

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 912**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2013 PCT/US2013/037170**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158879**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013 E 13778449 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020 EP 2839014**

54 Título: **Composición y procedimientos para la transferencia genética de alta eficiencia utilizando variantes de cápside de VAA**

30 Prioridad:

18.04.2012 US 201261635273 P

15.03.2013 US 201361794995 P

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

08.10.2021

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(100.0%)
3401 Civic Center Boulevard
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**YAZICIOGLU, MUSTAFA, N.;
MINGOZZI, FEDERICO;
ANGUELA, XAVIER y
HIGH, KATHERINE, A.**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 862 912 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

Composición y procedimientos para la transferencia genética de alta eficiencia utilizando variantes de cápside de VAA

5

Campo de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La presente exposición se refiere de manera general a los campos de la terapia génica y la biología molecular. Más específicamente, la presente exposición proporciona vectores víricos adenoasociados que comprenden variantes de cápside proteica que mejoran la eficiencia de transducción de los vectores VAA que comprenden transgenes terapéuticamente beneficiosos.

10

Antecedentes de la invención

El virus adenoasociado (VAA) es un virus pequeño (20 nm) sin cubierta y sin capacidad de replicación. Se han caracterizado muchos serotipos de VAA diferentes en seres humanos y primates no humanos. El genoma de VAA comprende ADN de cadena sencilla con repeticiones terminales invertidas (RTI) de 145 pb en ambos extremos. Existen dos marcos de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés): rep y cap. Aunque los productos de rep resultan esenciales para la replicación del VAA, se expresan 3 proteínas de cápside (VP1, VP2 y VP3) a partir del gen cap. VP1, VP2 y VP3 se reúnen en proporción 1:1:10 para formar una cápside icosaédrica (Xie Q. *et al.*, 2002). Durante la producción de vector VAA recombinante (VAAr), se empaqueta un casete de expresión flanqueado por RTI en la cápside de VAA. Los genes requeridos para la replicación del VAA no están incluidos en el casete. El VAA recombinante se considera uno de los vectores víricos más seguros y es uno de los más ampliamente utilizados para la transferencia genética *in vivo*. Los vectores pueden infectar células de múltiples tipos tisulares, proporcionando una fuerte y persistente expresión del transgén. También son no patogénicos y presentan un perfil de baja inmunogenicidad (High KA, 2011).

15

20

25

30

35

40

Uno de los objetivos inmediatos de las pruebas de terapia génica es la optimización de vectores para maximizar la transducción de tejidos, minimizando simultáneamente la dosis de vector. Tras la entrada en la célula, las proteínas de cápside de VAA están sujetas a degradación mediada por el proteasoma. La fosforilación de los residuos de tirosina expuestos en la superficie de la cápside del VAA representa una de las primeras etapas que conduce a la degradación del virus mediante la vía de ubiquitina-proteasoma (Zhong L. *et al.*, 2007). La mayor parte de la proteólisis regulada en la célula se produce por dicha ruta. La ubiquitina es una proteína pequeña (~8.5 kDa) que puede encontrarse en todas las células eucarióticas. La ubiquitina se encuentra unida a la cadena lateral de los aminoácidos de una proteína de sustrato. Tras unir proteínas de ubiquitina adicionales al sustrato mediante la ubiquitina inicialmente unida, se forma una cadena poliubiquitina y el sustrato se marca para la degradación (Thrower J.S. *et al.*, 2000, Peng J. *et al.*, 2003, Bedford L. *et al.*, 2011). Se ha mostrado que la mutación de residuos de tirosina expuestos en la superficie conduce a un incremento de la eficiencia de la transducción de los vectores VAA2 (Zhong L. *et al.*, 2008). Más recientemente, varios grupos han mostrado que la estrategia resulta eficaz además con otros serotipos de VAA en varios tejidos, incluyendo VAA de serotipos 6 y 8.

45

Sumario

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan nuevas variantes de VAA caracterizadas por las reivindicaciones adjuntas, que muestran una eficiencia de transducción incrementada en comparación con los serotipos de VAA (por ejemplo, VAA1, VAA2, VAA8 y VAA-rh74) que no presentan las modificaciones divulgadas en la presente memoria. Dichos vectores mejorados resultan útiles para la transducción de una diversidad de tejidos, incluyendo hígado, músculo, cerebro y retina.

50

55

60

También se describe en la presente memoria un vector virus adenoasociado (VAA) que comprende una proteína de cápside VP1 alterada, en el que la proteína de cápside alterada comprende sustituciones del residuo lisina, que de esta manera reducen la ubiquitinación de la cápside e incrementan la eficiencia de transducción del VAA variante en los tejidos y células diana. El vector puede comprender además un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un minigén que comprende repeticiones terminales invertidas del VAA y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga) operablemente ligado a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto a partir de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula huésped. Preferentemente, el vector VAA puede comprender una o más sustituciones de lisina en VP1 tal como se proporciona en las tablas proporcionadas en la presente memoria. Además, el vector VAA puede ser de serotipo VAA8 y contiene una alteración prevista en la tabla 3.

65

Preferentemente, los vectores VAA de la exposición que comprenden las proteínas de cápside variantes resultan útiles para la expresión de péptidos terapéuticos o ácidos nucleicos terapéuticos. Entre dichos péptidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, una molécula de ARNi antivírica, factor VIII, factor IX o un fragmento funcional del

5 mismo. Entre los productos de expresión adicionales se incluyen, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados o anticuerpos de cadena sencilla. El producto de expresión puede ser un ARNi que resulta útil para inhibir la infección y replicación por el VHC. El producto de expresión también puede ser un ácido nucleico antisentido útil para regular negativamente una célula diana de interés.

10 En la presente memoria se describe además una composición farmacéutica que comprende los vectores VAA variantes de la exposición en un portador biológicamente compatible. Se encuentran comprendidos en la presente exposición, además, cultivos celulares que comprenden los vectores divulgados en la presente memoria.

15 En la presente memoria se describe además un procedimiento de administración de un transgén en una célula en un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende la etapa de poner en contacto la célula con un vector VAA tal como se da a conocer en la presente memoria, en el que dicho vector VAA comprende el transgén, en el que la presencia de sustitución de lisina en la secuencia de la cápside VP1 en dicho vector está asociada a una ubiquitinación reducida y una eficiencia de transducción incrementada.

20 Finalmente, en la presente memoria se describen, además, variantes víricas de señuelo que son ineficientes en la infección de células pero que resultan eficaces en el bloqueo de la neutralización de anticuerpos de variantes víricas que portan transgenes beneficiosos debido a las similitudes estructurales de las dos variantes víricas. Entre los ejemplos de variantes de cápside con este fin se incluyen, por ejemplo, K38R, K143R, K510R y K709R

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1: lisinas sobre la superficie de VAA1, VAA2 y VAA8: los números de PDB de los serotipos de VAA utilizados en la presente memoria son los siguientes: VAA1: 3NG9, VAA2: 1LP3 y VAA8. 2QA0. Las flechas representan los residuos de lisina respectivos. (A) Hay 11 lisinas sobre la superficie de VP3 del VAA1. Los colores de los residuos son los siguientes: K258 rojo, K459 azul, K491 amarillo, K493 magenta, K508 cian, K528 salmón oscuro, K533 verde pálido, K545 azul pálido (pizarra), K567 salmón oscuro, K666 cian pálido y K707 gris. (B) Hay 10 lisinas sobre la superficie de VP3 del VAA2. Los colores de los residuos son los siguientes: K258 rojo, K490 amarillo, K507 cian, K527 salmón oscuro, K532 verde pálido, K544 azul pálido (pizarra), K549 amarillo pálido, K556 magenta pálido, K665 cian pálido, K706 gris (C). Hay 8 lisinas sobre la superficie de VP3 del VAA8. Los colores de los residuos son los siguientes: K259 rojo, K333 verde, K510 cian, K530 salmón oscuro, K547 azul pálido (pizarra), K569 salmón oscuro, K668 cian pálido y K709 gris. Observar que K528 y K567 del VAA1 y K530 y K569 de VAA8 son contiguos en la estructura y muestran el mismo color.

