VP3 y en donde la variante funcionalmente activa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60 % idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 22, en donde el ácido nucleico es incapaz de expresar cualquiera de las proteínas Rep funcionales, VP1, VP2 y VP3.
2. El ácido nucleico según la reivindicación 1,
- a) caracterizado por que incluye más de 378 nucleótidos del ORF de VP3;
 - b) caracterizado por que incluye al menos 5 nucleótidos de los nucleótidos que codifican VP2 adyacentes, que se localizan directamente aguas arriba de 5' del codón de iniciación de VP3, o caracterizado por que su codón de iniciación es un ATG 4 nucleótidos, o 24 nucleótidos, o 44 nucleótidos aguas abajo del codón de iniciación de VP3;
 - c) caracterizado por que deriva de AAV2 y su codón de iniciación de la traducción es C₂₇₂₉TG, A₂₇₃₅CG, A₂₇₁₇TT o T₂₇₂₀TG o por que deriva de otro parvovirus y su codón de iniciación de la traducción está en el sitio homólogo a los codones de iniciación de la traducción de AAV2;
 - d) que comprende una mutación que genera un codón de iniciación ATG que permite la traducción mejorada del marco de lectura abierto;
 - e) caracterizado por que la secuencia codificante de polipéptidos del ácido nucleico va seguida por una señal de poli(A);
 - f) comprendido en un casete de expresión, construcción, vector o línea celular; y/o
 - g) en donde el ácido nucleico es incapaz de expresar Rep40, Rep52, Rep68, Rep78, VP1, VP2 y VP3.
3. Un polipéptido codificado por un ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2.
4. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde el polipéptido es la proteína activadora del ensamblaje (AAP).
5. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido según la reivindicación 3.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde se une específicamente a AAP de AAV2 (SEQ ID NO. 1).
7. Uso del ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un polipéptido como se define en la reivindicación 3 o 4.
8. Uso del ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2, o el polipéptido según la reivindicación 3 o 4, para la preparación de una partícula parvoviral.
9. Uso del ácido nucleico o el polipéptido como se define en la reivindicación 8, para la preparación de una partícula parvoviral que no comprende ninguna de las proteínas funcionales VP1, VP2 y Rep.
10. Un método de producción de partículas parvovirales que consisten esencialmente en VP3, en donde solo 1/50 o menos de las proteínas que ensamblan la cápside son versiones extendidas del extremo N de VP3 o proteínas completamente diferentes, comprendiendo el método las etapas de
- (i) proporcionar una célula capaz de expresar VP3 de una secuencia codificante de VP3 (cds) de un parvovirus, en donde VP3 está bajo el control de un promotor independiente de rep y que expresa una proteína codificada por el ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2,
 - (ii) incubar la célula en condiciones propicias para la expresión de VP3 y la proteína del ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2, produciendo así la partícula parvoviral, y
 - (iii) opcionalmente purificar las partículas parvovirales de la célula,
- en donde se forman al menos 10⁵ partículas de virus por célula y no se expresan proteínas funcionales VP1, VP2 y Rep en dicha célula.
11. El método según la reivindicación 10,
- a) en donde el ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2 se proporciona en *cis* con respecto a la cds de VP3;
 - b) en donde el ácido nucleico según la reivindicación 1 o 2 se proporciona en *trans* con respecto a la cds de VP3;

- c) en donde la partícula parvoviral no contiene ninguna de las proteínas funcionales Rep;
d) en donde la partícula parvoviral no contiene Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78; y/o
e) en donde como máximo 1/100 de las partículas contienen ADN.
- 5 12. El método según cualquiera de la reivindicación 10 u 11, en donde la cds de VP3 comprende
- a) mutación (mutaciones) seleccionadas del grupo que consiste en una deleción, una inserción, una sustitución, y una combinación de las mismas;
b) una o más mutaciones silenciosas;
10 c) una o más mutaciones que conducen a una o más mutaciones localizadas sobre la superficie de una VLP de VP3;
d) una o más mutaciones que conducen a una o más inserciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-453, I-459, I-471, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713 y I-716 o a dos inserciones en dos posiciones seleccionadas del grupo que consiste en I-261, I-453, I-534, I-570, I-573 y I-587; o a tres inserciones en tres posiciones de VP3; y/o
15 e) una o más mutaciones que conducen a dos inserciones en la posición I-453 en combinación con I-587.
13. Una partícula parvoviral que consiste esencialmente en VP3, en donde solo 1/50 o menos de las proteínas que ensamblan la cápside son versiones extendidas del extremo N de VP3 o proteínas completamente diferentes,
- 20 (i) en donde la VP3 comprende opcionalmente una o más mutaciones, y
(ii) en donde la VP3 no contiene una señal de localización nucleolar heteróloga, y
(iii) en donde la partícula no contiene ninguna de las proteínas funcionales Rep.
- 25 14. La partícula parvoviral según la reivindicación 13, en donde la cápside consiste solo en VP3 y/o en donde la(s) mutación (mutaciones) de VP3 es/son una mutación como se describe en las reivindicaciones 12.
15. Una partícula de parvovirus según la reivindicación 13 o 14 para su uso como un medicamento.
- 30 16. La partícula de parvovirus para su uso según la reivindicación 15, en donde el medicamento comprende además uno o más excipientes;
17. La partícula de parvovirus para su uso según la reivindicación 15,
- 35 a) en donde el medicamento es una vacuna; y/o
b) para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad infecciosa, una enfermedad tumoral, una enfermedad alérgica, una enfermedad metabólica, una enfermedad inflamatoria (crónica), una enfermedad neurológica, adicción o para ser usada en oftalmología.

Fig. 1

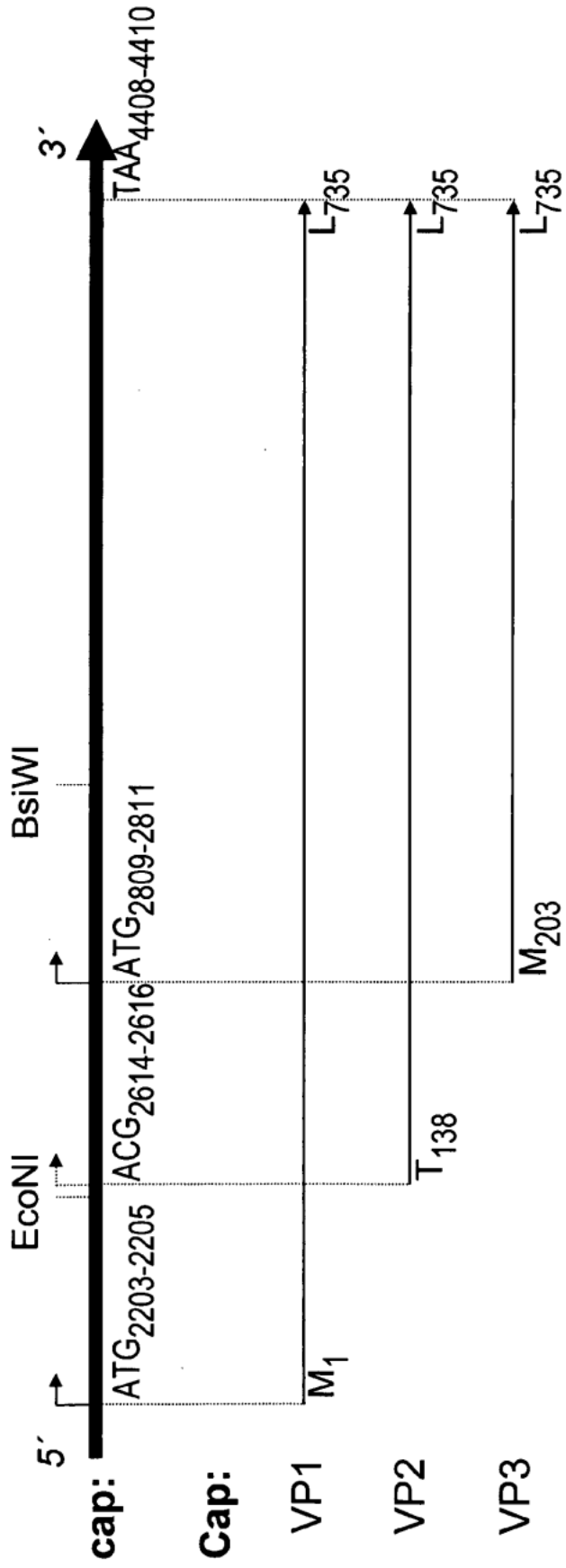


Fig. 2-1

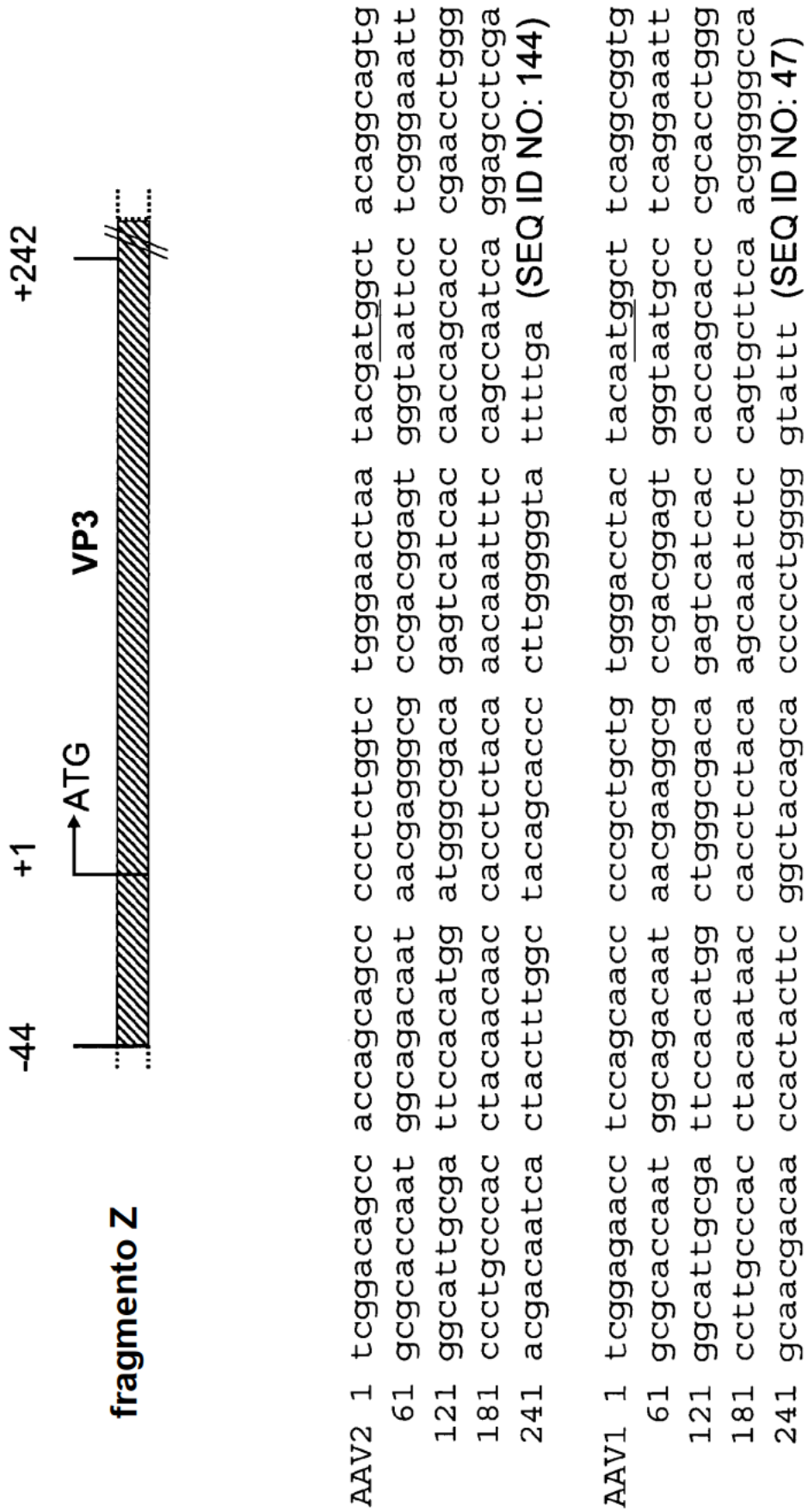


Fig. 2-2

AAV3b 1 tcggagaacc accagcagcc cccacaagtt tgggatctaa tacaatggct tcaggcgggtg
61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgaggggtg ccgatggagt gggtaattcc tcaggaaatt
121 ggcattgcga ttccaatgg ctgggcgaca gattcatcac caccagcacc agaaccctggg
181 ccctgcccac ttacaacaac catctctaca agcaaatctc cagccaatca ggagcttcaa
241 acgacaacca ctacttggc tacagcacc cttgggggta ttttga (SEQ ID NO: 48)

AAV4 1 cccctgaggg atcaacttcc ggagccatgt ctgatgacag tgagatgctg gcagcagctg
61 gcggagctgc agtcgagggc ggacaagggtg ccgatggagt gggtaattcc tcgggtgatt
121 ggcattgcga ttccacctgg tctgagggcc acgtcacgac caccagcacc agaaccctggg
181 tcttgcccac ctacaacaac cacctctaca agcactcgg agagagcctg cagtccaaca
241 cctacaacgg attctccacc ccctggggat actttgactt caaccg (SEQ ID NO: 49)

AAV5 1 tgcaaatccc agcccaacca gcctcaagtt tgggagctga tacaatgtct gcgggaggtg
61 gcggccatt ggcgacaat aaccaagggtg ccgatggagt gggcaatgcc tcgggagatt
121 ggcattgcga ttccactggt atgggggaca gattcgtcac caagtccacc cgaaccctggg
181 tgctgcccag ctacaacaac caccagtacc gagagatcaa aagcggctcc gtcgacggaa
241 gcaacgccc aacgctactt ggatacagca cccctgggg gtactt (SEQ ID NO: 50)

AAV6 1 tcggagaacc tccagcaacc cccgctgctg tgggacctac tacaatggct tcaggcgggtg
61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtaattcc tcaggaaatt
121 ggcattgcga ttccacatgg ctgggcgaca gattcatcac caccagcacc cgaaccctggg
181 ccttgcccac ctataacaac cacctctaca agcaaatctc cagtgttca acgggggcca
241 gcaacgacaa ccactactc ggctacagca cccctgggg gtattt (SEQ ID NO: 51)

Fig. 2-3

```

AAV7 1 ctagtgtggg atctggtaca gtggtgcag gcggtggcg accaatggca gacaataacg
    61 aaggtgccga cggagtgggt aatgcctcag gaaattggca ttgcgattcc acatggctgg
    121 gcgacagagt cattaccacc agcaccgaa cctggggcct gccacctac aacaaccacc
    181 tctacaagca aatctccagt gaaactgcag gtagtaccaa cgacaacacc tacttcggct
    241 acagcaccccc ctgggggtat tttgacttta acagattcca ctgcca (SEQ ID NO: 52)

AAV8 1 tcggagaacc tccagcagc cctctggtg tgggacctaa tacaatggct gcaggcggtg
    61 gcgcaccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtagttcc tcgggaaat
    121 ggcattgcga tccacatgg ctgggcgaca gatcatcac caccagcacc cgaacctggg
    181 ccctgcccac ctacaacaac cacctctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggaggag
    241 ccaccaacga caacacctac ttcggctaca gcacccccctg ggggta (SEQ ID NO: 53)

AAV10 1 tcggagaacc accagcaggc ccctctggtc tgggatctgg tacaatggct gcaggcggtg
    61 gcgctccaat ggcagacaat aacgaaggcg ccgacggagt gggtagttcc tcaggaaat
    121 ggcattgcga tccacatgg ctgggcgaca gatcatcac caccagcacc cgaacctggg
    181 ccctgcccac ctacaacaac cacctctaca agcaaatctc caacgggaca tcgggaggaa
    241 gcaccaacga caacacctac ttcggctaca gcacccccctg ggggta (SEQ ID NO: 54)

AAV11 1 ccctgaagg atcagatacc agcccatgt cttcagacat tgaaatgcgt gcagaccgg
    61 gcggaaatgc tgtcgatgcy ggacaaggtt ccgatggagt gggtaatgcc tcgggtgat
    121 ggcattgcga tccacctgg tctgagggca aggtcacaac aacctgacc agaacctggg
    181 tctgcccac ctacaacaac cacttgtacc tgcgtctcgg aacaacatca agcagcaaca
    241 cctacaacgg attctccacc ccctggggat atttgactt caacag (SEQ ID NO: 55)

```

Fig. 2-4

b-AAV 1 cccagaagg accatcttcc ggagctatgt ctactgagac tgaaatgcgt gcagcagctg
61 gcggaatgg tggcgatgcg ggacaagggt ccgagggagt gggtaatgcc tccggtgatt
121 ggcattgcga ttccacttgg tcagagagcc acgtcaccac cacctcaacc cgcacctggg
181 tcctgccgac ctacaacaac cacctgtacc tgcggctcgg ctcgagcaac gccagcgaca
241 ccttcaacgg attctccacc ccctggggat actttgactt taaccg (SEQ ID NO: 56)

Fig. 3

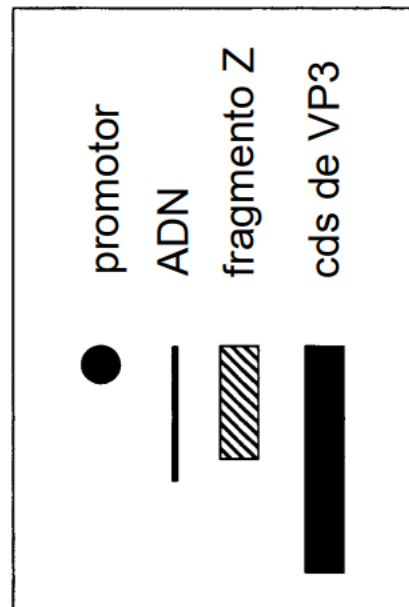
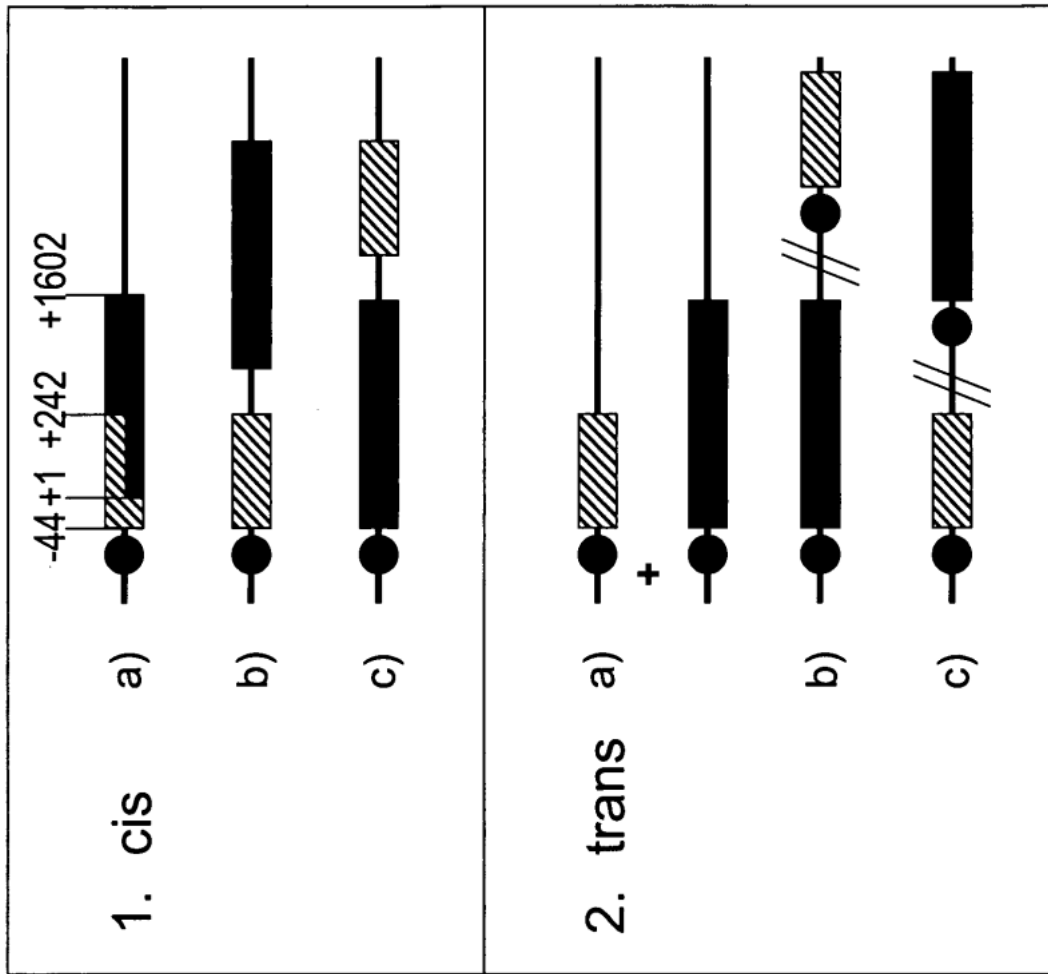
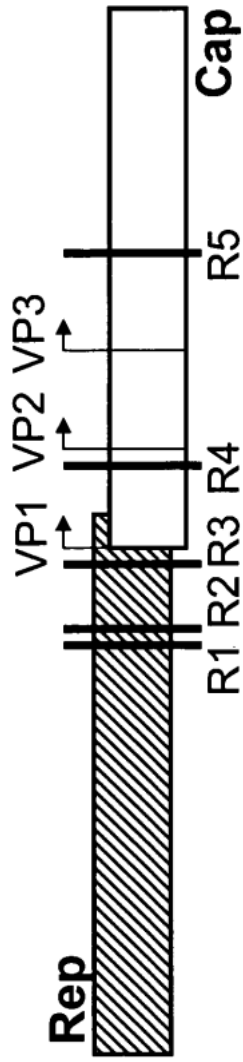


Fig. 4



Sitio de restricción 1 (R1): Fspl pb 1858

Sitio de restricción 2 (R2): HindIII pb 1882

Sitio de restricción 3 (R3): DraI pb 2193

Sitio de restricción 4 (R4): EcoNI pb 2596

Sitio de restricción 5 (R5): BsiWI pb 3254

ensamblaje
de cápside

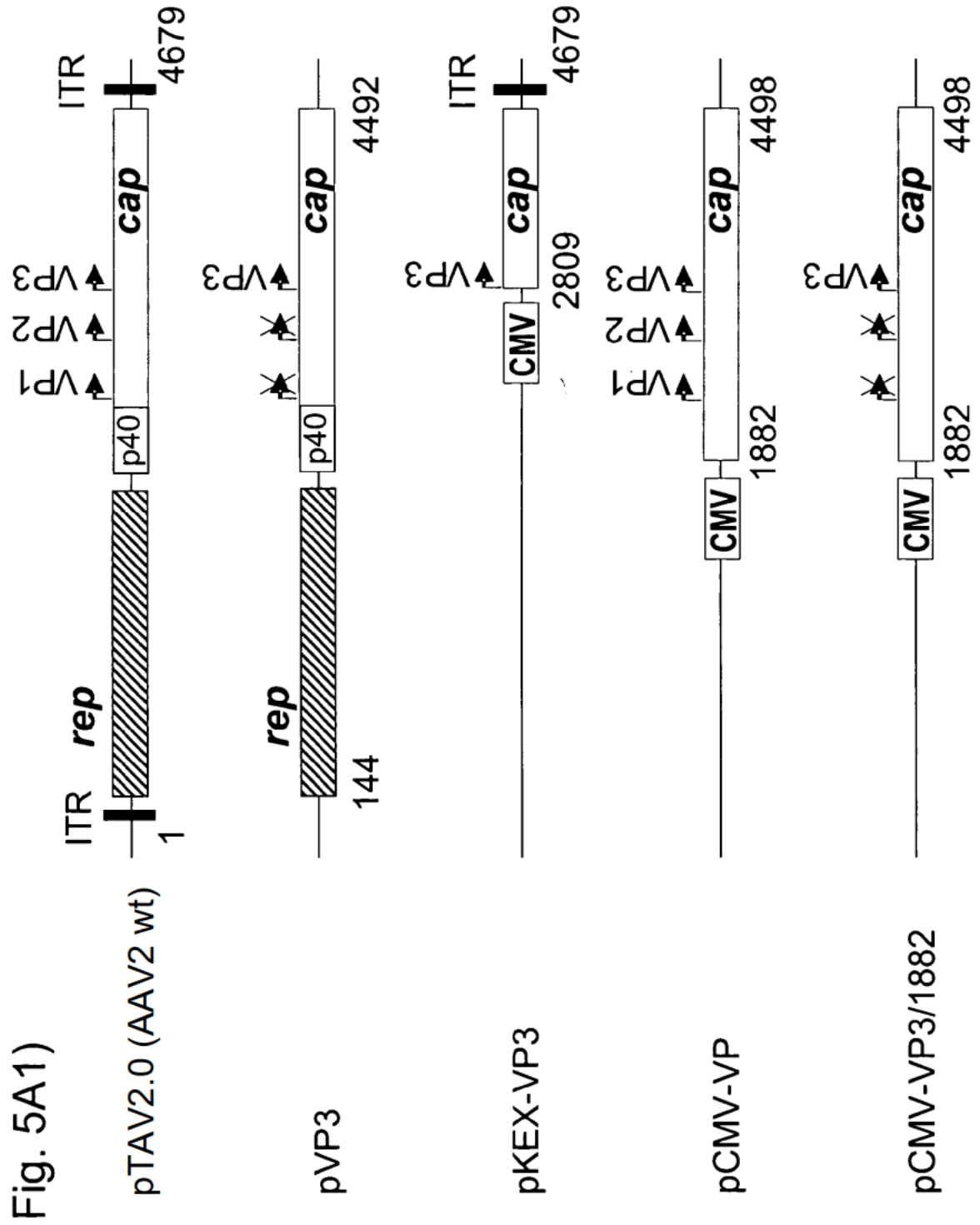


Fig. 5A1)

ensamblaje
de cápside

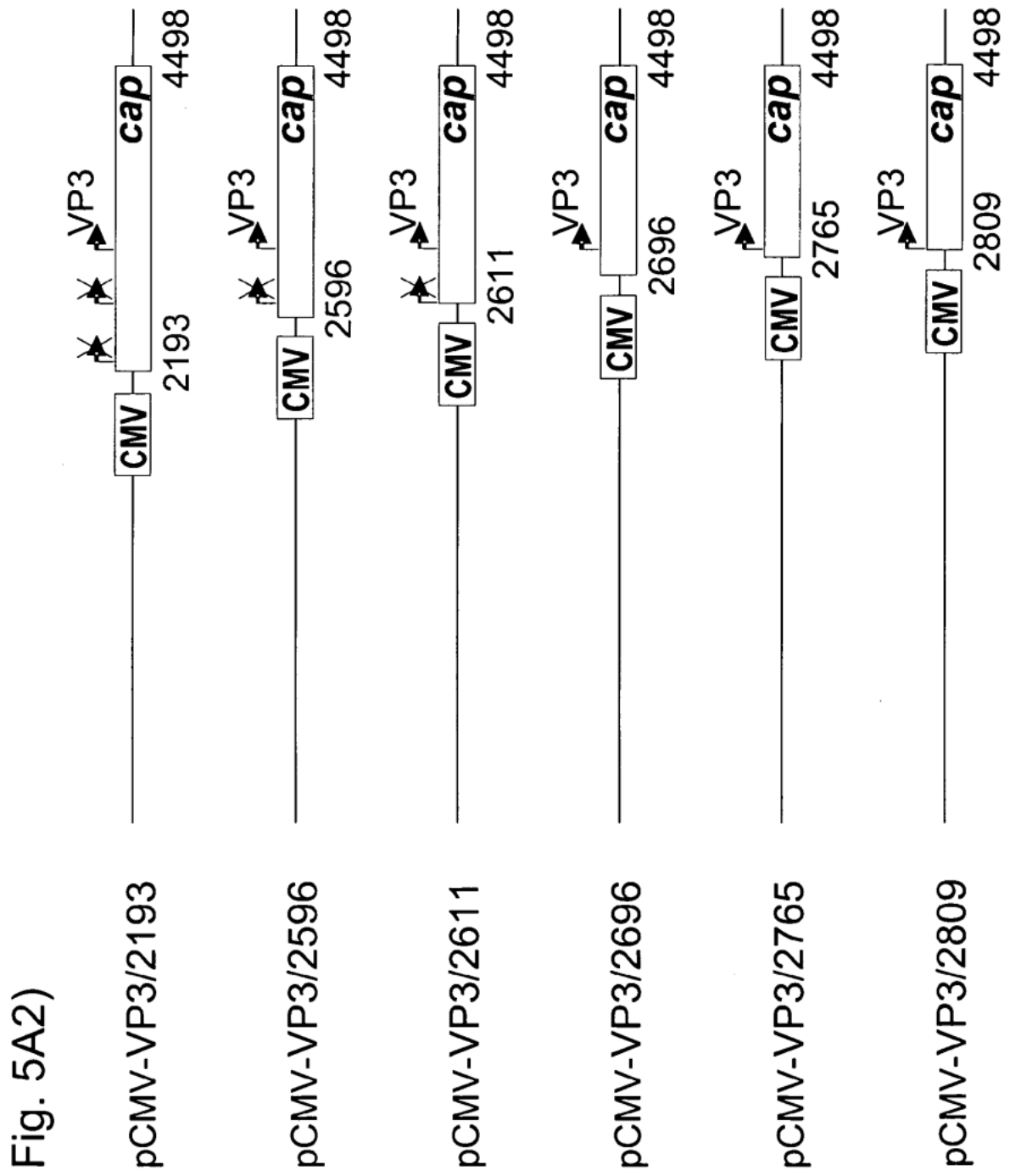


Fig. 5A2)

Fig. 5
B)

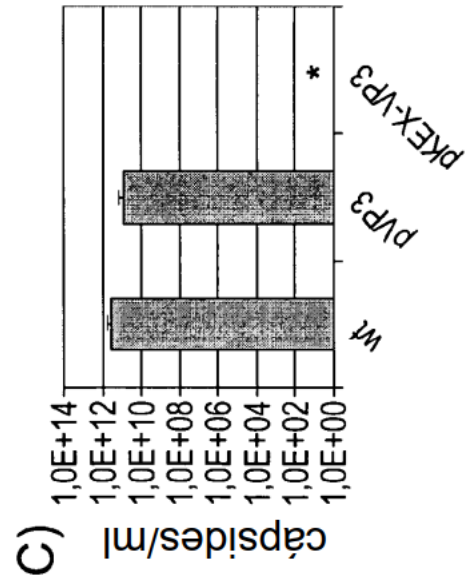
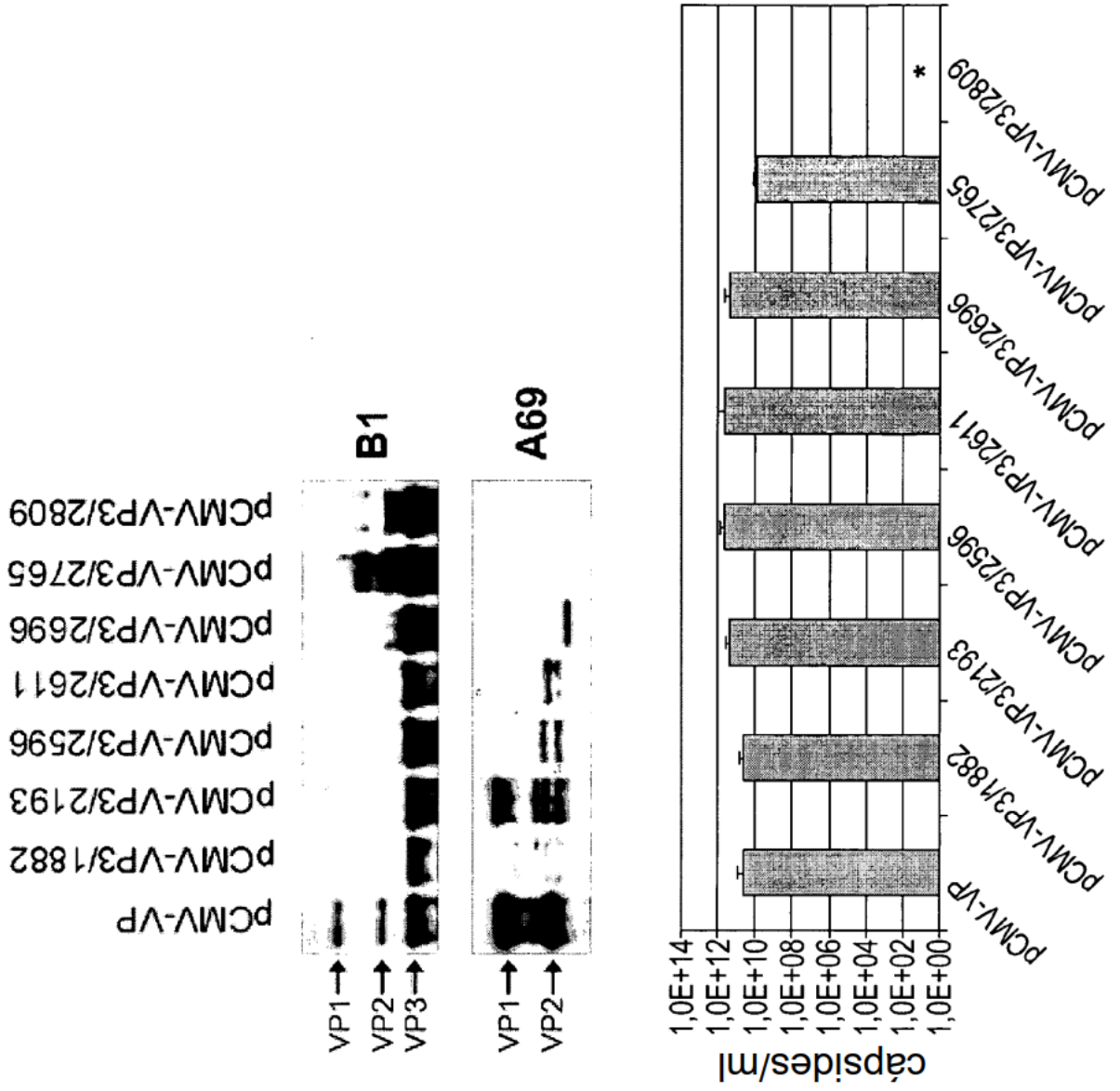