35 Figura 2: se mutaron varios residuos de lisina de la cápside de VAA8 a arginina. Se extrajo sangre de los animales 8 semanas después de la inyección de virus por la vena de la cola. Se detectaron los niveles de hF.IX mediante ELISA (A) Los residuos que el software predecía que se encontraban ubiquitinados con niveles de confianza altos e intermedios se mutaron a arginina. Se inyectaron $2,5 \times 10^{10}$ partículas víricas en cada ratón por la vena de la cola (B, C). Los residuos que el software predecía con baja confianza que se encontraban ubiquitinados se mutaron a arginina. Se inyectaron $2,5 \times 10^9$ partículas víricas en cada ratón por la vena de la cola. (B) mutaciones de cápside K569R y K668R (C) se comparó el efecto de las mutaciones de cápside K38R, K143R, K259R, K510R y K547R con el efecto de la mutación K530R.

45 Figura 3: combinación de las mutaciones de cápside K a R (A) la combinación de las mutaciones K137R, K33R y K530R todavía es más abundante que el tipo salvaje, aunque no es estadísticamente diferente de K530R. (B) La mutación K709R afecta negativamente la transducción del VAA8. La adición de la mutación K709R al mutante K(137/333/530)R también reduce la transducción del virus. (C) La combinación de múltiples mutaciones de lisina a arginina no incrementa la tasa de transducción. (D) La combinación de tres residuos de lisina a arginina con cuatro o seis residuos tirosina a fenilalanina reduce la tasa de transducción.

50 Figura 4: transducción del VAA1 (A) eliminación por CTL de hepatocitos HHL5-B7 transducidos con mutantes de lisina de VAA-1 a tres MDI diferentes: 5K, 50K y 500K. Se utilizó el péptido (IPQYGYLTL para VAA1; VPQYGYLTL para VAA2) como control positivo. La liberación de LDH se correlaciona con la eliminación celular. (B) Se comparó el número total de células positivas para GFP y la expresión de GFP en diferentes constructos a MDI de 50K y 500K.

60 Figura 5: transducción del VAA2: A) Se compararon los mutantes del VAA2, K137R, K527R o K532R con el VAA2 WT en términos de tasa de transducción de la línea celular HHL5. Las células se transfectaron a MDI de 10K, 50K, 100K y 500K y se comprobaron 24 horas después para la expresión de GFP. B) Gráfico que muestra la citotoxicidad según medición de la LDL liberada por las variantes sometidas a ensayo.

65 Figura 6: ensayo de CTL en el que se transdujeron hepatocitos diana con el vector VAA-2 a concentraciones crecientes y después se incubaron con células efectoras de HLA correspondiente. Los vectores VAA codificaban cápside de VAA-2 de tipo salvaje o mutaciones de una lisina, tal como se indica. Se derivaron efectores de PBMC expandidas *in vitro* contra VAA-2 CMH de clase I epítipo VPQYGYLTL y proporción de

efector a diana de 10:1. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad de CTL (% de citotoxicidad respecto a células tratadas con SDS al 10% como control de citotoxicidad máxima tras restar el nivel de fondo) con respecto al vector de tipo salvaje.

5 Figura 7: datos de RH74: niveles de expresión del transgén humano F.IX en plasma medidos mediante un ELISA específico para F.IX humano.A) Definición de TMR=K(137/333/530)R, Definición de HMF=Y(253/275/447/703/707/733)F. B) Definición de HMR: K(137/259/333/530/552/569)R, Definición de 10 195/202: G195A+ L199V+ S201P+ G202N. Aunque HMR+195/202, HMR+195/202+K(38)R, HMR+195/202+K(51)R, HMR+195/202+K(61)R y HMR+195/202+K(77)R produjeron un nivel de hFIX más alto tras la inyección en ratones, la inyección de HMR+195/202+K(122/123)R o HMR+195/202+K(142/413) no produjo un nivel detectable de hFIX en absoluto. C): el mutante RHM13_1 produjo niveles de hFIX similares a Rh74 WT mientras que los niveles de hFIX derivado de ratones tratados con RHM17_1 apenas eran superiores a los niveles de fondo. D) El mutante RHM14_2 produjo niveles de hFIX similares a Rh74 WT; el rendimiento de RHM15_1 se encontraba entre el de VAA8 y el de VAAVrh74 WT.

15 Descripción detallada

Los presentes inventores han encontrado que la mutación de los residuos de lisina en las cápsides de VAA a 20 residuos de arginina incrementa la eficiencia de transducción del VAA. Los experimentos iniciales de los presentes inventores mostraban que una única sustitución de un residuo de lisina que se predice que es una diana de ubiquitinación resultaba en niveles más elevados de expresión del transgén del factor IX humano (FIX) en ratones en comparación con animales que habían recibido vectores VAA no modificados. Los mutantes de lisina de VAA 25 indicados en la presente memoria pudieron utilizarse ventajosamente para generar vectores con diana en hígado, SNC, músculo y otros órganos con una eficiencia más elevada que las cápsides de VAA de tipo salvaje. De esta manera, dicho resultado puede utilizarse para desarrollar terapéuticos para tratar la hemofilia A y B, la enfermedad de Huntington, y prácticamente cualquier otra enfermedad que requiera niveles de transducción incrementados de transgenes deseables en un tejido diana de interés.

Se proporcionan las definiciones siguientes a fin de facilitar la comprensión de la presente exposición.

30 I. Definiciones:

La "terapia génica" es la inserción de genes en las células y/o tejidos del individuo para tratar enfermedades, comúnmente enfermedades hereditarias en las que un alelo mutante defectuoso se sustituye o se completa con 35 uno funcional.

Los "virus adenoasociados" de la familia de los parvovirus son virus pequeños con un genoma de ADN de cadena sencilla. Dichos virus pueden insertar material genético en un sitio específico en el cromosoma 19 y resultan 40 preferentes debido a que no están asociados a enfermedad patológica en el ser humano.