Fig. 6

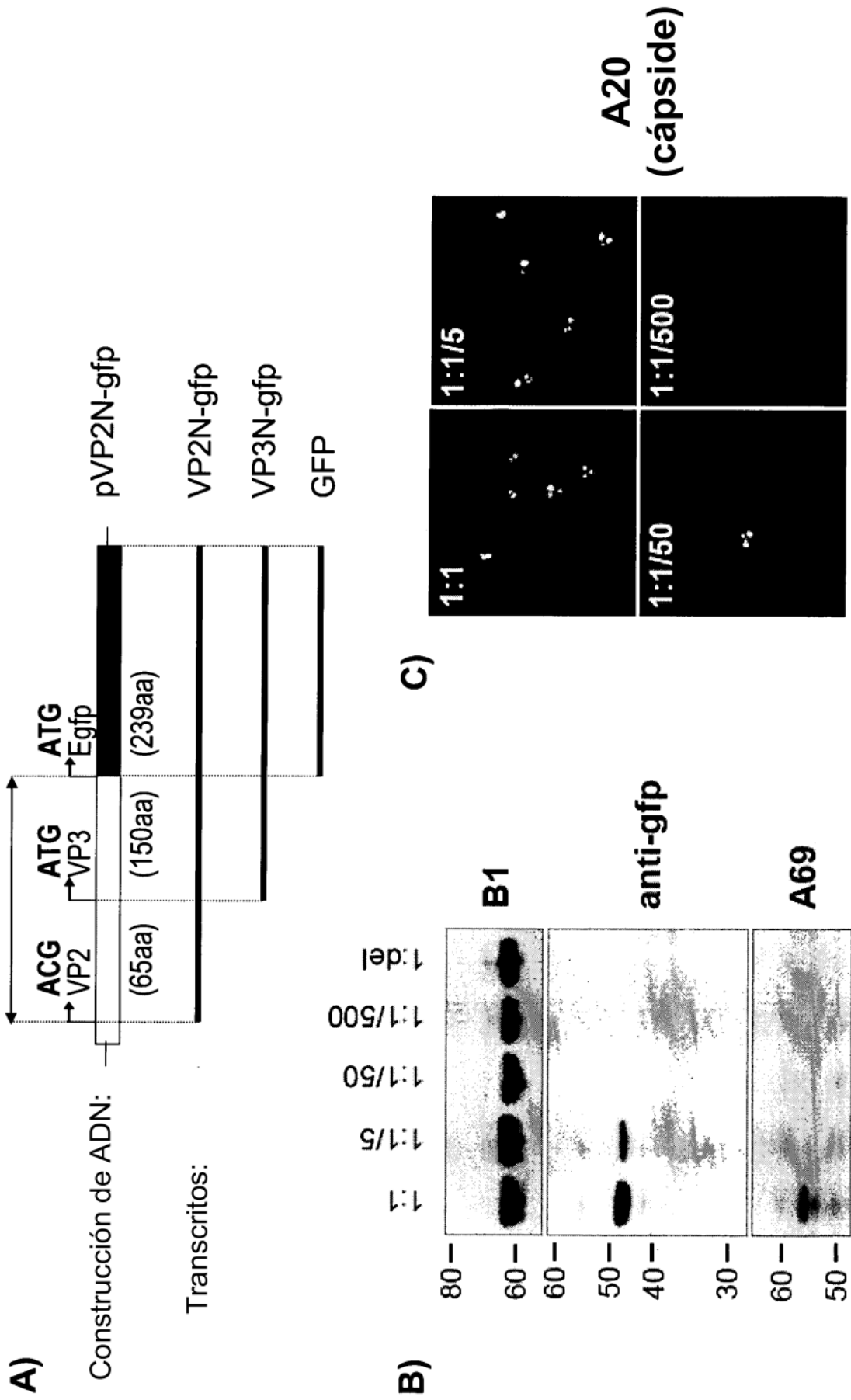


Fig. 6D)

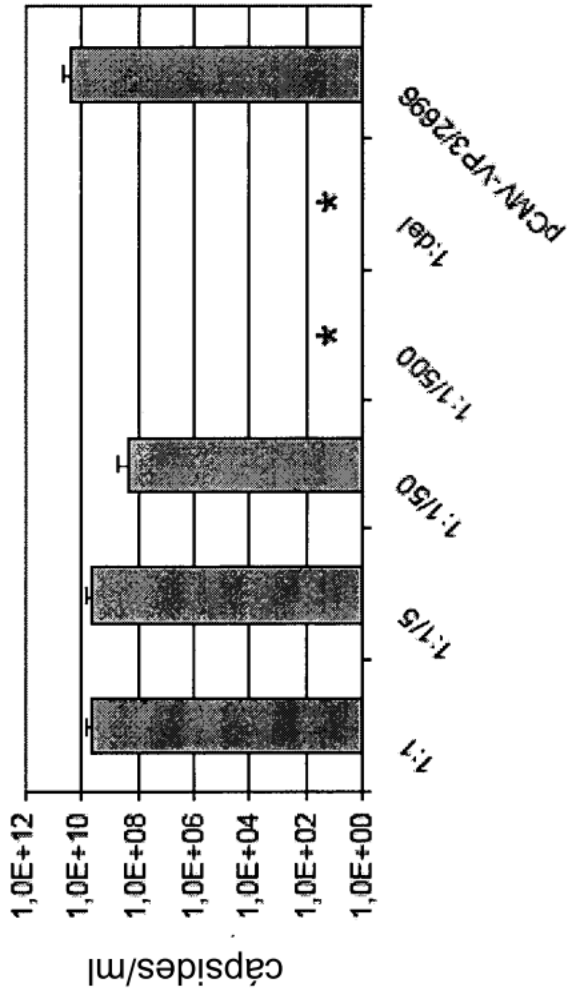


Fig. 7

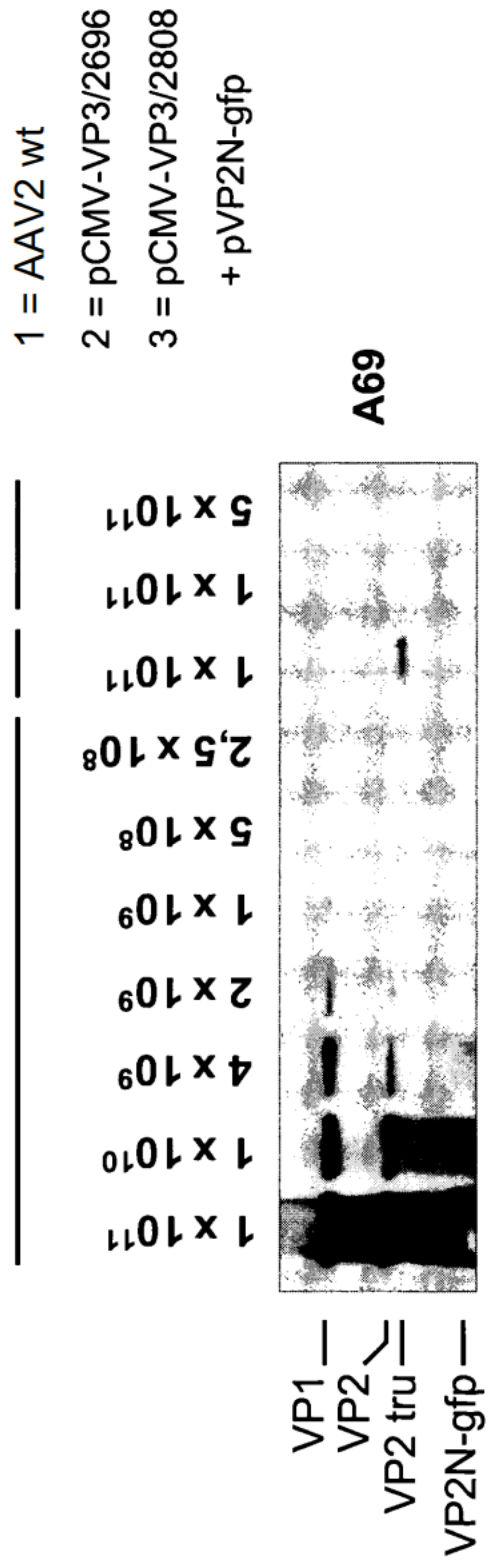


Fig. 8A-1

```

=====
Secuencias_alineadas:
1: pVP2N-gfp
2: pVP2Ncm-gfp
(desde el codón de iniciación de la traducción de VP2 hasta el sitio de restricción de BsiWI)

Identidad de secuencia de ADN: 459/646 (71,1%)
Identidad uso de codones: 60/215 (27,9%)
Identidad secuencia de proteínas: 215/215 (100%)

=====
10      20      30      40      50
VP2N    ACGGCTCCGGGAAAAAAGAGGCCGGTAGAGCACTCTCTGTGGAGCCAGA
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VP2Ncm  ACGGCCCTTGGCAAAGAAAACGGCCCGTGGAGCACACAGCCCCGTGGAGCCCGA
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
        10      20      30      40      50
        T A P G K K R P V E H S P V E P
        60      70      80      90
VP2N    CTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGAT
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VP2Ncm  CAGCAGCAGCGGCACCGGCAAGGCCGGACAGCAGCCCGCCAGAAAAGCGGC
        60      70      80      90      100
        D S S G T G K A G Q Q P A R K R
        110     120     130     140     150
VP2N    TGAATTTGGTCAGACTGGAGACCGCAGACTCAGTACCTGACCCCCAGCCT
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VP2Ncm  TGAACTTCGGCCAGACCGGCGACGCTGATAGCGTGCCCGGACCCCTCAGCCC
        110     120     130     140     150
        L N F G Q T G D A D S V P D P Q P
=====

```


Fig. 8A-3

```

410          420          430          440          450
VP2N  ACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VP2Ncm ACTACTTCGGGTACTACTACACCCCTGGGGTACTTCGATTTCAATCGGTTT
      410          420          430          440          450
      H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F
      460          470          480          490          500
VP2N  CACTGCCACTTTTCAACCCAGTGACTGGCAAGACTCATCAACAACAACCTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VP2Ncm CACTGTCACTTCAGCCCCAGAGACTGGCAGCGGCTGATTAATAATAATG
      460          470          480          490          500
      H C H F S P R D W Q R L I N N N
      510          520          530          540          550
VP2N  GGGATTCCGACCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTTAACAATTCAAGTCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VP2Ncm GGGCTTCGGGCCCAAGCGGCTGAATTTCAAGCTGTTCAAATATCCAGGTGA
      510          520          530          540          550
      W G F R P K R L N F K L F N I Q V
      560          570          580          590          600
VP2N  AAGAGTCAAGCAGAAATGACGGTACGACGACGATTGCCCAATAACCTTACC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VP2Ncm AGGAAGTGACCCAGAAACGATGACACCCACCACCAATCGCCCAACAACCTGACC
      560          570          580          590          600
      K E V T Q N D G T T I A N N L T
      610          620          630          640
VP2N  AGCACGGTTCAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VP2Ncm TCAACCGTGCAGGTGTTTCAACCCAGCAGCGAGTACCAGCTGCCGTACG
      610          620          630          640
      S T V Q V F T D S E Y Q L P Y

```

Fig. 8

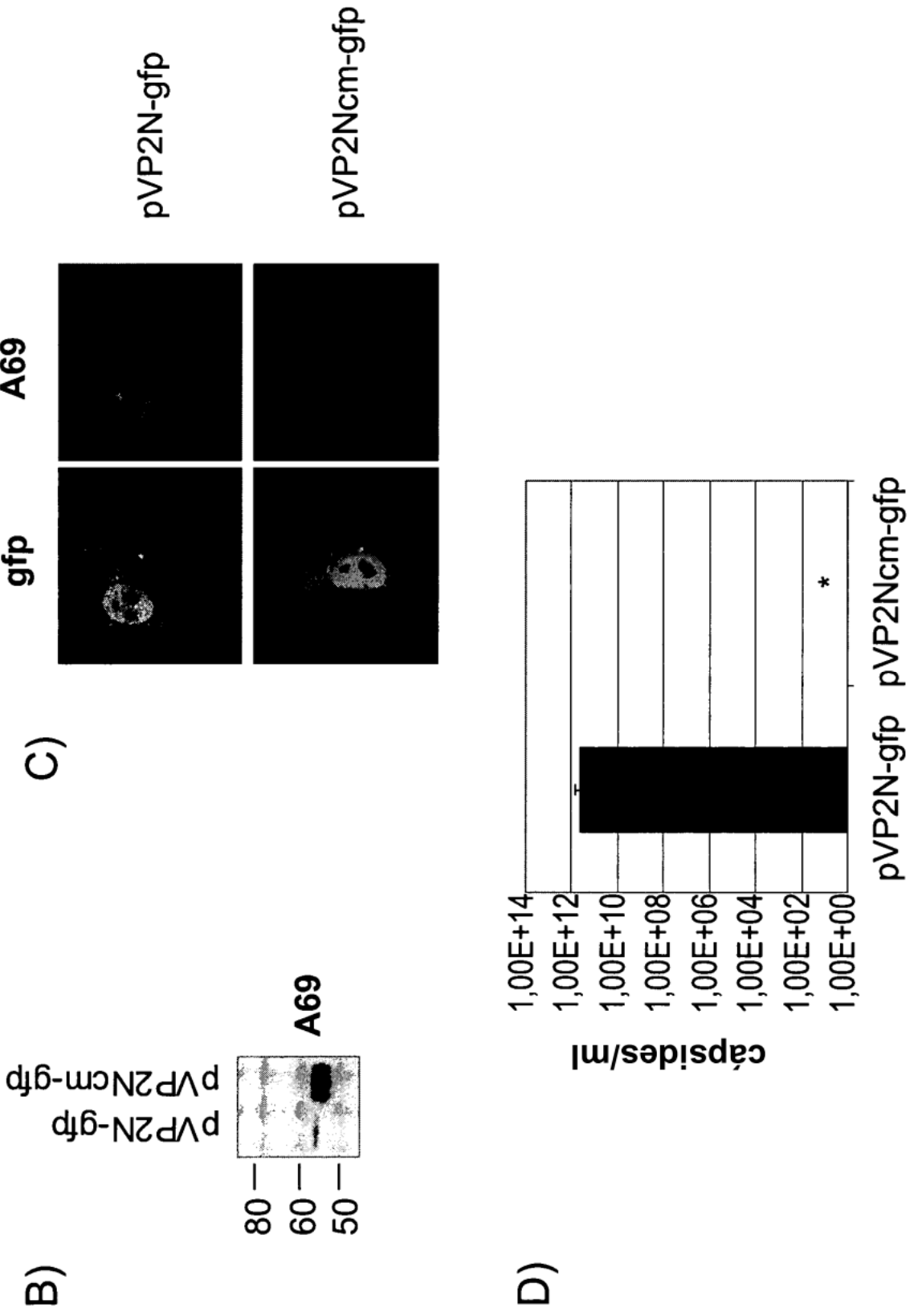
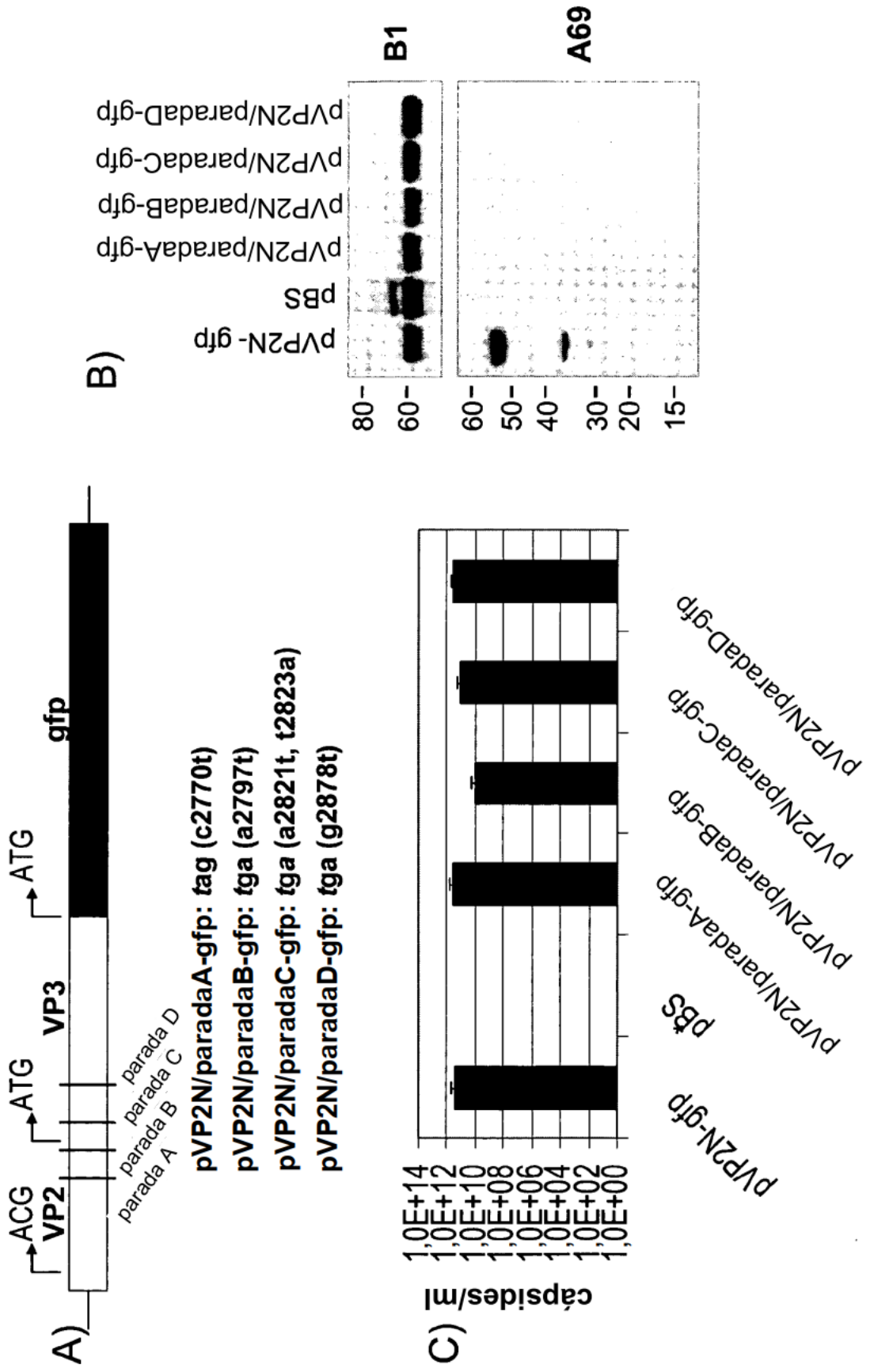


Fig. 9



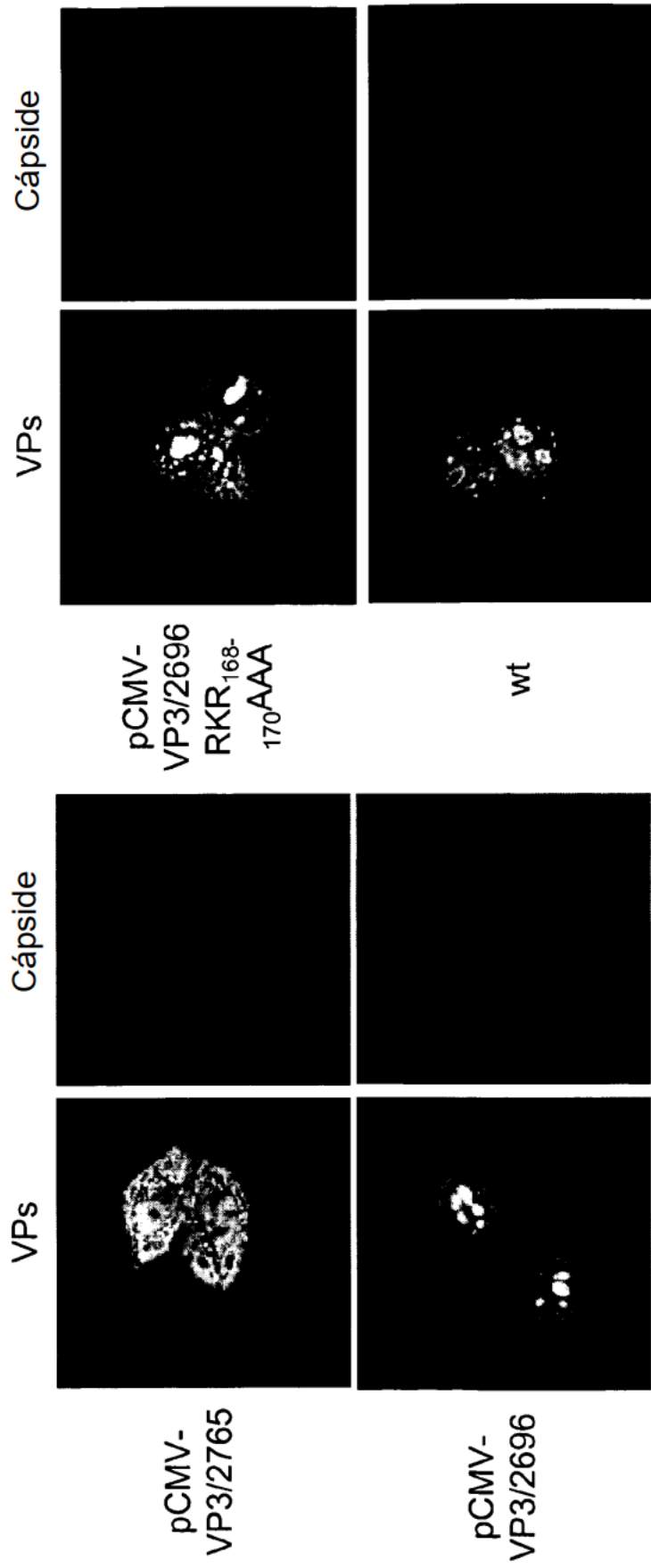
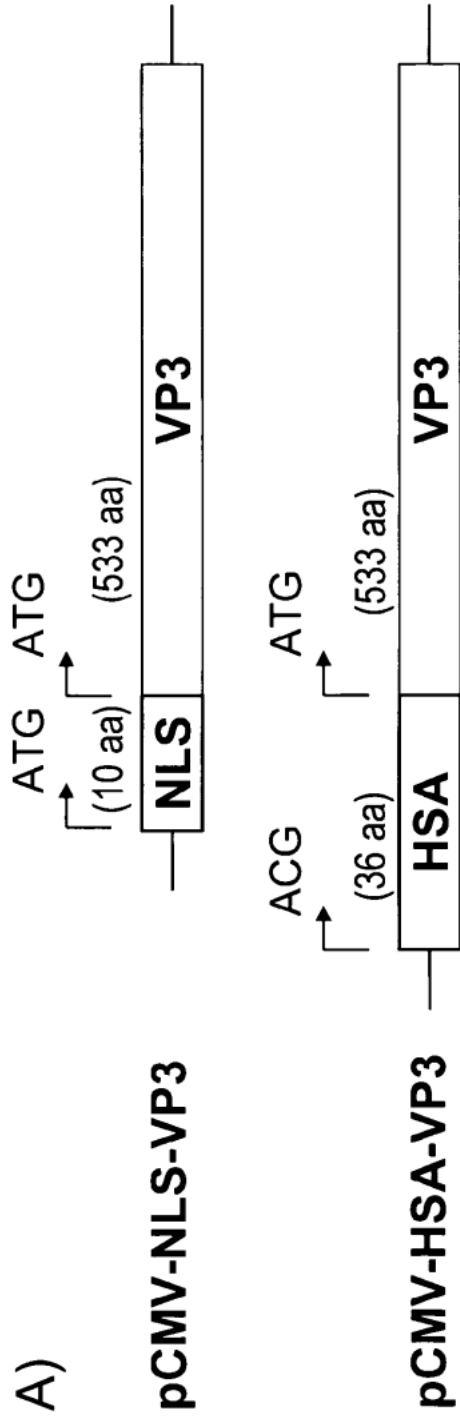


Fig. 10

Fig. 11 A)



C)

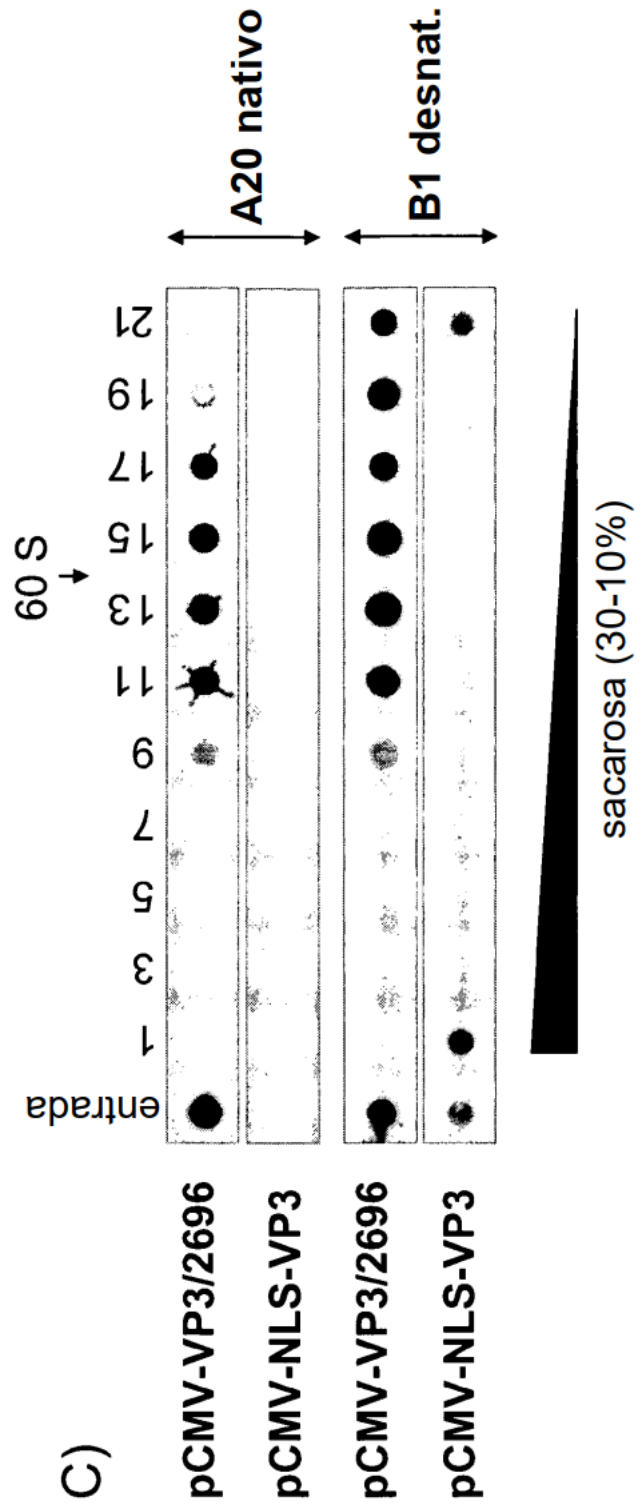


Fig. 11B)

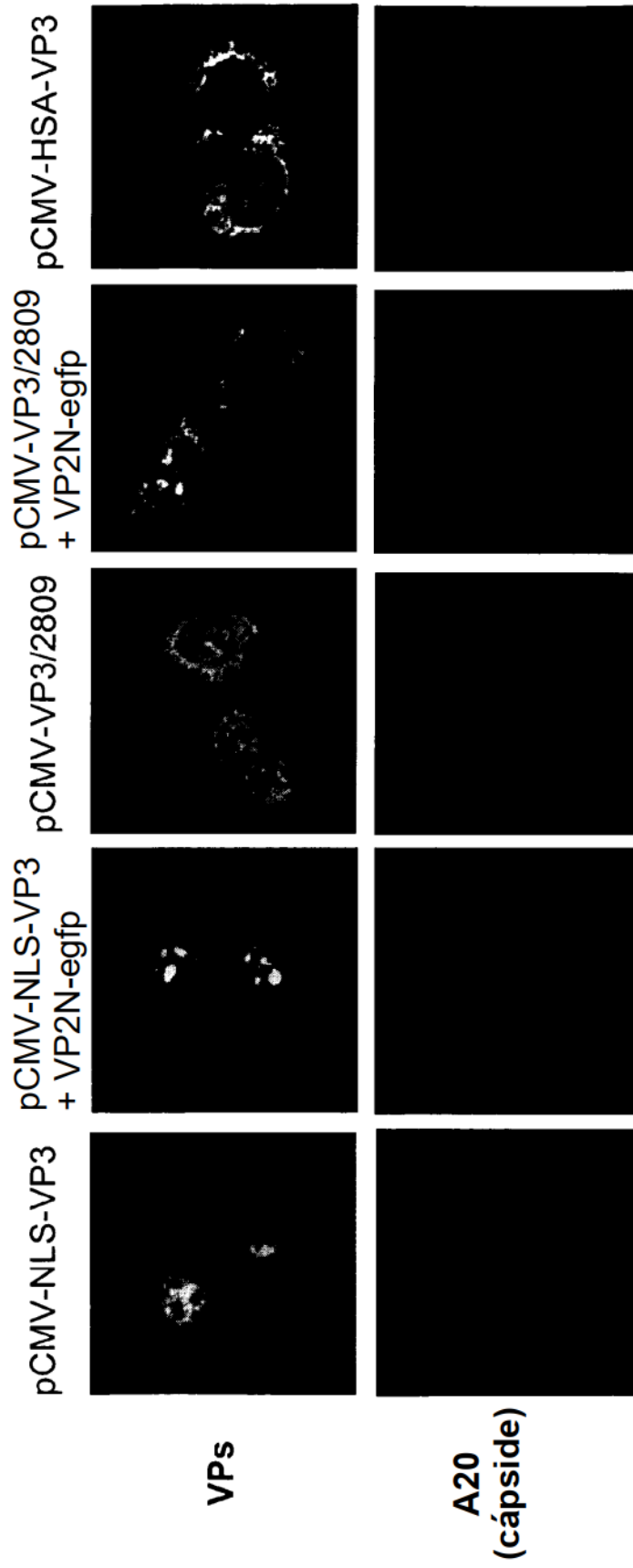


Fig. 12A)

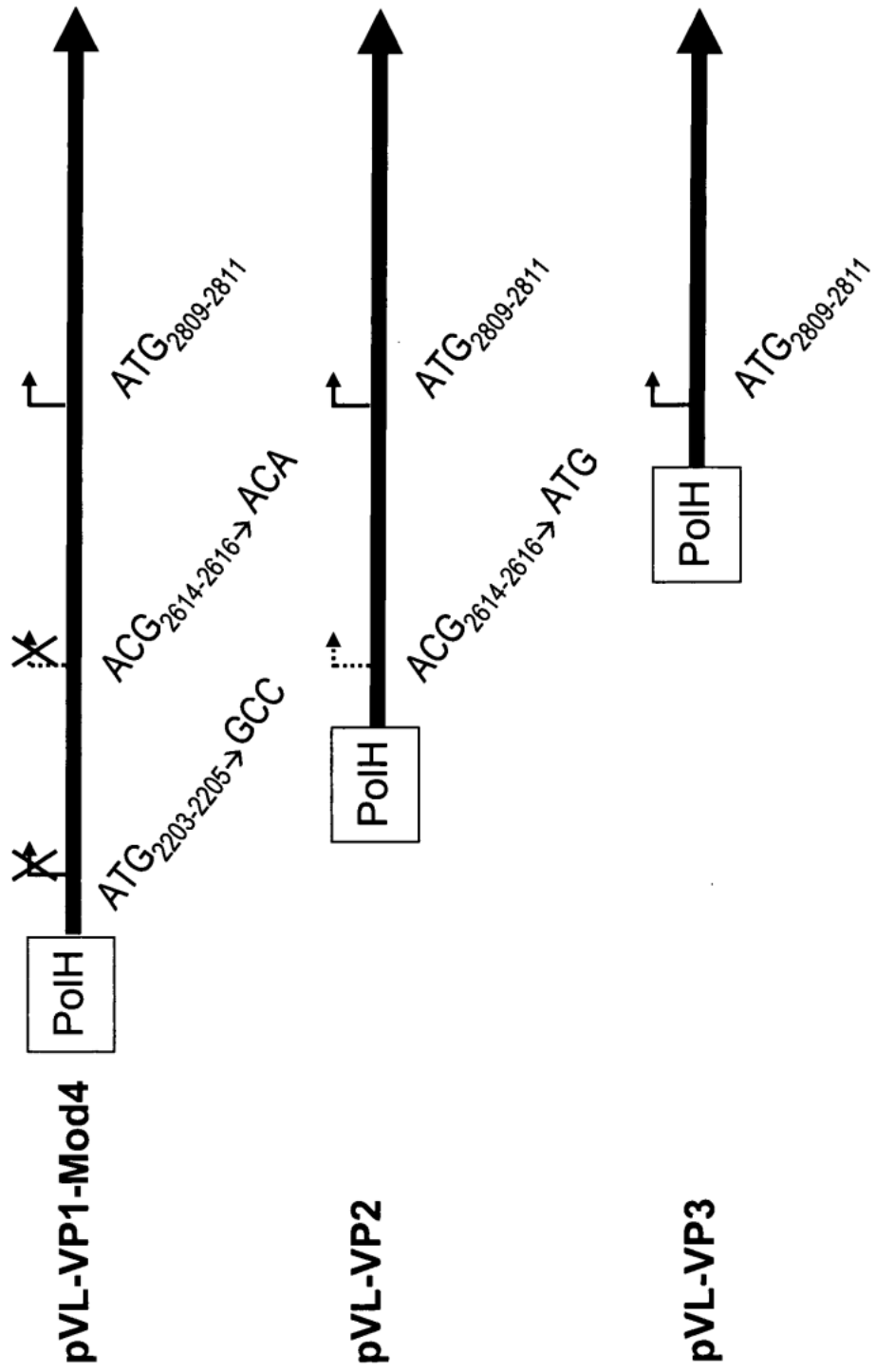


Fig. 12B)