Un péptido o proteína "terapéutico" es un péptido o proteína que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un péptido o proteína "terapéutico" es uno que de otro modo proporciona un beneficio a un sujeto, por ejemplo, efectos anticáncer. Entre 45 los péptidos y proteínas terapéuticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, CFTR (proteína reguladora transmembranal de la fibrosis quística), distrofina (incluyendo el producto proteína de los minigenes de la distrofina; véase, por ejemplo, Vincent *et al.*, Nature Genetics 5:130, 1993), la utrofina (Tinsley *et al.*, Nature 384:349, 1996), los factores de coagulación (Factor XIII, Factor IX, Factor X, etc.), anticuerpos monoclonales (Lewis *et al.*, 2002), eritropoyetina, el receptor de LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, β -glucocerebrosidasa, 50 esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada, hormonas, factores de crecimiento (por ejemplo, factores 1 y 2 de crecimiento similares a la insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico de origen cerebral, factor de crecimiento derivado de la glía, factores de crecimiento transformante α y β , y similares), citoquinas (por ejemplo, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleuquina-2, 55 interleuquina-4, interleuquina-12, factor estimulantes de colonias de granulocitos-macrófagos y linfotóxica), productos de gen suicida (por ejemplo, timidina quinasa del virus herpes simplex, citosina desaminasa, toxina diftérica, citocromo P450, desoxicitidina quinasa y factor de necrosis tumoral), proteínas que confieren resistencia a un fármaco utilizado en la terapia del cáncer, productos de gen supresor tumoral (por ejemplo, Rb, p53, Rb, Wt-1, NF1, VHL, APC, y similares), y cualquier otro péptido o proteína que presenta un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesita.

Entre los péptidos o proteínas terapéuticos ejemplares adicionales se incluyen los que pueden utilizarse en el 65 tratamiento de una condición patológica, incluyendo, aunque sin limitación, la fibrosis quística (y otras enfermedades pulmonares), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos hematológicos, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (por ejemplo, de

Duchenne y de Becker), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina desaminasa, enfermedades del almacenamiento del glucógeno y otros defectos metabólicos, enfermedades degenerativas de la retina (y otras enfermedades oculares) y enfermedades de órganos sólidos (por ejemplo, cerebro, hígado, riñón y corazón).

5

El término "promotores" o "promotor" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una secuencia de ADN que se localiza contiguamente a una secuencia de ADN que codifica un producto recombinante. Un promotor preferentemente está ligado operablemente a una secuencia de ADN contigua. Un promotor típicamente incrementa la cantidad de producto recombinante expresado a partir de una secuencia de ADN en comparación con el producto recombinante expresado en el caso de que no haya promotor. Puede utilizarse un promotor de un organismo para potenciar la expresión de un producto recombinante a partir de una secuencia de ADN originada en otro organismo. Por ejemplo, puede utilizarse un promotor de vertebrado para la expresión de GFP de medusa en vertebrados. Además, un elemento promotor puede incrementar la cantidad de productos recombinantes expresados para múltiples secuencias de ADN unidas en tándem. Por lo tanto, un elemento promotor puede potenciar la expresión de uno o más productos recombinantes. El experto ordinario en la materia conoce perfectamente múltiples elementos promotores.

10

15

Puede desearse una expresión constitutiva a nivel elevado. Entre los ejemplos de dichos promotores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el promotor/potenciador LTR del virus retroviral del sarcoma de Rous (VSR), el promotor/intensificador temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) (ver, por ejemplo, Boshart et al, Cell, 41:521-530, 1985), el promotor del SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de la β -actina citoplasmática y el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK).

20

Además, pueden desearse promotores inducibles. Los promotores inducibles son los que están regulados por compuestos suministrados exógenamente, en cis o en trans, incluyendo, aunque sin limitación, el promotor de metalotioneína (MT) de oveja inducible por cinc, el promotor del virus del tumor mamario del ratón (VTMR) inducible por dexametasona (Dex), el sistema del promotor de la polimerasa de T7 (documento nº WO 98/10088), el sistema reprimible por tetraciclina (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992); el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al., Science, 268:1766-1769, 1995; véase también Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518, 1998); el sistema inducible por RU486 (Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243, 1997 y Wang et al., Gene Ther., 4:432-441, (1997)), y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872, (1997); Rivera et al., Nat. Medicine. 2:1028-1032, 1996)). Otros tipos de promotores inducibles que pueden resultar útiles en el presente contexto son los que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, la temperatura, la fase aguda o en sólo células replicantes.

25

30

35

Puede utilizarse el promotor nativo del transgén o secuencia de ácidos nucleicos de interés. El promotor nativo puede resultar preferente en el caso de que se desee que la expresión del transgén o la secuencia de ácidos nucleicos deberá imitar la expresión nativa. El promotor nativo puede utilizarse en el caso de que la expresión del transgén u otra secuencia de ácidos nucleicos deba regularse temporalmente o en el desarrollo, o de una manera específica de un tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. Además, pueden utilizarse otros elementos nativos de control de la expresión, tales como elementos intensificadores, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso de Kozak, para imitar la expresión nativa.

40

El genoma vírico recombinante puede comprender un transgén operablemente ligado a un promotor específico de un tejido. Por ejemplo, en el caso de que se desee la expresión en músculo esquelético, puede utilizarse un promotor activo en el músculo. Entre ellos se incluyen los promotores de genes codificantes de la α -actina esquelética, la cadena ligera 2A de la miosina, la distrofina, la creatín quinasa muscular, así como los promotores musculares sintéticos con actividades superiores a los promotores naturales. Véase Li et al., Nat. Biotech., 17:241-245, 1999. Se conocen ejemplos de promotores que son específicos de tejido para la albúmina hepática (Miyatake et al., J. Virol., 71:5124-32, 1997); el promotor del núcleo del virus de la hepatitis B (Sandig et al., Gene Ther. 3:1002-9, 1996; la alfa-fetoproteína (AFP) (Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14, 1996), hueso (osteocalcina, Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96, 1997; sialoproteína ósea, Chen et al., J. Bone Miner. Res. 11 :654-64, (1996)), linfocitos (CD2, Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8, (1998)); cadena pesada de inmunoglobulina; cadena α del receptor de las células T), neuronal (promotor de la enolasa neuronal específica (ENE), Andersen et al. Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15, (1993)); gen de la cadena ligera del neurofilamento, Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5, 1991; el gen *vgf* específico neuronal, Piccioli et al., Neuron, 15:373-84, (1995)), entre otros.

45

50

55

El término "intensificadores" o "intensificador" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una secuencia de ADN que se localiza contiguamente a la secuencia de ADN que codifica un producto recombinante. Los elementos intensificadores típicamente se localizan cadena arriba de un elemento promotor o pueden localizarse cadena abajo o dentro de una secuencia codificante de ADN (por ejemplo, una secuencia de ADN transcrita o traducida en un producto o productos recombinantes). Por lo tanto, un elemento intensificador puede localizarse 100 pares de bases, 200 pares de bases o 300 o más pares de bases cadena arriba o cadena abajo de una secuencia de ADN que codifica para un producto recombinante. Los elementos intensificadores pueden incrementar la cantidad de producto recombinante expresada a partir de una secuencia de ADN hasta un nivel

60

65

superior al nivel de expresión proporcionado por un elemento promotor. Se encuentran disponibles múltiples elementos intensificadores para el experto ordinario en la materia.

5 La expresión "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier molécula de ADN o ARN, de cadena sencilla o de doble cadena y, si es de cadena sencilla, la molécula de su secuencia complementaria en forma lineal o circular. Al comentar las moléculas de ácidos nucleicos, puede describirse en la presente memoria una secuencia o estructura de una molécula particular de ácidos nucleicos según la convención normal de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'. En referencia a los ácidos nucleicos de la exposición, en ocasiones se utiliza la expresión "ácido nucleico aislado". Dicha expresión, aplicada al ADN, se refiere a una molécula de ADN que ha sido separada de las secuencias que son inmediatamente contiguas en el genoma natural del organismo en el que se ha originado. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un plásmido o vector vírico, o integrada en el ADN genómico de una célula u organismo huésped procariótico o eucariótico.