Fig. 12C)

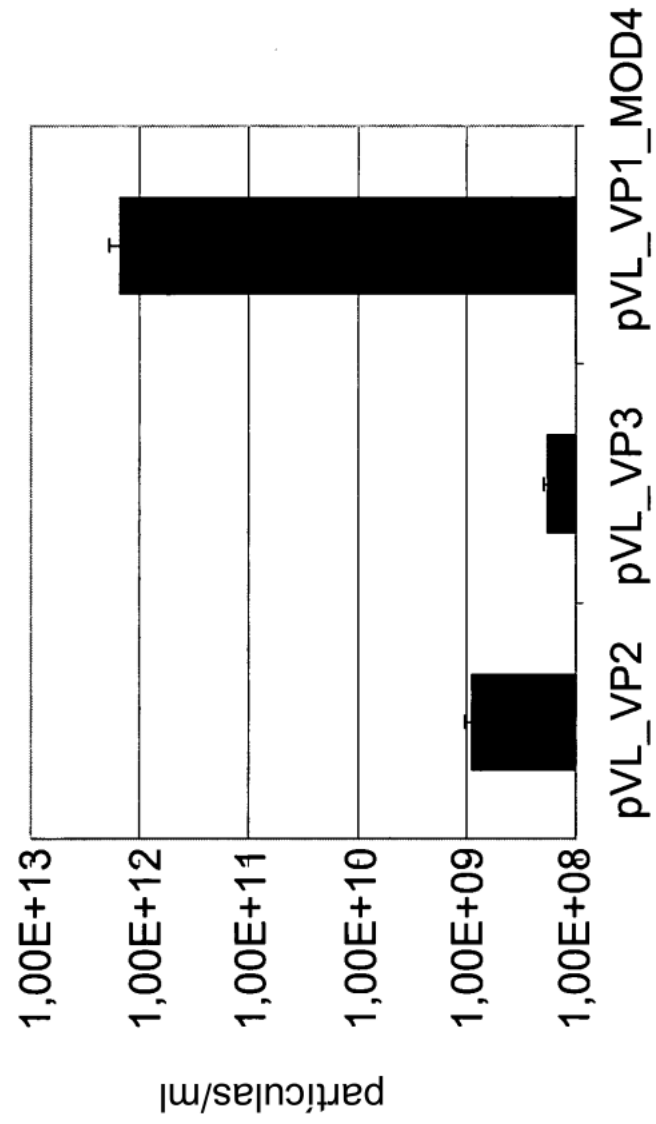
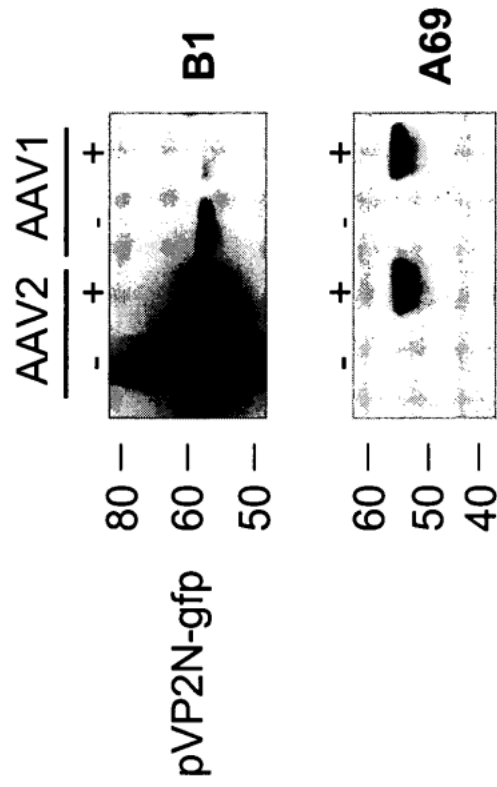
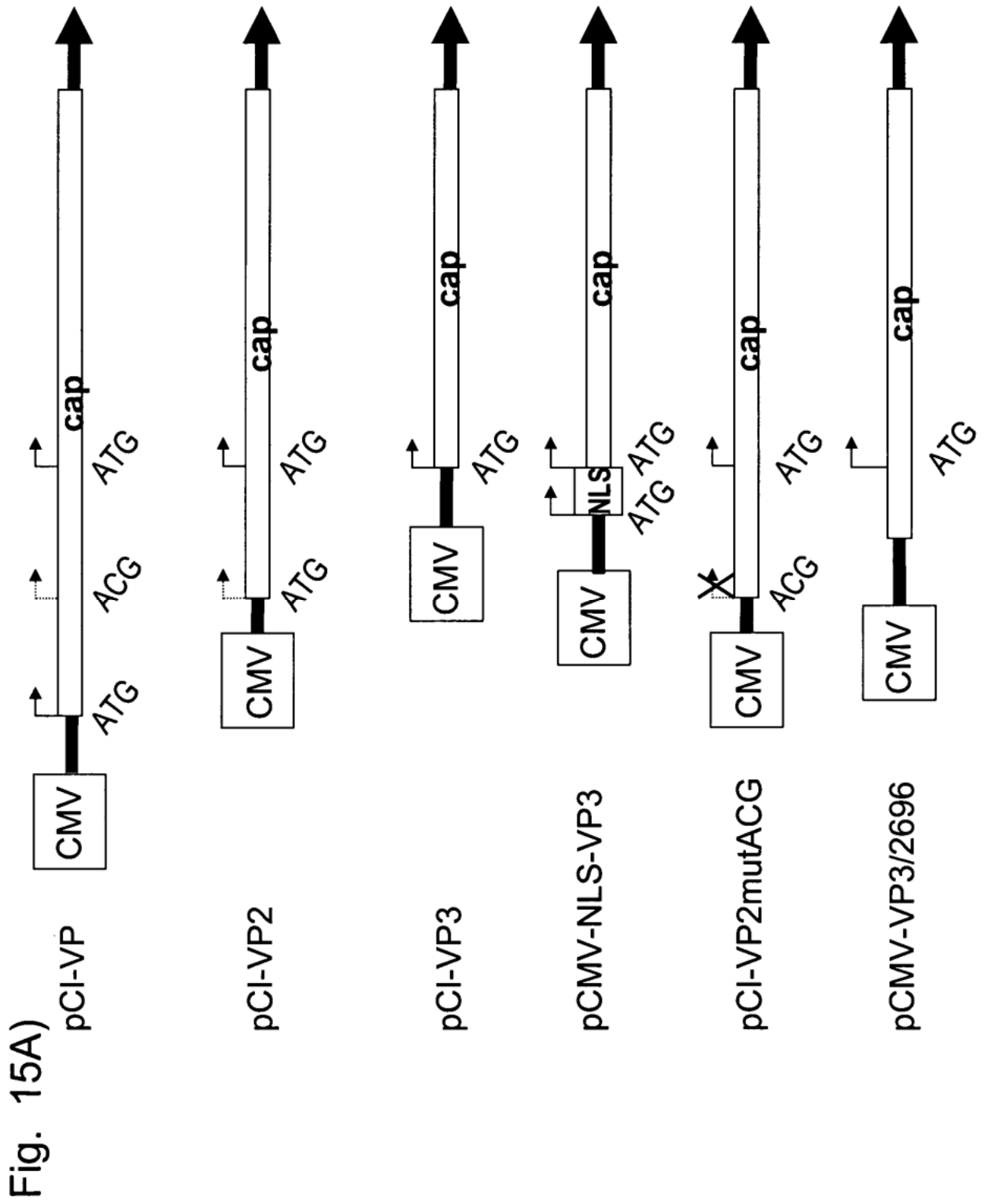


Fig. 13



Fig. 14





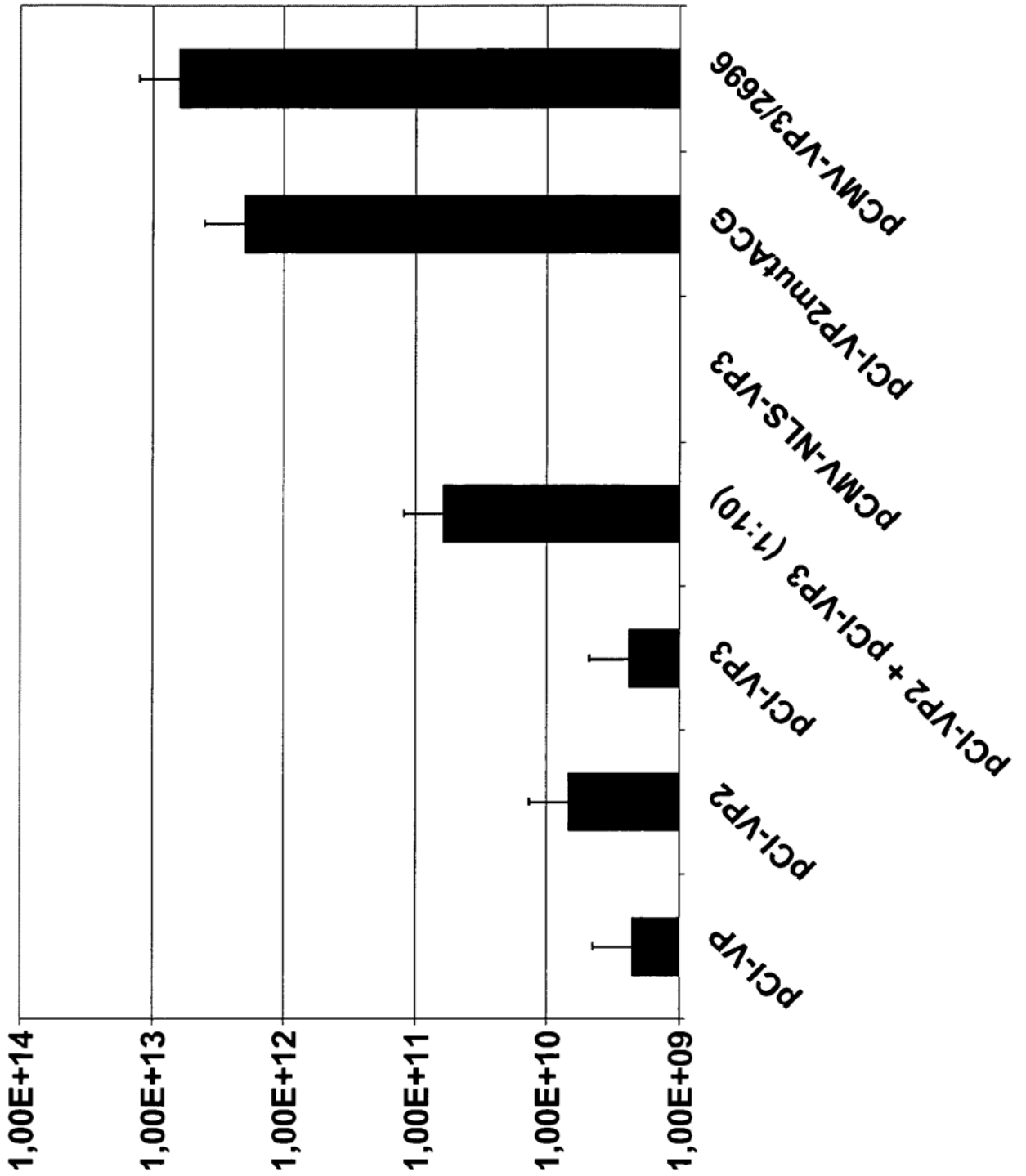


Fig. 15B)

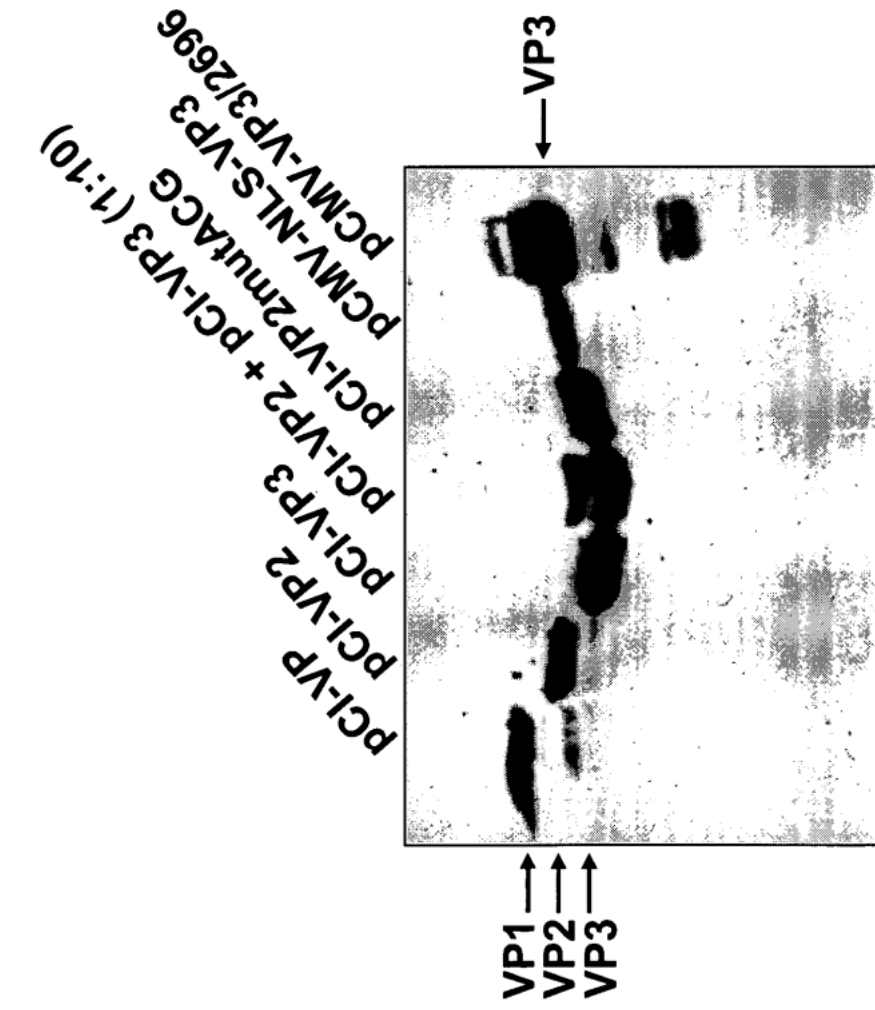


Fig. 15C)