15 Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, cósmido, bécido, fago o virus, al que puede unirse otra secuencia o elemento genético (de ADN o ARN) de manera que se produce la replicación de la secuencia o elemento unido.

20 Un "operón de expresión" se refiere a un segmento de ácidos nucleicos que puede poseer secuencias de control transcripcional o traduccional, tales como promotores, intensificadores, señales de inicio de traducción (por ejemplo, codones ATG o AUG), señales de poliadenilación, terminadores, y similares, y que facilita la expresión de una secuencia codificante de un polipéptido en una célula u organismo huésped.

25 Los términos "transforma", "transfecta", "transduce", se refieren a cualquier procedimiento o medio con el que se introduce un ácido nucleico en una célula u organismo huésped y pueden utilizarse intercambiamente para transmitir el mismo significado. Entre dichos procedimientos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, transfección, electroporación, microinyección, infección, fusión con PEG y similares.

30 El ácido nucleico introducido puede encontrarse integrado (unido covalentemente) o no en el ácido nucleico de la célula u organismo huésped. En células bacterianas, de levadura, vegetales y de mamífero, por ejemplo, el ácido nucleico introducido puede mantenerse en forma de un elemento episómico o como un replicón independiente, tal como un plásmido. Alternativamente, el ácido nucleico introducido puede integrarse en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor y mantenerse establemente en esa célula u organismo y pasarse posteriormente o heredarse en la células u organismos de la progenie de la célula u organismo receptor. Finalmente, el ácido nucleico introducido puede existir en la célula receptora u organismo huésped solo transitoriamente.

35 La expresión "gen marcador seleccionable" se refiere a un gen que, al expresarse, confiere un fenotipo seleccionable, tal como resistencia a un antibiótico, a una célula o planta transformada.

40 La expresión "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de la secuencia codificante están situadas en la molécula de ADN en las posiciones apropiadas respecto a la secuencia codificante de manera que se produzca la expresión de la secuencia codificante. Dicha misma definición en ocasiones se aplica a la organización de unidades transcripcionales y otros elementos de control transcripcional (por ejemplo, intensificadores) en un vector de expresión.

45 El término "oligonucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a secuencias, cebadores y sondas de la presente exposición, y se define como una molécula de ácidos nucleicos que comprende dos o más ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, preferentemente más de tres. El tamaño exacto del oligonucleótido dependerá de diversos factores y de la aplicación y uso particulares del oligonucleótido.

50 La expresión "se hibrida específicamente" se refiere a la asociación entre dos moléculas de ácidos nucleicos de cadena sencilla de secuencia suficientemente complementaria para permitir dicha hibridación bajo las condiciones predeterminadas generalmente utilizadas en la técnica (en ocasiones denominadas "sustancialmente complementarias"). En particular, la expresión se refiere a la hibridación de un oligonucleótido con una secuencia sustancialmente complementaria contenida dentro de una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla de la exposición, con exclusión sustancial de la hibridación del oligonucleótido con ácidos nucleicos de cadena sencilla de secuencia no complementaria.

60 El término "cebador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido de ADN, de cadena sencilla o de doble cadena, derivado de un sistema biológico, generado mediante digestión con enzimas de restricción o producido sintéticamente que, al introducirlo en el medio apropiado, es capaz de actuar funcionalmente como un iniciador de la síntesis de ácidos nucleicos dependiente del molde. Al presentarle un molde de ácidos nucleicos apropiado, precursores trifosfato de nucleósido adecuados de los ácidos nucleicos, enzima polimerasa, cofactores y condiciones adecuados, tales como una temperatura y pH adecuados, el cebador puede extenderse en su extremo 3' mediante la adición de nucleótidos por la acción de una polimerasa o actividad similar, rindiendo un producto de extensión del cebador. El cebador puede ser de longitud variable según las

condiciones y requisitos particulares de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones diagnósticas, el cebador oligonucleótido típicamente presenta una longitud de 15 a 25 o más nucleótidos. El cebador debe ser de suficiente complementariedad respecto al molde deseado para cebar la síntesis del producto de extensión deseado, es decir, para poder hibridarse con la cadena molde deseada de una manera suficiente para proporcionar la fracción 3'-hidroxilo del cebador en yuxtaposición apropiada para la utilización en el inicio de la síntesis por una polimerasa o enzima similar. No se requiere que la secuencia del cebador represente un complemento exacto del molde deseado. Por ejemplo, puede unirse una secuencia de nucleótidos no complementaria al extremo 5' de un cebador de otro modo complementario. Alternativamente, pueden intercalarse bases no complementarias dentro de la secuencia del cebador oligonucleótido, con la condición de que la secuencia del cebador presente suficiente complementariedad respecto a la secuencia de la cadena molde deseada para proporcionar funcionalmente un complejo de molde-cebador para la síntesis del producto de extensión.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido descrita en las patentes US nº 4.683.195, nº 4.800.195 y nº 4.965.188.

El término "aislado" puede referirse a un compuesto o complejo que se ha separado suficientemente de otros compuestos con los que se encontraría asociado naturalmente. El término "aislado" no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieran con la actividad fundamental o ensayos subsiguientes, y que pueden encontrarse presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta, o la adición de estabilizantes.

La expresión "respuesta inmunitaria" pretende referirse a cualquier respuesta a un antígeno o determinante antigénico por el sistema inmunitario de un sujeto vertebrado. Entre los ejemplos de respuestas inmunitarias se incluyen las respuestas inmunitarias humorales (por ejemplo, la producción de anticuerpos específicos de antígeno) y las respuestas inmunitarias mediadas por células (por ejemplo, la proliferación de linfocitos), tal como se definen posteriormente en la presente memoria.

II. Procedimientos de utilización y procedimientos de administración de los vectores víricos adenoasociados variantes

Los procedimientos de la presente exposición proporcionan un medio para administrar secuencias de ácidos nucleicos heterólogas en un amplio abanico de células huésped, incluyendo células tanto en división como células que no se dividen. Los vectores y otros reactivos, procedimientos y formulaciones farmacéuticas de la presente exposición resultan adicionalmente útiles en un procedimiento de administración de una proteína o péptido en un sujeto que lo necesita, como procedimiento de tratamiento o de otro tipo. De esta manera, la proteína o péptido puede producirse *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede requerir la proteína o péptido debido a que el sujeto presenta una deficiencia en la proteína o péptido, o debido a que la producción de la proteína o péptido en el sujeto puede proporcionar algún efecto terapéutico, como procedimiento de tratamiento o de otro tipo, y tal como se explica adicionalmente después.

En general, la presente exposición puede utilizarse para administrar cualquier ácido nucleico foráneo con un efecto biológico para tratar o mejorar los síntomas asociados a cualquier trastorno relacionado con la expresión génica. Entre los estados de enfermedad ilustrativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos: fibrosis quística (y otras enfermedades pulmonares), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos de la coagulación sanguínea, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (por ejemplo, de Duchenne y de Becker), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina desaminasa, enfermedades del almacenamiento del glucógeno y otros defectos metabólicos, enfermedad degenerativas de la retina (y otras enfermedades oculares) y enfermedades de órganos sólidos (por ejemplo, cerebro, hígado, riñón y corazón), y similares.