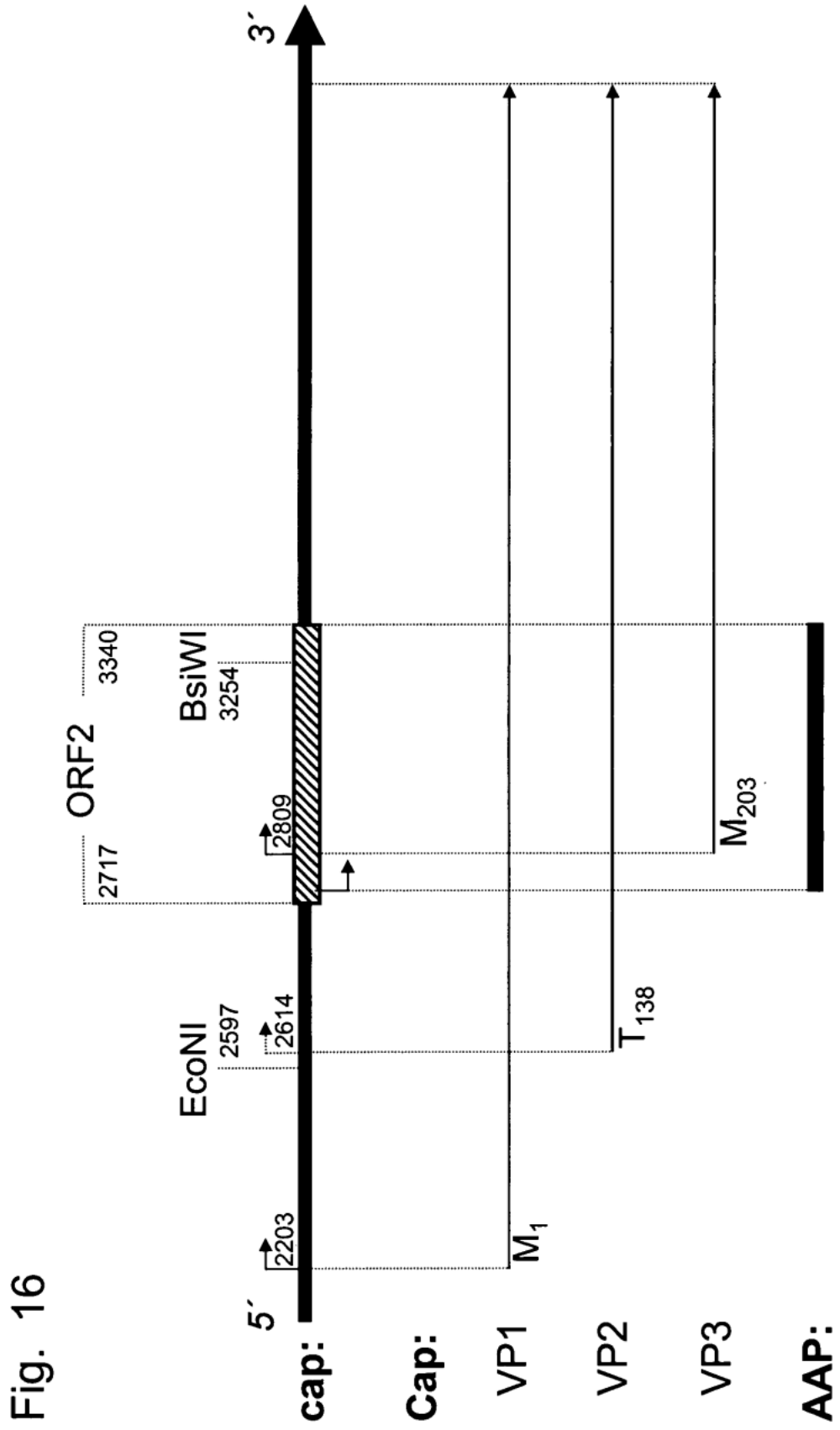


Fig. 16

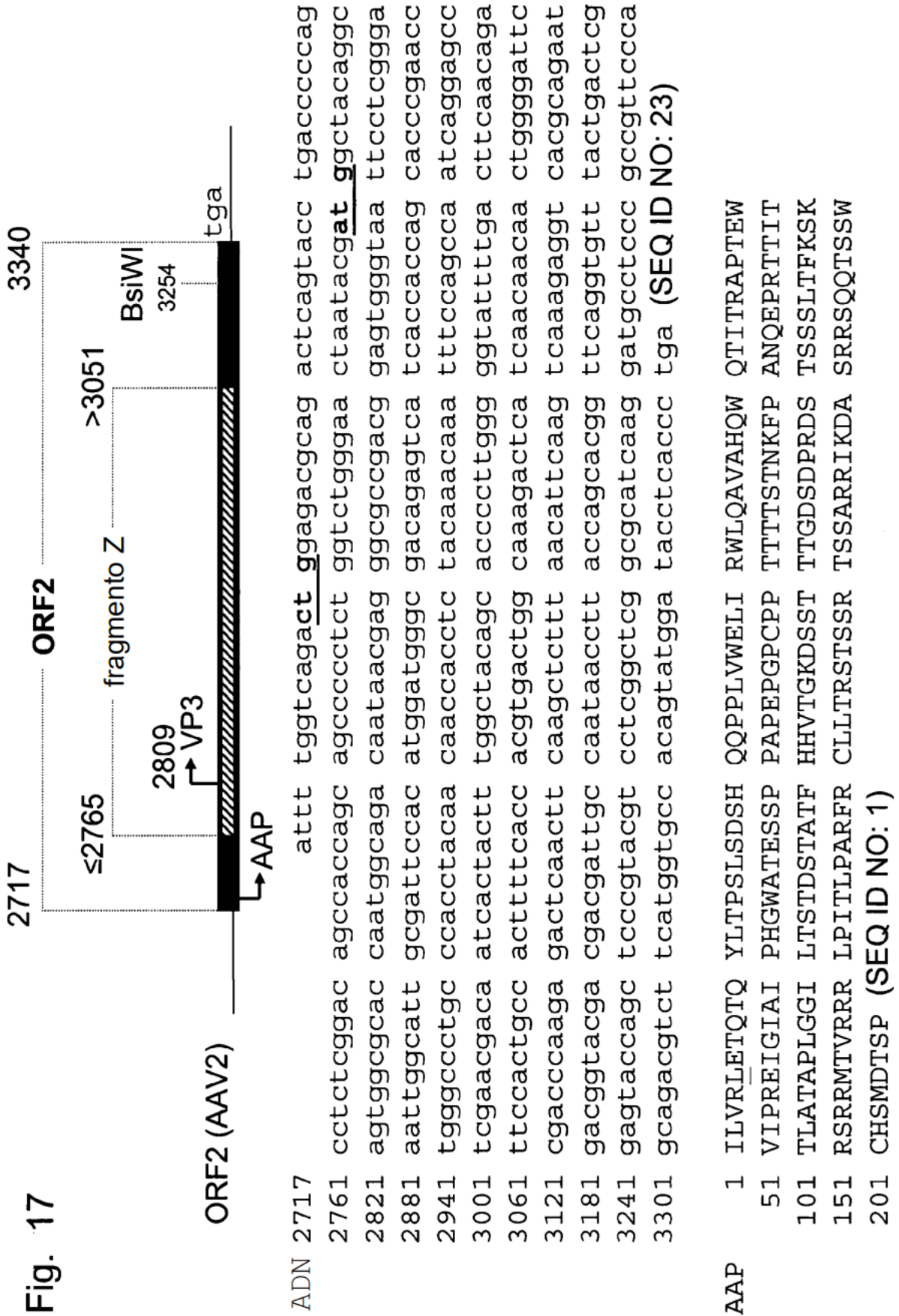


Fig. 18A)

```

ORF1cm      1      TTGAGGAACC TGTTAAGACG GCCCCTGGCA AGAAACGGCC CGTGGAGCAC
           51      AGCCCCGTGG AGCCCGACAG CAGCAGCGGC ACCGGCAAGG CCGGACAGCA
          101      GCCCGCCAGA AAGCGGCTGA→ACTTCGGCCA GACCCGCGAC GCTGATAGCG
          151      TGCCCGACCC TCAGCCCTG GGCAGCCTC CTGCTGCTCC TAGCGGCCTC
          201      GGCACCAACA CCATGGCCAC CGCAGCGGA GCCCCCATGG CCGATAACAA
          251      TGAAGGGGCA GACGGCGTGG GCAACAGCTC CGGCAACTGG CACTGCCGACA
          301      GCACCTGGAT GGGAGATCGG GTGATCACAA CCTCCACCCG GACATGGGCT
          351      CTCCCCTACTT ATAATAATCA CCTGTACAAG CAGATCAGCA GCCAGAGCGG
          401      CGCCAGCAAT GATAACCACT ACTTCGGGTA CTCTACACCC TGGGGCTACT
          451      TCGATTTCAA TCGGTTTCAC TGTCACTTCA GCCCCAGAGA CTGGCAGCGG
          501      CTGATTAATA ATAATTGGGG CTTCCGGCCC AAGCGGCTGA ATTTCAAGCT
          551      GTTCAATATC CAGGTGAAGG AAGTGACCCA GAACGATGGC ACCACACAAA
          601      TCGCCAACAA CCTGACCTCA ACCGTGCAGG TGTTACCCGA CAGCGAGTAC
          651      CAGCTGCCGT AC (SEQ ID NO: 57)

```


Fig. 18B)

ORF2cm 1 TTGAGGAACC TGTTAAGACG GCTCCGGGAA AAAAGAGGCC GGTAGAGCAC
51 TCCTCCTGTGG AGCCAGACTC CTCCTCGGGA ACCGGAAGG CCGGCCAGCA
101 GCCTGCAAGA AAAAGATTGA↓ATTTGGTCA GACTGGAGAC GCAGACTCAG
151 TACCTGACCC CCAGCCTCTC GGACAGCCAC CAGCAGCCCC CTCTGGTCTG
201 GGAAC TAATA CGATGGCTGC AGGCCGTGGC CCACCAGTGG CAGACCATCA
251 CCAGAGCCCC CACCGAGTGG GTGATCCCCTC GGGAGATCGG CATTGCCATC
301 CCTCACGGCT GGGCCACAGA GTCTAGCCCCT CCAGCCCCCTG AGCCTGGCCC
351 TTGTCCCCCT ACCACCACCA CCTCCACCAA CAAGTTCCCC GCCAACCCAGG
401 AACCCCGGAC CACCATCACC AACTGGCCA CAGCCCCCTT GGGCGGCATC
451 CTGACCAGCA CCGACAGCAC CGCCACC'TTT CACCACGTGA CCGGCAAGGA
501 CAGCAGCACC ACCACCGGCG ACAGCGACCC CAGAGACAGC ACCAGCTCCA
551 GCCTGACC'TT CAAGAGCAAG CGGAGCAGAC GGATGACCGT GCGGCGGAGA
601 CTGCCATATCA CCCTGCCCGC CAGATTCCGG TGCCCTGCTGA CCAGAAGCAC
651 CAGCAGCCGT AC (SEQ ID NO: 58)