Además, la presente exposición puede utilizarse para administrar ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos que es conocido que proporcionan efectos biológicos beneficiosos para tratar o mejorar los síntomas asociados a cánceres, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide. Otras secuencias pueden codificar, por ejemplo, citoquinas, tales como el interferón-alfa, que pueden modular el curso de una enfermedad.

La transferencia génica presenta un uso potencial sustancial en la compresión y suministro de terapia para estados de enfermedad. Existen varias enfermedades hereditarias en las que se conocen los genes defectuosos y han sido clonados. En algunos casos, se conoce la función de dichos genes clonados. En general, los estados de enfermedad anteriormente indicados se clasifican en dos clases: estados de deficiencia, habitualmente de enzimas, que generalmente se heredan de modo recesivo, y los estados de desequilibrio, los cuales por lo menos ocasionalmente implican proteínas reguladoras o estructurales, que se hereden de modo dominante. Para las enfermedades de estado de deficiencia, podría utilizarse la transferencia génica para llevar un gen normal a los tejidos afectados para la terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales de la enfermedad utilizando mutaciones antisentido. Para los estados de enfermedad de desequilibrio, podría utilizarse la transferencia génica

para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que a continuación podría utilizarse en esfuerzos para contrarrestar el estado de enfermedad. De esta manera, los procedimientos de la presente exposición permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. Tal como se utiliza en la presente memoria, un estado de enfermedad se trata remediando parcial o completamente la eficiencia o desequilibrio que causa la enfermedad o la hace más grave. La utilización de la integración específica de sitio de secuencias de ácidos nucleicos para causar mutaciones o para corregir defectos también resulta posible.

Finalmente, la presente exposición encuentra uso adicional en procedimientos diagnósticos y de cribado, en los que un gen de interés se expresa transitoria o establemente en un sistema de cultivo celular, o alternativamente, un modelo de animal transgénico.

III. Sujetos, formulaciones farmacéuticas, vacunas y modos de administración.

La presente exposición encuentra utilidad en aplicaciones tanto veterinarias como médicas. Entre los sujetos adecuados se incluyen tanto aves como mamíferos, resultan preferentes los mamíferos. El término "ave" tal como se utiliza en la presente memoria incluye, aunque sin limitación, pollos, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes. El término "mamífero" tal como se utiliza en la presente memoria incluye, aunque sin limitarse a ellos, seres humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos son los más preferidos. Entre los sujetos humanos se incluyen sujetos fetales, neonatales, infantiles, juveniles y adultos.

En particular, en la presente memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula vírica de la exposición en un portador farmacéuticamente aceptable u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, adyuvantes, diluyentes, etc. Para la inyección, el portador típicamente será un líquido. Para otros procedimientos de administración, el portador puede ser sólido o líquido, tal como agua estéril libre de pirógenos o solución salina tamponada con fosfato estéril libre de pirógenos. Para la administración mediante inhalación, el portador es respirable y preferentemente se encuentra en forma particulada sólida o líquida. Como medio de inyección, resulta preferente utilizar agua que contiene los aditivos habituales para soluciones para inyección, tales como agentes estabilizadores, sales o solución salina, y/o tampones.

En la presente memoria se proporciona además una composición farmacéutica que comprende una célula en la que se ha integrado un provirus de VAA en el genoma en un portador farmacéuticamente aceptable u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, adyuvantes, diluyentes, etc.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, por ejemplo, el material puede administrarse en el sujeto sin causar ningún efecto biológico no deseable. De esta manera, dicha composición farmacéutica puede utilizarse, por ejemplo, en la transfección de una célula ex vivo o en la administración de una partícula vírica o célula directamente en un sujeto.

En la presente memoria se proporciona además un procedimiento de administración de un ácido nucleico en una célula. Para los procedimientos *in vitro*, el virus puede administrarse en la célula mediante procedimientos estándares de transducción vírica, tal como se conocen de la técnica. Preferentemente, las partículas víricas se añaden a las células en la multiplicidad de infección apropiada según procedimientos estándares de transducción apropiados para las células diana particulares. Los títulos de virus para la administración pueden variar, dependiendo del tipo de célula diana y el vector vírico particular, y pueden ser determinados por el experto en la materia sin necesidad de experimentación indebida. Alternativamente, puede llevarse a cabo la administración de un vector parvovirus de la presente exposición mediante cualesquiera otros medios conocidos de la técnica.

Los vectores de virus recombinante se administran preferentemente en la célula en una cantidad biológicamente eficaz. Una cantidad "biológicamente eficaz" del vector vírico es una cantidad que resulta suficiente para resultar en infección (o transducción) y en la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en la célula. En el caso de que se administre el virus en una célula *in vivo* (por ejemplo, el virus se administra en un sujeto tal como se indica posteriormente), una cantidad "biológicamente eficaz" del vector vírico es una cantidad que resulta suficiente para resultar en la transducción y expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula diana.

La célula en la que debe administrarse el vector vírico inventivo puede ser de cualquier tipo, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, células neurales (incluyendo células de los sistemas nerviosos periférico y central, en particular, células cerebrales), células pulmonares, células retinianas, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales intestinales y respiratorias), células musculares, células pancreáticas (incluyendo células de los islotes), células hepáticas, células miocárdicas, células óseas (por ejemplo, células madre de médula ósea), células madre hematopoyéticas, células de bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células prostáticas, células germinales y similares. Alternativamente, la célula puede ser cualquier célula progenitora. Como alternativa adicional, la célula puede ser una célula madre (por ejemplo, una célula madre neural o célula madre hepática). Además, las células pueden ser de cualquier especie de origen, tal como se ha indicado anteriormente.

En particular, pueden extraerse células de un sujeto, introducirse el vector parvovirus en las mismas, y después reintroducirse las células en el sujeto. Los procedimientos de extracción de células del sujeto para el tratamiento ex vivo, seguido de la reintroducción en el sujeto son conocidos de la técnica. Alternativamente, el vector VAAr se introduce en las células de otro sujeto, en células en cultivo o en células de cualquier otra fuente adecuada, y las células se administran en el sujeto que las necesita.

Entre las células adecuadas para la terapia génica ex vivo se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, células hepáticas, células neurales (incluyendo células de los sistemas nerviosos central y periférico, en particular, células cerebrales), células del páncreas, células del bazo, fibroblastos (por ejemplo, fibroblastos de la piel), queratinocitos, células endoteliales, células epiteliales, mioblastos, células hematopoyéticas, células estromales de la médula ósea, células progenitoras y células madre.

Las dosis de las células para administrar en el sujeto variarán con la edad, condición y especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico que expresa la célula, el modo de administración y similares. Típicamente, se administran en cada dosis por lo menos entre aproximadamente 10^2 y aproximadamente 10^8 , preferentemente entre aproximadamente 10^3 y aproximadamente 10^6 células. Preferentemente, las células se administran en una "cantidad terapéuticamente eficaz".

Una cantidad "terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en la presente memoria es una cantidad que resulta suficiente para aliviar (por ejemplo, mitigar, disminuir o reducir) por lo menos uno de los síntomas asociados a un estado de enfermedad. Alternativamente indicado, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que resulta suficiente para proporcionar alguna mejora en la condición del sujeto.

En la presente memoria se describe además un procedimiento de tratamiento de sujetos *in vivo* con las partículas víricas inventivas. La administración de las partículas de parvovirus de la presente exposición en un sujeto humano o un animal que lo necesita puede ser mediante cualesquiera medios conocidos de la técnica de administración de vectores víricos.