Fig. 19

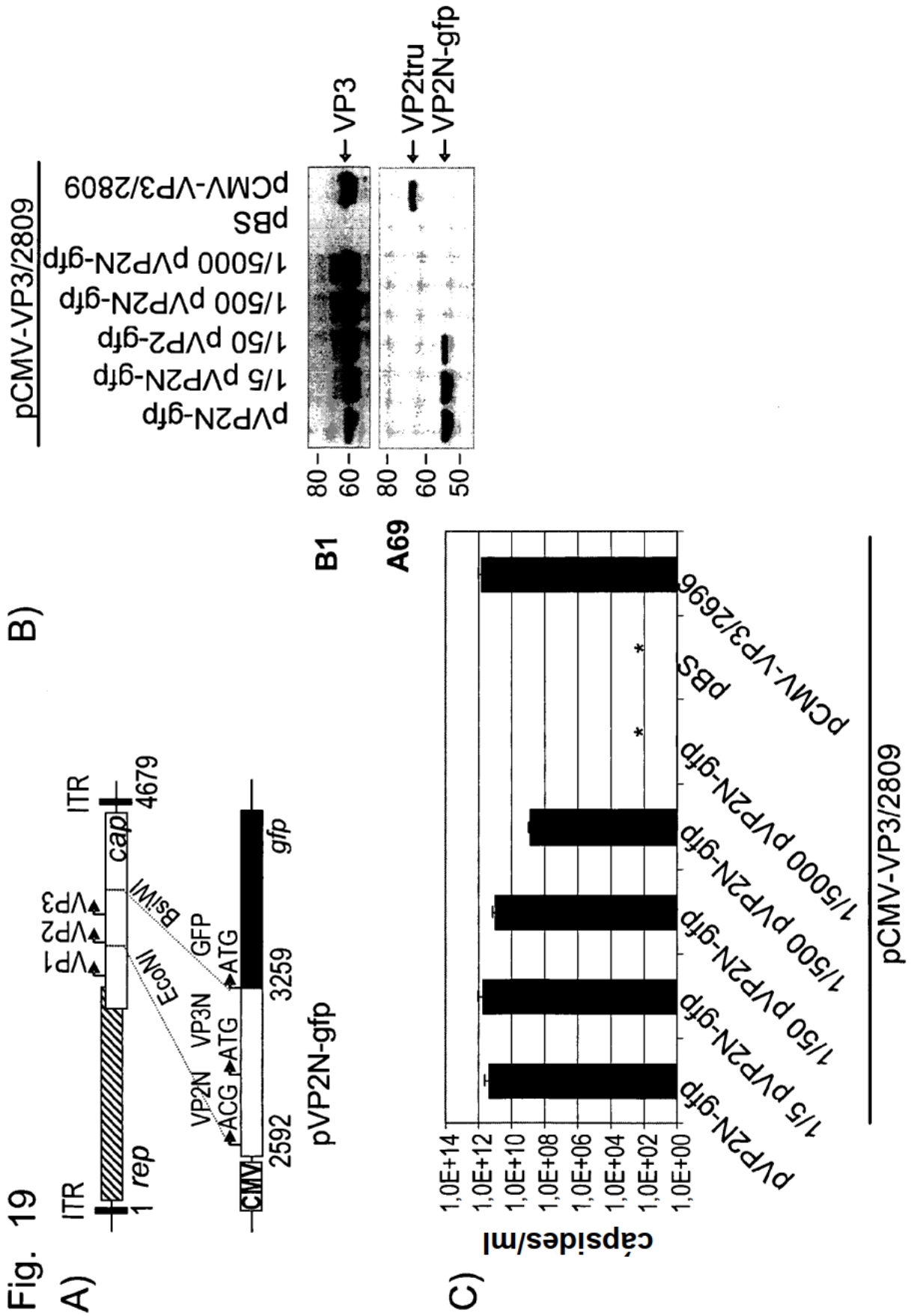


Fig. 20

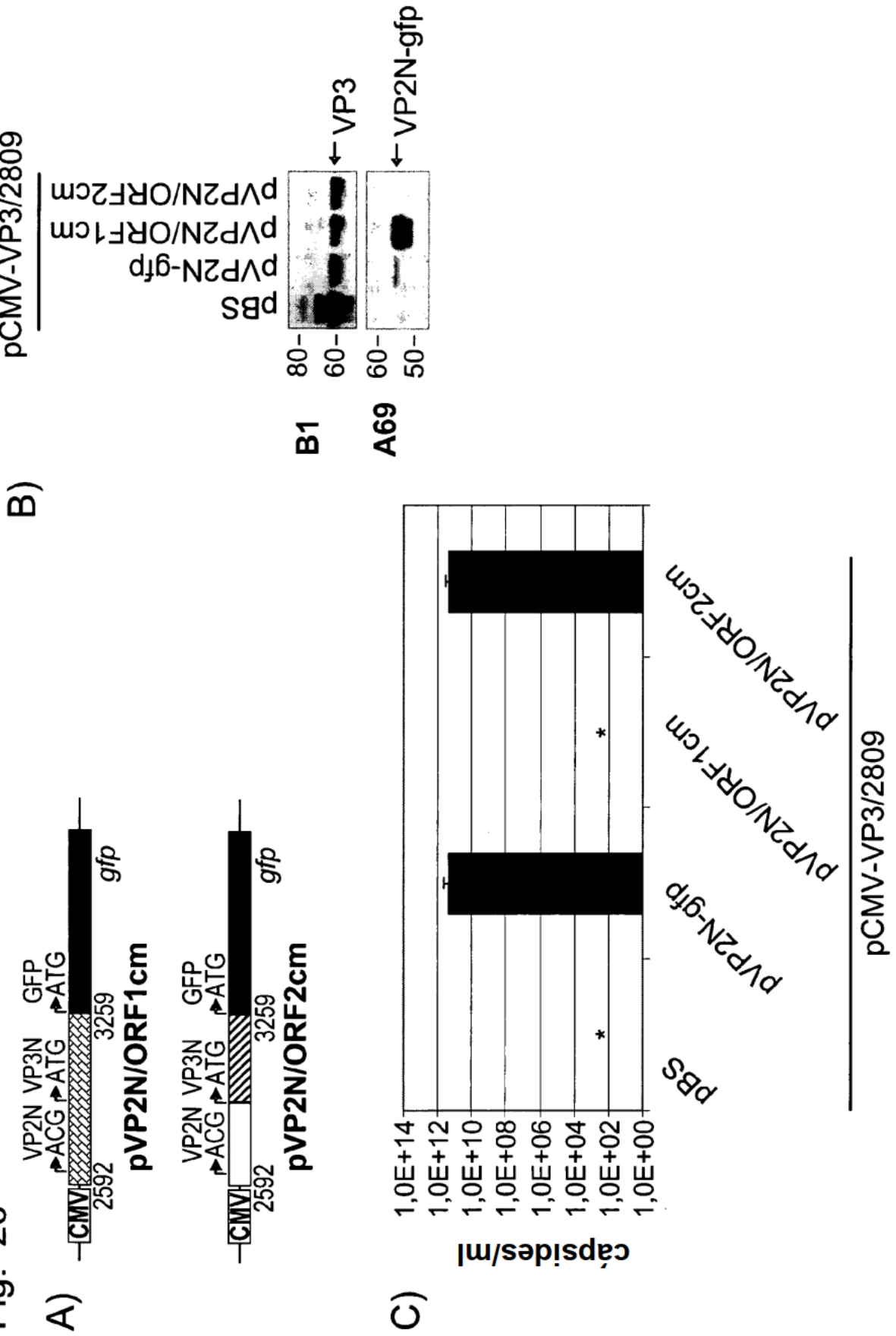
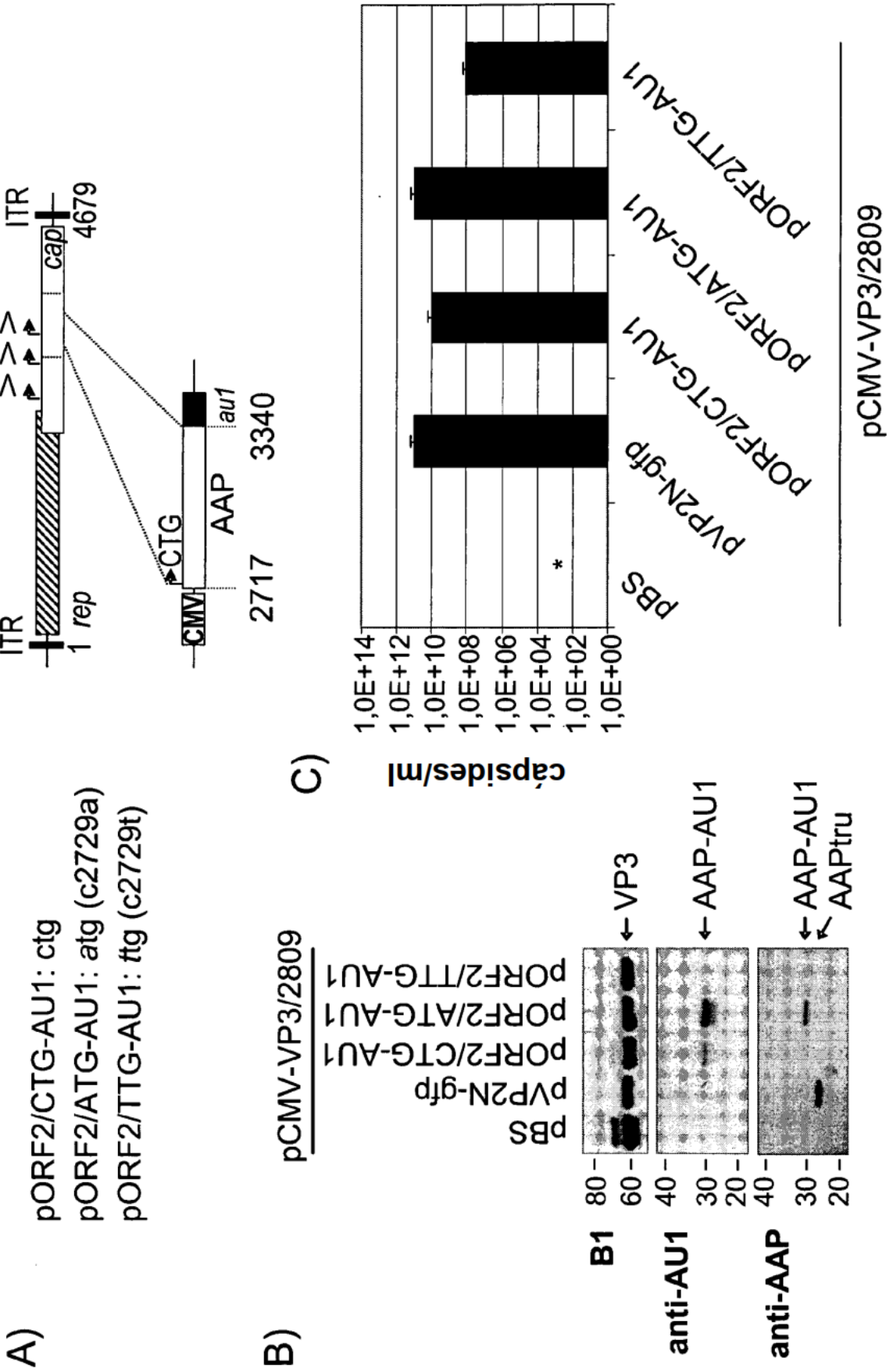
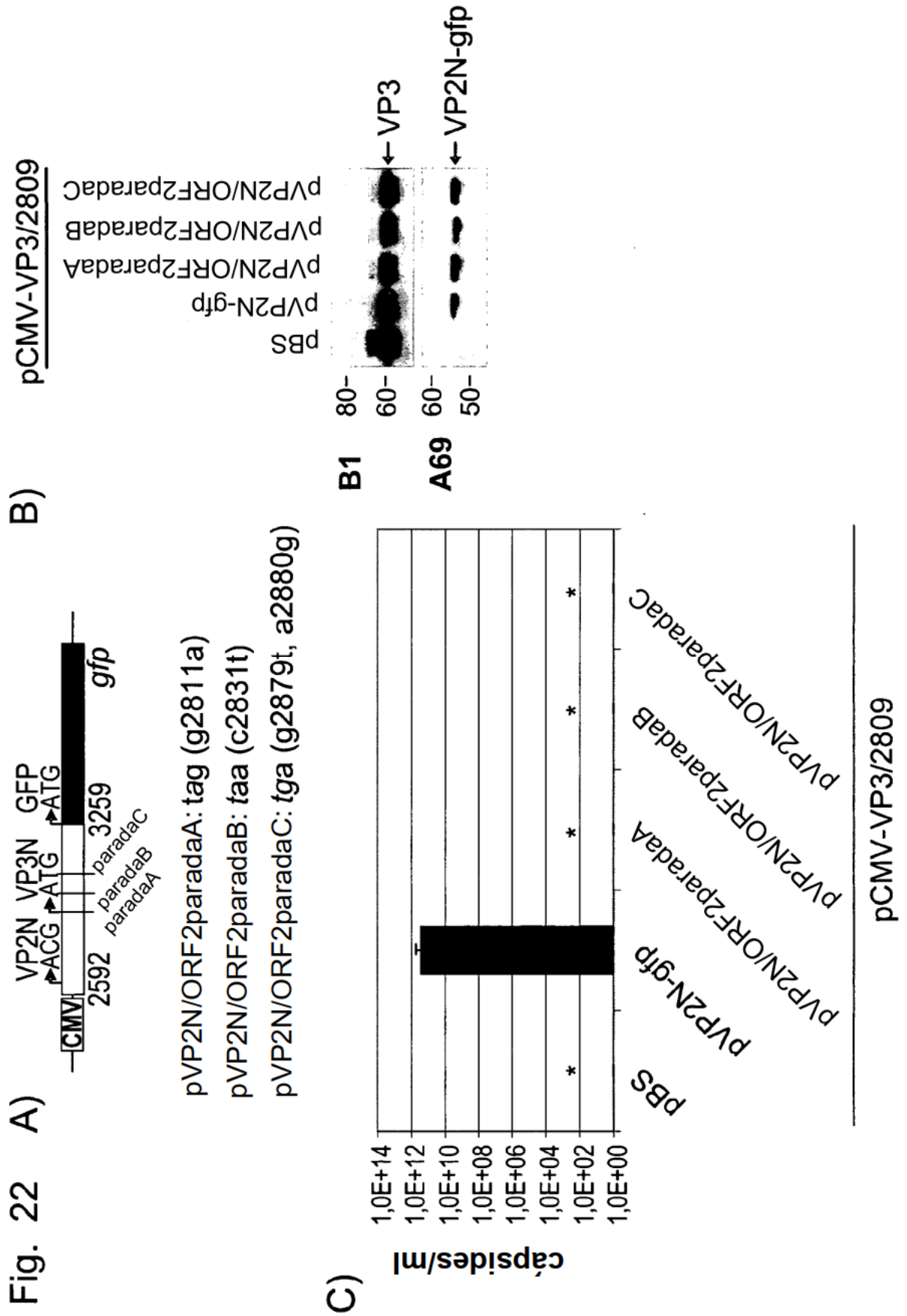


Fig. 21





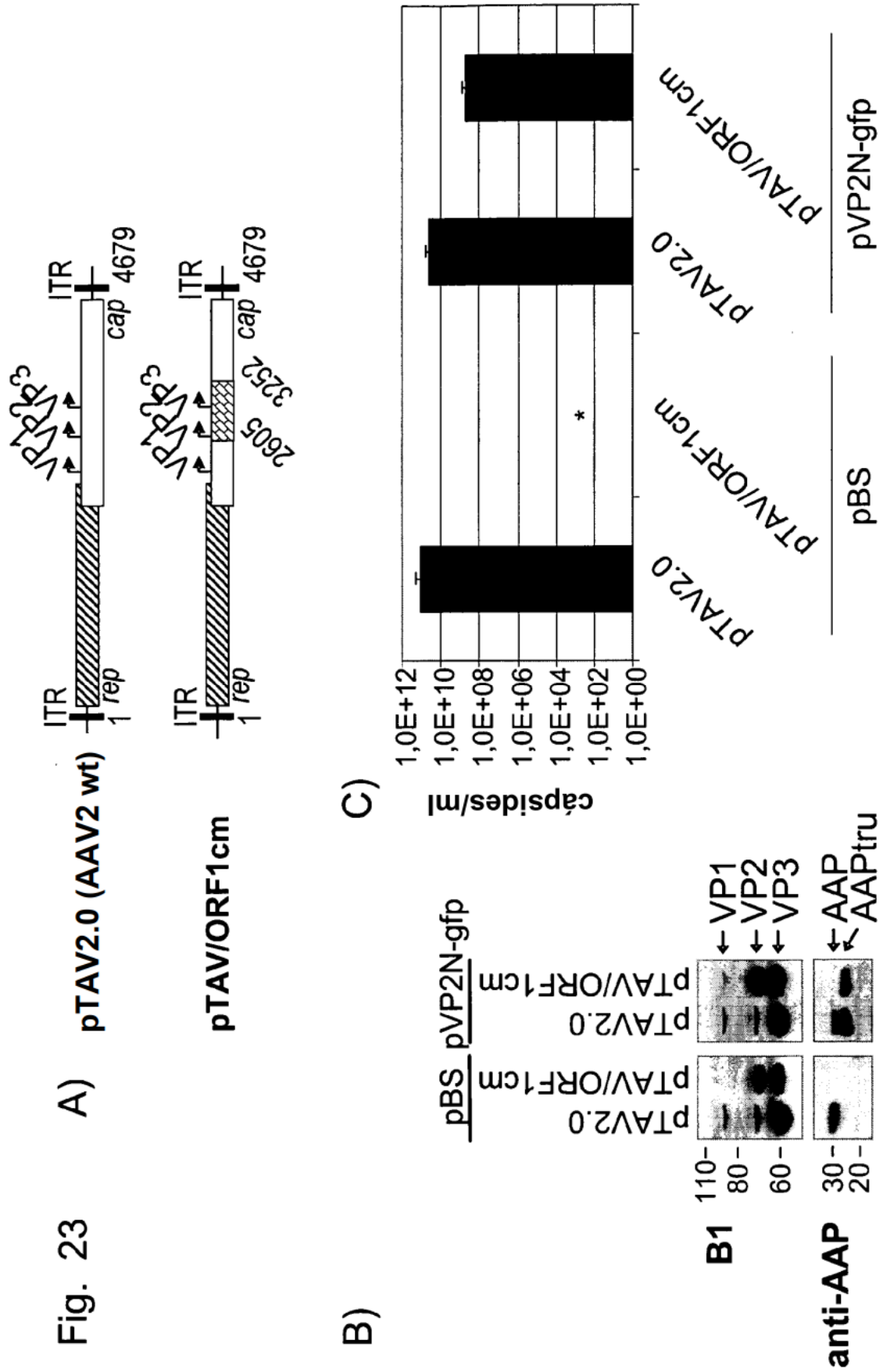
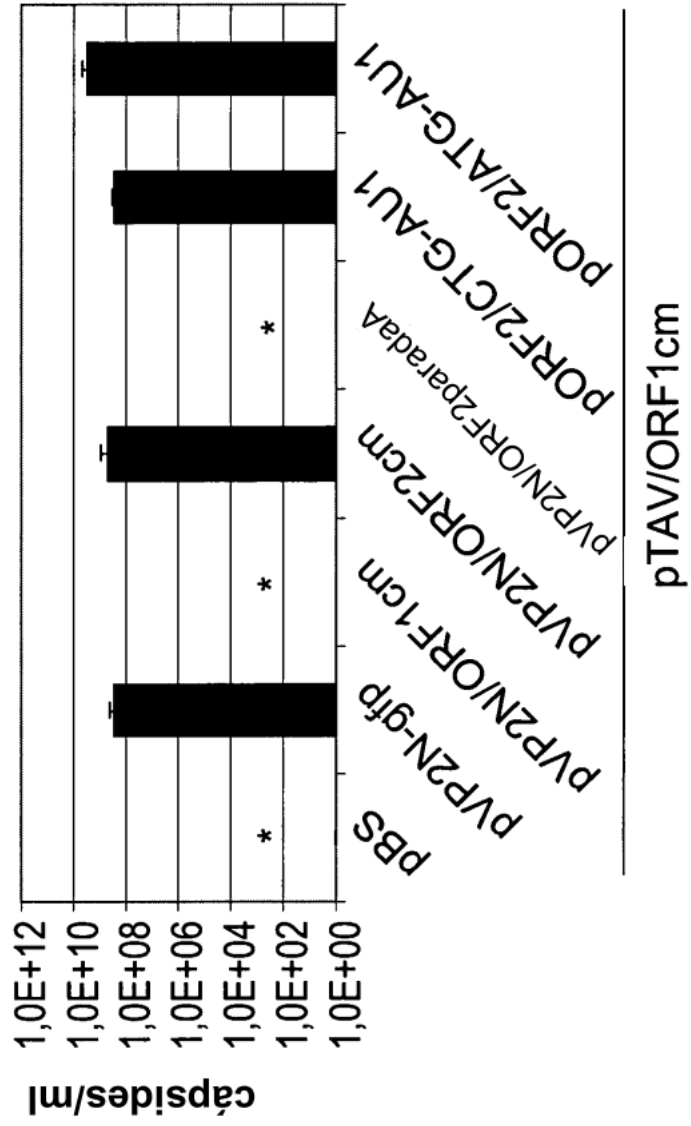
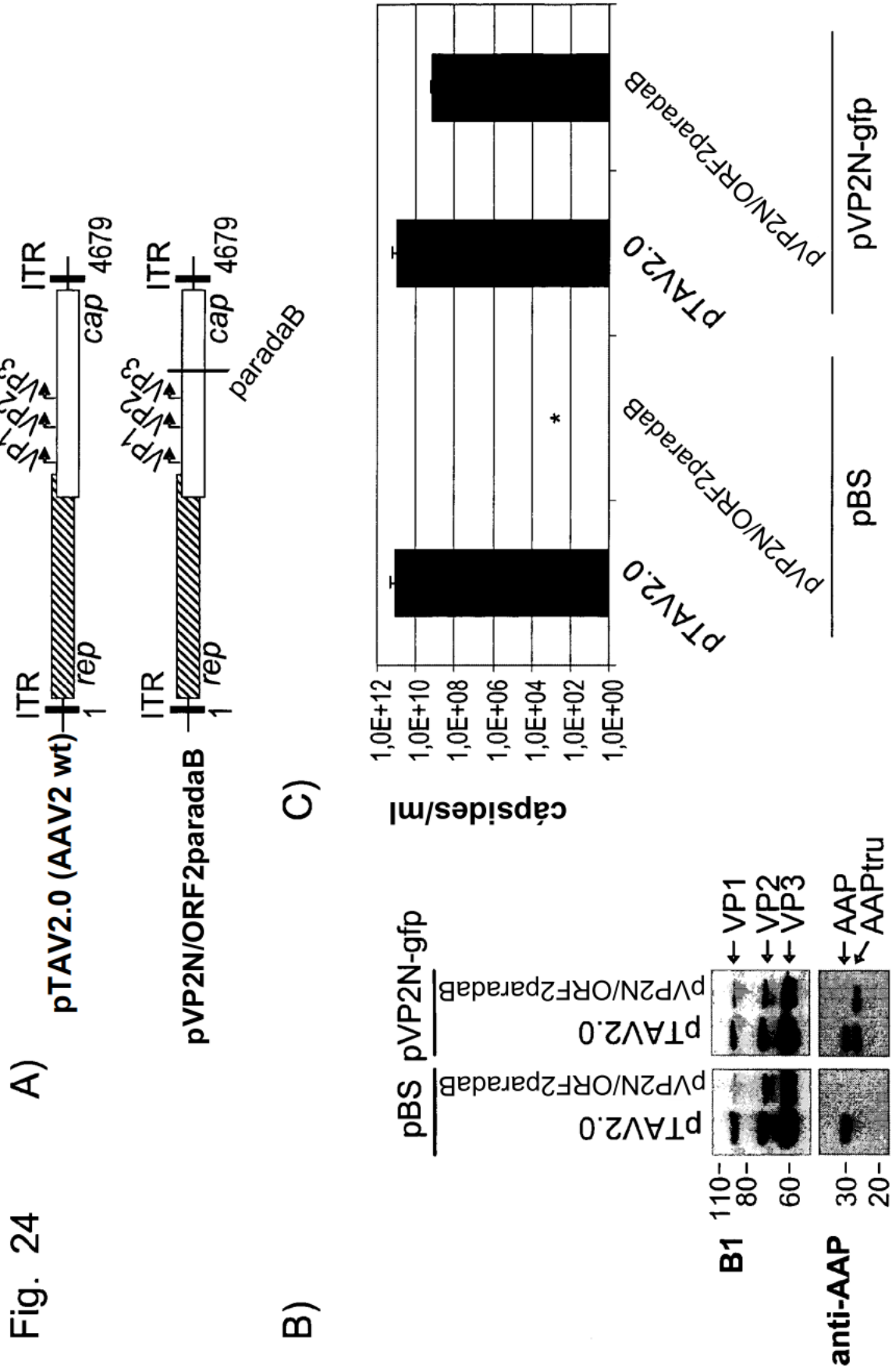