Entre los modos ejemplares de administración se incluyen la administración oral, rectal, transmucosal, tópica, transdérmica, por inhalación, parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular e intraarticular) y similares, así como la inyección directa en un tejido u órgano; alternativamente, inyección intratecal, intramuscular directa, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o suspensiones en líquido antes de la inyección, o en forma de emulsiones. Alternativamente, puede administrarse el virus de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo en una formulación depot o de liberación sostenida.

La secuencia de nucleótidos de interés puede administrarse en el hígado del sujeto. La administración en el hígado puede conseguirse mediante cualquier procedimiento conocido de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, la administración intravenosa, la administración intraportal, la administración intrabiliar, la administración intraarterial y la inyección directa en el parénquima hepático.

Preferentemente, las células (por ejemplo, las células hepáticas) son infectadas por un vector parvovirus recombinante codificante de un péptido o proteína; las células expresan el péptido o proteína codificado y lo secretan al sistema circulatorio en una cantidad terapéuticamente eficaz (tal como se ha definido anteriormente). Alternativamente, el vector se administra y expresa en otra célula o tejido, incluyendo, aunque sin limitación, cerebro, páncreas, bazo o músculo.

Las partículas de parvovirus divulgadas pueden administrarse por vía intramuscular, más preferentemente mediante inyección intramuscular o mediante administración local (tal como se ha definido anteriormente). Además, las partículas de parvovirus de la presente exposición pueden administrarse en los pulmones.

El vector parvovirus divulgado en la presente memoria puede administrarse en los pulmones de un sujeto mediante cualesquiera medios adecuados, aunque preferentemente se administra una suspensión de aerosol de partículas respirables que comprenden los vectores parvovirus de la invención, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores parvovirus inventivos pueden producirse mediante cualesquiera medios adecuados, tal como con un nebulizador de aerosol impulsado por presión o un nebulizador ultrasónico, tal como es conocido por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, la patente US nº 4.501.729. De manera similar, los aerosoles de partículas sólidas que comprenden los vectores víricos inventivos pueden producirse con cualquier generador de aerosol de medicamento particulado sólido, mediante técnicas conocidas de la técnica farmacéutica.

Las dosis de las partículas de parvovirus inventivas dependerán del modo de administración, de la enfermedad o condición bajo tratamiento, de la condición del sujeto individual, del vector vírico particular y el gen que debe administrarse y puede determinarse de una manera rutinaria. Son dosis ejemplares para conseguir efectos terapéuticos, los títulos de virus de por lo menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} ,

10¹⁴, 10¹⁵ o 10¹⁶ unidades transductoras o más, preferentemente entre aproximadamente 10⁸ y 10¹³ unidades transductoras; todavía más preferentemente 10¹² unidades transductoras.

En resumen, los vectores parvovirus, reactivos y procedimientos de la presente exposición pueden utilizarse para dirigir un ácido nucleico a células en división o no en división, y para expresar establemente el ácido nucleico heterólogo en las mismas. Utilizando dicho sistema de vector, ahora resulta posible introducir en las células, *in vitro* o *in vivo*, genes que codifican proteínas que afectan a la fisiología celular. Los vectores de la presente exposición pueden, de esta manera, resultar útiles en terapia génica para estados de enfermedad o para la modificación experimental de la fisiología celular.

El ejemplo siguiente se proporciona para ilustrar determinadas formas de realización de la invención. No se pretende limitar la invención en modo alguno.

Ejemplo I

Las mutaciones de lisina a arginina afectan a la tasa de transducción del VAA y la administración de CMH.

Identificación de residuos de lisina como diana en vectores VAA1 y VAA8

Los presentes inventores utilizando el software UbPred para predecir los posibles sitios de ubiquitinación en las proteínas de cápside de VAA1, VAA2, VAA8 y Rh74 (Radivojac P. *et al.*, 2010). El software UbPred se encuentra disponible en línea en <http://www.ubpred.org/index.html>. El resultado del análisis es la predicción de los residuos de lisina importantes para la ubiquitinación dentro de la secuencia de cápside del serotipo de VAA indicado. Véase la figura 1 y la tabla 1. Es el siguiente:

Secuencia de proteína de cápside VP1 del VAA1:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGL
DKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVF
QAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSSES
VPDPQPLGEPATPAAVGPPTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVIT
TSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHFYGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINN
NWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTSTVQVFSDFSEYQLPYVLGSAHQGCLPP
FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVFPFHSSYAHS
QSLDRMLNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSFAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRV
SKTKTDNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDKFFPMSGVMIFGKESAGAS
NTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRD
VYLQGPWIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKNPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFAFITQYST
GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRP

Lisina

Posición	Puntuación	Ubiquitinada	
26	0.59	No	
31	0.55	No	
33	0.47	No	
38	0.61	No	
51	0.54	No	
61	0.72	Sí	Confianza intermedia
77	0.63	Sí	Confianza baja
84	0.72	Sí	Confianza intermedia
122	0.17	No	
123	0.26	No	
137	0.90	Sí	Confianza elevada
142	0.62	Sí	Confianza baja
143	0.81	Sí	Confianza intermedia
161	0.70	Sí	Confianza intermedia
168	0.25	No	
169	0.26	No	
258	0.49	No	
310	0.14	No	
315	0.15	No	

ES 2 862 912 T3

Posición	Puntuación	Ubiquitinada	
322	0.48	No	
459	0.81	Sí	Confianza intermedia
476	0.43	No	
491	0.20	No	
493	0.28	No	
508	0.62	Sí	Confianza baja
528	0.67	Sí	Confianza baja
533	0.70	Sí	Confianza intermedia
545	0.65	Sí	Confianza baja
567	0.66	Sí	Confianza baja
621	0.50	No	
641	0.50	No	
650	0.45	No	
666	0.58	No	
689	0.65	Sí	Confianza baja
693	0.65	Sí	Confianza baja
707	0.78	Sí	Confianza intermedia

Leyenda:

Etiqueta	Intervalo de puntuación	Sensibilidad	Especificidad
Confianza baja	0.62 < s < 0.69	0.464	0.903
Confianza intermedia	0.69 < s < 0.84	0.346	0.950
Confianza elevada	0.84 < s < 1.00	0.197	0.989

5 Mutantes deseables en VAA-1

ID	mutante de VAA-1
MUT1-1	K61R
MUT1-2	K84R
MUT1-3	K137R
MUT1-4	K143R
MUT1-5	K161R
MUT1-6	K459R
MUT1-7	K528R
MUT1-8	K533R
MUT1-9	K707R

Secuencia de proteína de cápside VP1 del VAA8:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGL
 DKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVF
 QAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTDSE
 SVPDPQPLGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVI
 TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLLI
 NNNWGRFRPKRLSFKLNFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLP
 PFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHSSYAH
 SQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNWLPGPCYRQQR
 VSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPNSGILIFGKQNAAR
 DNADYSVMLTSEEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNSQALPGMVWQNRD
 VYLQGPWIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSCLNSFITQYST
 GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

10

Lisina

Posición	Puntuación	Ubiquitinación	
26	0.52	No	
31	0.51	No	
33	0.16	No	
38	0.62	Sí	Confianza baja