Fig. 23D)





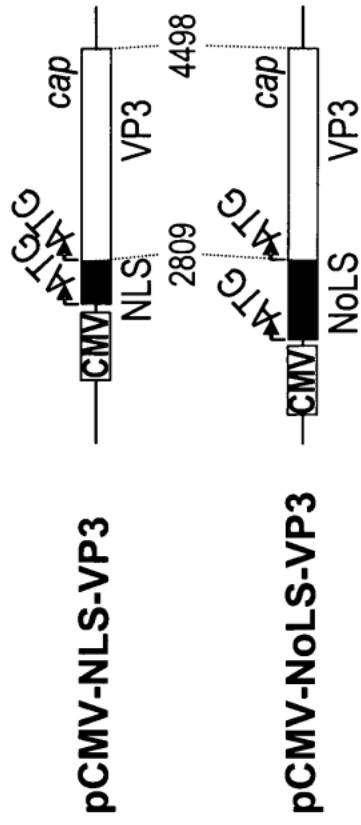


Fig. 25 A)

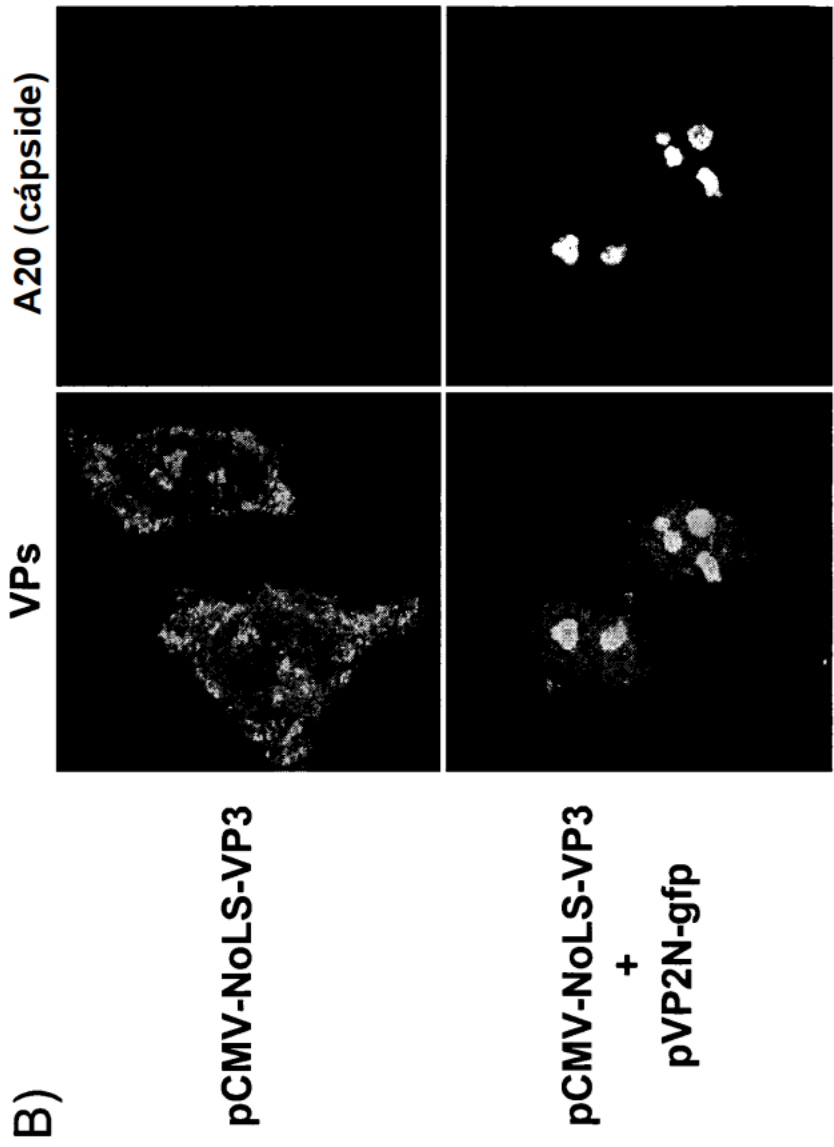


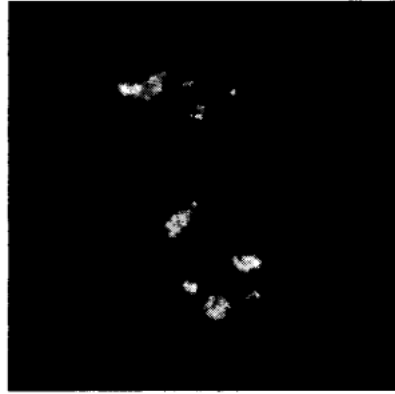
Fig. 25 C)

pCMV-VP3/2809
+
pORF2/ATG-AU1

anti-AU1



anti-Fibrilarina



fase



Fig. 26 A)

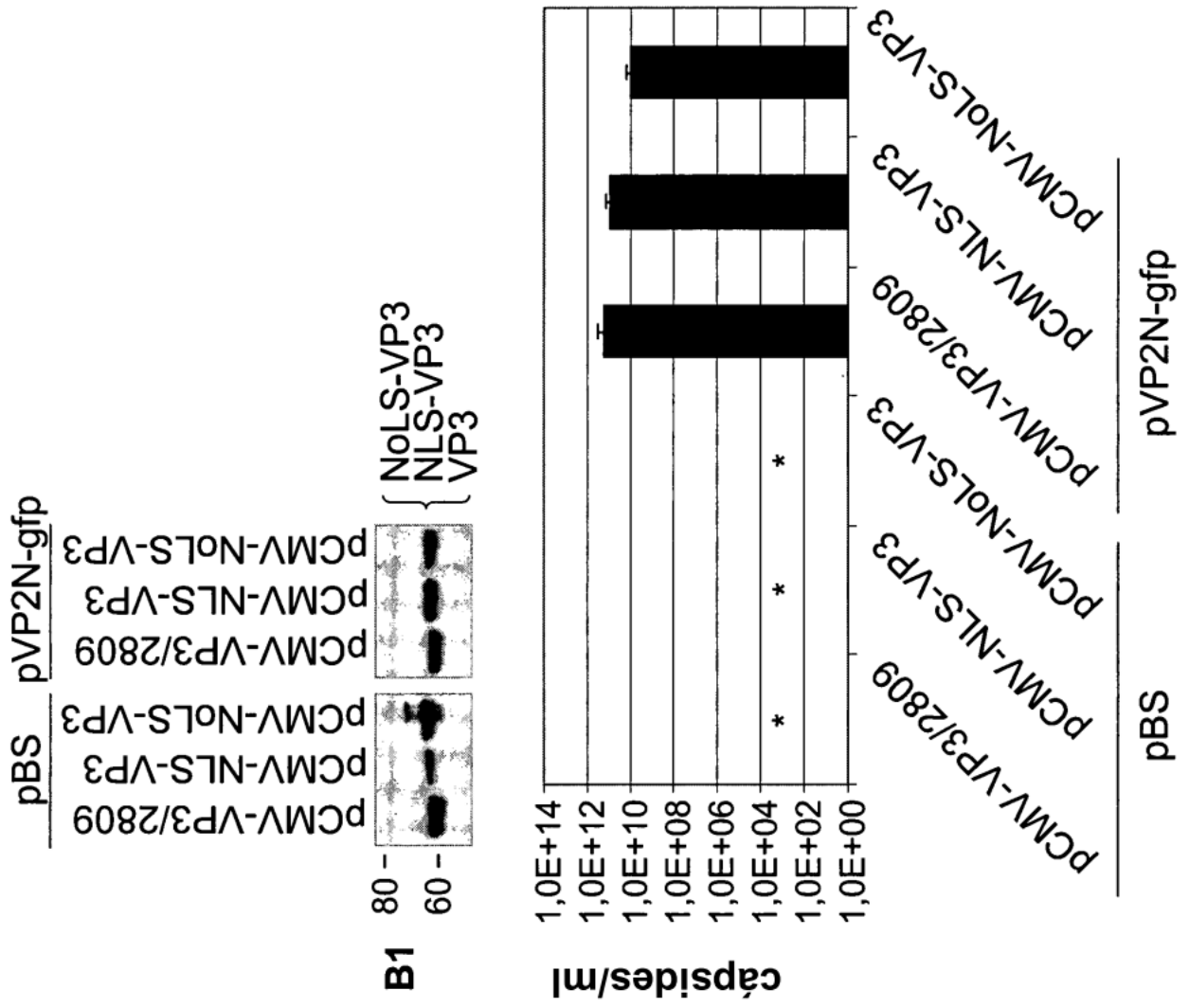


Fig. 27-1

```

AAV2      IIVRLEQTQYLTPSLSDSHQOPP--LV-----WELIRWL-----
AAV10     TLGRLASQSQPTLNQSENHQAP--LV-----WDLVQWL-----
AAV1_ratón TRRTVSSLPQRPPKLEALPPP--AI-----WDLVRWL-----
AAV_aviar  LNNPTTRPGGRSVPNASITFSRKRPRRPPSKAKPLLKRAKTPKEPLPTLDQAPLV-----WDHLSWL-----
AA_caprino TTTTFQKERRLIGPKRTPSLPPRQTKLPDPADPSSCKSQHNQPVWELIQCL-----
AAV1_rata  ASRSRWLLQSSVHTRPKPQTRRRVSRDRIPGRRPRRGSSPISLQLQTYLHPHNSPSLPQGFVWFVRCLE-----
PV_ganso   KTEE--PPRRAPNL-----WQHLKWQ-----
PV_pato    KSLNLYLKKTLHLHPVIVEEKQVQ--LPPKAPNL-----WQHLTWQ-----
b-AAV      SRVLKSQTPRAELARKANSLEPERDSTLTNNLEPETGLPKDHLPELCLLRLKCV
PV1_serpiente TNTILKLRPNKACRYQLHLKAEKKLHRHNLEGAQQVPIIAAHL-----SWL
conservada
-----

AAV2      QAVAHQWQITITRAPTEWVI PREIGIAI PHGWATESSPPAPEPGPCPTTTTSTNKFPANQ--EPRITITTLATAPLGGILSTSDSTATF
AAV10     QAVALQWQITITKAPTEWVVPQEIIGIAI PHGWATESSPPAPEPGPCPTTTTSTKSPGTGHRREEAPTITPTTSATAPPGGILSTSDSTATS
AAV1_ratón EAVARQSTTARMVPMEWAMPREIGIAI PHGWTTVSSPEPLPGICQPTTTTSTN----DSTERPPEITKATSDSAPPDGLTSTASTAVIS
AAV_aviar  KEVAVQWAMQAKVPTEWAI PREIGIAI PNGWTTESLPELEPGSCPATTTTCT--SGKDREEPTTINSLDSAPPDGLTSTASTATS
AA_caprino REVAHWATITKVPMEWAMPREIGIAI PRGWTESSPPAPGCCPATTTTCTSRSQTPPACTASPAGADTLATAPPGGTLTASTATG
AAV1_rata  QEEALQWMLNKVPTEWAMPREIGIAI PNGWATEFSDPPGPGCCPATTTTCTSRQTPPACTASPAGADTLATAPPGGTLTASTATG
PV_ganso   REEAEELWATLQGVPMEWAMPREIGIAI PNGWETQSSQRPPEPGSCQATTTTSTKQLPVE--PLKMQMSSMQDTPVPPGGTLTASTATG
PV_pato    REEAEELWATLQGVPMEWAMPREIGIAI PNGWETQSLPRLQEPGSCQATTTTSTKPSQAE--QIQIQIIPNMLDTAPPGGTLTASTATG
b-AAV      QQLAEMVAMRDKVPREWVMPVIGIAI PLGQRATSPQPAPGSCPTTTTCTCGS-----ARATPATPSTDSPPPGLTTLTASTATS
PV1_serpiente QEEAVRWQITITRAPREWVI PQVIGIAI PSGWETTSLQSQPELGCSPLTGIISTGLSILTAPQVRVLMQPMQDTRLPGGTLTSDSIATS
conservada
-----

AAV2      HHVTGKDSSTTTGSDPRDSTSSSLTFKSKRSRRMTVRRRLPITLPAFRCLLTRTSSRTSSARRIKDARRSQTSWCHSMDTSP
AAV10     HHVTGSDSSTTTGDSGQKDSASSSTSRSSRRRMKAPRPPITLPAFRFRYLTRNTSCRSSAPRTRAAACLRSSRMSS
AAV1_ratón PLETGKDSSTITGSDQRAYGSKSLTFKLKKSRRKTKQRSSPITLPAFRFRYLTRTSSRT
AAV_aviar  PPETGNDSSSTTIGASDPKRCALDLSLTLRLKKSLSKTPPPPTTSPARSKSLRTRTSSCRSSDRLQAPRRRSQRISTRSRSMVTAR
AA_caprino APETGKDSSTTIGASDPGLSEKSTSKSKRSRCKTTPPPPTTSPPPSKLRTTTTNSRTSSATGPRDACRPSRRSLRCRSTARR
AAV1_rata  RPETGSASSITIGASDPRDCESNSSTSRSSRRSLLIRRPSPPTTSPARSRSSQTTSTSCRSAATPPRDACRRSPRTSSRCRSTARR
PV_ganso   PLETGRDLSTTIGESDPNLLNSRSMKSKKQRRIKQRPLOTISPQRFKSLRMMMSINSRMSWARLKPACRRSRMSMPCRSSTGTAQC
PV_pato    LQETGRDSSTTIGGLDRKHSNRYSMCKLKKSRKTRQRLLLTTLPLQSRYSRIMNTSCPMFWARPRRGRCHRSPQCMPCPSTATAQC
b-AAV      RQETGKGSSTTTGDCAPKACKSASSTSKLRRSRRLTGRPPYPTTSPARSRSLTARTSSRT
PV1_serpiente PLETGKDSSTTTQASGRKDSKSLTSKSKKLQHKIQRKQLPTISPAPYRSLRTRTTTTYHMY
conservada
-----

```

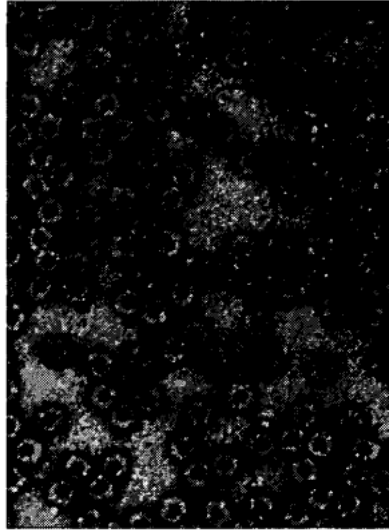
Fig. 27-2

AAV2	(SEQ ID NO: 1)
AAV10	(SEQ ID NO: 10)
AAV1_ratón	(SEQ ID NO: 16)
AAV_aviar	(SEQ ID NO: 143)
AA_caprino	(SEQ ID NO: 18)
AAV1_rata	(SEQ ID NO: 19)
PV_ganso	(SEQ ID NO: 20)
PV_pato	(SEQ ID NO: 21)
b-AAV	(SEQ ID NO: 13)
PV1_serpiente	(SEQ ID NO: 22)
conservada	

TPTRMEHGSMTVVHSTA
TPTRVELDSMTEVPSIA

Fig. 28

VLP de VP3



VLP de VP1,2,3

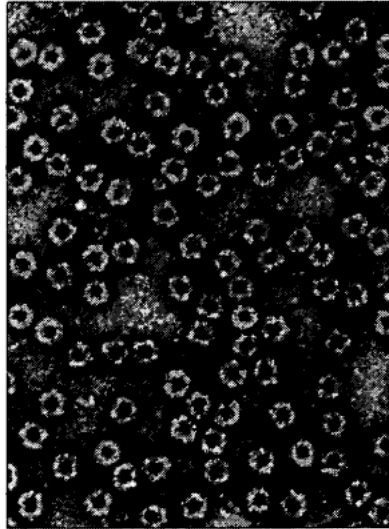


Fig. 29