Posición	Puntuación	Ubiquitinación	
51	0.56	No	
61	0.68	Sí	Confianza baja
77	0.65	Sí	Confianza baja
122	0.17	No	
123	0.32	No	
137	0.92	Sí	Confianza elevada
142	0.53	No	
143	0.65	Sí	Confianza baja
162	0.28	No	
163	0.29	No	
170	0.24	No	
259	0.49	No	
312	0.09	No	
317	0.12	No	
324	0.43	No	
333	0.75	Sí	Confianza intermedia
478	0.59	No	
510	0.50	No	
530	0.71	Sí	Confianza intermedia
547	0.40	No	
569	0.66	Sí	Confianza baja
623	0.47	No	
643	0.44	No	
652	0.51	No	
668	0.64	Sí	Confianza baja
691	0.66	Sí	Confianza baja
695	0.67	Sí	Confianza baja
709	0.68	Sí	Confianza baja

Leyenda:

Etiqueta	Intervalo de puntuación	Sensibilidad	Especificidad
Confianza baja	0.62 < s < 0.69	0.464	0.903
Confianza intermedia	0.69 < s < 0.84	0.346	0.950
Confianza elevada	0.84 < s < 1.00	0.197	0.989

5 La tabla 3 adjunta en la presente memoria proporciona el rendimiento de vector obtenido mediante la utilización de los diferentes mutantes de cápside, incluyendo VAA8 de la exposición. La tabla indica además si la mutación resultó en eficiencias de transducción incrementadas, reducidas o comprables en comparación con vectores de tipo salvaje del mismo serotipo.

10 Secuencia de proteína de cápside VP1 del VAA2:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDK
 GEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAQERLQKEDTSFGGNLGRAVFQA
 KKRVLPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSV
 DPQPLGQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVTTS
 TRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHFYGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPRDWQRLINNNW
 GFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFA
 DVFMVPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQ
 LDRLMNPLIDQYLYLRTNTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKT
 SADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNV
 DIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYL
 QGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQ
 VSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRLN

Lisina

15

Posición	Puntuación	Ubiquitinación	
24	0.20	No	
26	0.49	No	

Posición	Puntuación	Ubiquitinación	
33	0.38	No	
39	0.89	Sí	Confianza elevada
51	0.53	No	
61	0.67	Sí	Confianza baja
77	0.68	Sí	Confianza baja
92	0.56	No	
105	0.58	No	
122	0.14	No	
123	0.18	No	
137	0.87	Sí	Confianza elevada
142	0.58	No	
143	0.77	Sí	Confianza intermedia
161	0.70	Sí	Confianza intermedia
169	0.31	No	
258	0.51	No	
309	0.14	No	
314	0.17	No	
321	0.46	No	
490	0.73	Sí	Confianza intermedia
507	0.61	No	
527	0.78	Sí	Confianza intermedia
532	0.75	Sí	Confianza intermedia
544	0.61	No	
549	0.68	Sí	Confianza baja
556	0.62	Sí	Confianza baja
620	0.47	No	
640	0.45	No	
649	0.42	No	
665	0.54	No	
688	0.68	Sí	Confianza baja
692	0.68	Sí	Confianza baja
706	0.66	Sí	Confianza baja

Leyenda:

Etiqueta	Intervalo de puntuación	Sensibilidad	Especificidad
Confianza baja	$0.62 \leq s \leq 0.69$	0.464	0.903
Confianza intermedia	$0.69 \leq s \leq 0.84$	0.346	0.950
Confianza elevada	$0.84 \leq s \leq 1.00$	0.197	0.989

5 Secuencia de proteína de cápside VP1 de VAA2-Rh74:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGL
 DKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVF
 QAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSQRSPTSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSSES
 VPDQPPIGEPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITT
 STRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRDRWQRLINN
 NWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPF
 PADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHS
 QSLDRMLNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRV
 STTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNDRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMMFGKQGAG
 KDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQN
 RDVYLQGPWIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQ
 YSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Lisina

10

Posición	Puntuación	Ubiquitinación	
26	0.60	No	
31	0.53	No	

ES 2 862 912 T3

Posición	Puntuación	Ubiquitinación	
33	0.27	No	
38	0.23	No	
51	0.38	No	
61	0.68	Sí	Confianza baja
77	0.65	Sí	Confianza baja
122	0.17	No	
123	0.30	No	
137	0.90	Sí	Confianza elevada
142	0.35	No	
143	0.35	No	
162	0.36	No	
163	0.33	No	
169	0.27	No	
170	0.25	No	
259	0.46	No	
312	0.13	No	
317	0.16	No	
324	0.46	No	
333	0.77	Sí	Confianza intermedia
478	0.51	No	
510	0.49	No	
530	0.67	Sí	Confianza baja
547	0.52	No	
552	0.69	Sí	Confianza intermedia
569	0.67	Sí	Confianza baja
623	0.49	No	
643	0.44	No	
652	0.54	No	
668	0.56	No	
691	0.68	Sí	Confianza baja
695	0.67	Sí	Confianza baja
709	0.69	Sí	Confianza intermedia

Leyenda:

Etiqueta	Intervalo de puntuación	Sensibilidad	Especificidad
Confianza baja	$0.62 < s < 0.69$	0.464	0.903
Confianza intermedia	$0.69 < s < 0.84$	0.346	0.950
Confianza elevada	$0.84 < s < 1.00$	0.197	0.989

5 Mutantes deseables en VAA-rh74 (véase también la tabla 3)

ID	Mutante de VAA-rh74
Mut74-1	K26R
Mut74-2	K31R
Mut74-3	K33R
Mut74-4	K38R
Mut74-5	K51R
Mut74-6	K77R
Mut74-7	K137R
Mut74-8	K163R
Mut74-9	K169R
Mut74-10	K259R
Mut74-11	K333R
Mut74-12	K530R
Mut74-13	K547R
Mut74-14	K552R
Mut74-15	K569R
Mut74-16	K668R
Mut74-17	K691R
Mut74-18	K695R
Mut74-19	K709R

Se utilizaron los conjuntos de cebadores siguientes para crear las variantes de cápside que contiene lisina de la exposición:

5 Cebadores utilizados para la mutagénesis:

- Cebadores de VAA1:

- 10 VAA1 K61R
sentido: 5'- CTT CAA CGG ACT CGA CAG GGG GGA GCC -3'
antisentido: 5'- GGC TCC CCC CTG TCG AGT CCG TTG AAG -3'
- 15 VAA1 K84R
sentido: 5'- GCC TAC GAC CAG CAG CTC AGA GCG GGT GAC -3'
antisentido: 5'- GTC ACC CGC TCT GAG CTG CTG GTC GTA GGC -3'
- 20 VAA1 K137R
sentido: 5'- TGG TTG AGG AAG GCG CTA GGA CGG CTC CT -3'
antisentido: 5'- AGG AGC CGT CCT AGC GCC TTC CTC AAC CA -3'
- VAA1 K143R
sentido: 5'- CTA AGA CGG CTC CTG GAA AGA GAC GTC CGG TAG -3'
antisentido: 5'- CTA CCG GAC GTC TCT TTC CAG GAG CCG TCT TAG -3'
- 25 VAA1 K161R
sentido: 5'- CGG GCA TCG GCA GGA CAG GCC AGC A -3'
antisentido: 5'- TGC TGG CCT GTC CTG CCG ATG CCC G -3'
- 30 VAA1 K459R
sentido: 5'- AGT CCG GAA GTG CCC AAA ACA GGG ACT TGC TGT -3'
antisentido: 5'- ACA GCA AGT CCC TGT TTT GGG CAC TTC CGG ACT -3'
- 35 VAA1 K528R
sentido: 5'- GCA CTG CTA TGG CCT CAC ACA GAG ACG ACG AAG -3'
antisentido: 5'- CTT CGT CGT CTC TGT GTG AGG CCA TAG CAG TGC -3'
- 40 VAA1 K533R
sentido: 5'- CAA AGA CGA CGA AGA CAG GTT CTT TCC CAT GAG CG -3'
antisentido: 5'-CGC TCA TGG GAA AGA ACC TGT CTT CGT CGT CTT TG -3'
- VAA1 K707R
sentido: 5'- TGCAGTACACATCCAATTATGCAAGATCTGCCAACG TTG -3'
antisentido: 5'- CAACGTTGGCAGATCTTGCATAATTGGATGTGTA CTGCA -3'

- Cebadores de VAA8:

- 50 VAA8 K137R
sentido: 5'- GGT TGA GGA AGG CGC TAG GAC GGC TCC TGG -3'
antisentido: 5'- CCA GGA GCC GTC CTA GCG CCT TCC TCA ACC -3'
- VAA8 K333R
sentido: 5'- GCA GAA TGA AGG CAC CAG GAC CAT CGC CAA TAA CC -3'
antisentido: 5'- GGT TAT TGG CGA TGG TCC TGG TGC CTT CAT TCT GC -3'
- 55 VAA8 K530R
sentido: 5'- GCA TCG CTA TGG CAA CAC ACA GAG ACG ACG AGG -3'
antisentido: 5'- CCT CGT CGT CTC TGT GTG TTG CCA TAG CGA TGC -3'
- 60 VAA8 K709R
sentido: 5'- GTACACCTCCA ACTACTACAGATCTACAAGTGTGGACTTTG -3'
antisentido: 5'- CAAAGTCCACACTTGTAGATCTGTAGTAGTTGGAGGTGTAC -3'

- Cebadores de VAA2:

- 65 VAA2 K39R

ES 2 862 912 T3

sentido: 5'-GCCCGCAGAGCGGCATAGGGACGACAG-3'
antisentido: 5'-CTGTCGTCCCTATGCCGCTCTGCGGGC-3'

5 VAA2 K137R
sentido: 5'-CCTGGTTGAGGAACCTGTTAGGACGGCTCCGG-3'
antisentido: 5'-CCGGAGCCGTCCTAACAGGTTCCCTCAACCAGG-3'

10 VAA2 K143R
sentido: 5'-AGACGGCTCCGGGAAAAAGGAGGCCGGTA-3'
antisentido: 5'-TACCGCCTCCTTTTTCCCGGAGCCGTCT-3'

15 VAA2 K161R
sentido: 5'-CCTCGGGAACCGGAAGGGCGGGCC-3'
antisentido: 5'-GGCCCGCCCTTCCGGTTCCCGAGG-3'

VAA2 K490R
sentido: 5'-CCGCCAGCAGCGAGTATCAAGGACATCTGCGG-3'
antisentido: 5'-CCGCAGATGCCTTGATACTCGCTGCTGGCGG-3'

20 VAA2 K527R
sentido: 5'-CGCCATGGCAAGCCACAGGGACGATGAA-3'
antisentido: 5'-TTCATCGTCCCTGTGGCTTGCCATGGCCG-3'

25 VAA2 K532R
sentido: 5'-ACAAGGACGATGAAGAAAGGTTTTTCCCTCAGAGCGG-3'
antisentido: 5'-CCGCTCTGAGGAAAAACCTTCTTCATCGTCCTTGT-3'

- Cebadores de VAA-rh74:

30 VAA-rh74 K137R
sentido: 5'-CTGGTTGAATCGCCGGTTAGGACGGCTCCTG-3'
antisentido: 5'-GACCAACTTAGCGGCCAATCCTGCCGAGGAC-3'

35 VAA-rh74 K333R
sentido: 5'-GCAGAAATGAAGGCACCAGGACCATCGCCAATAACC-3'
antisentido: 5'-GGTTATTGGCGATGGTCCTGGTGCCTTCATTCTGC-3'

40 VAA-rh74 K530R
sentido: 5'-GTTGCCATGGCTACCCACAGGGACGACGAA-3'
antisentido: 5'-TTCGTCGTCCCTGTGGGTAGCCATGGCAAC-3'

45 VAA-rh74 K552R
sentido: 5'-GGAAACAGGGAGCTGGAAGAGACAACGTGGACTAT-3'
antisentido: 5'-ATAGTCCACGTTGTCTCTTCCAGCTCCCTGTTTCC-3'

VAA-rh74 K569R
sentido: 5'-CTAACCAGCGAGGAAGAAATAAGGACCACCAACCC-3'
antisentido: 5'-GGGTTGGTGGTCCTTATTTCTTCCCTCGCTGGTTAG-3'

50 VAA-rh74 K691R
sentido: 5'-CGAGTGGGAGCTGCAGAGGGAGAACAGCAA-3'
antisentido: 5'-TTGCTGTTCTCCCTCTGCAGCTCCCACTCG-3'

55 VAA-rh74 K695R
sentido: 5'-GCTGCAGAAGGAGAACAGCAGACGCTGGAACC-3'
antisentido: 5'-GGTTCCAGCGTCTGCTGTTCTCCTTCTGCAGC-3'

60 VAA-rh74 K709R
sentido: 5'-AGTACACTTCCAATACTACAGATCTACAAATGTGGACTTTGC-3'
antisentido: 5'-GCAAAGTCCACATTTGTAGATCTGTAGTAGTTGGAAGTGTACT-3'

La tabla 5 proporciona una serie de vectores VAA derivado de la mutagénesis que se utilizaron para empaquetar casetes de expresión de transgén de VAA específicamente hepáticos para FIX. La eficiencia de empaquetamiento era indistinguible de la observada con los vectores VAA8 no modificados, de tipo salvaje.

Número de lote	Mutante de lisina	Tamaño de preparación (frascos rotativos)	Rendimiento por cada frasco rotativo (genomas de vector)
KA712	VAA8 K137R	10	1.53E13
KA713	VAA8 K333R	10	9.46E12
KA714	VAA8 K530R	10	1.61E13
KA535	VAA8 (tipo salvaje)	10	6.63E12

5 Los mutantes de cápside que contienen 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos de lisina alterados en cualquiera de las proteínas de cápside indicadas en la presente memoria para incrementar adicionalmente la eficiencia de transducción también se encuentran comprendidos dentro del alcance de la exposición. Los datos revelan además que determinadas mutaciones resultan en variantes que muestran una eficiencia de transducción significativamente reducida. Dichas variantes podrían utilizarse en combinación con variantes que muestran

10 eficiencias de transducción incrementadas, para actuar como señuelos para neutralizar o saturar una respuesta inmune dirigida a anticuerpos contra los vectores entrantes, permitiendo de esta manera que los vectores portadores de los transgenes deseables entren más eficientemente en las células.

15 La figura 1 muestra diagramas esquemáticos de la superficie de la cápside. Los datos presentados en las figuras 2A, 2B y 2C demuestran que la alteración de los residuos de lisina en la cápside VP1 de VAA8 altera el nivel de transgén producido debido a los niveles alterados de transducción. Las figuras 3A, 3B y 3C muestran los efectos de permutaciones únicas y múltiples sobre la producción de HF.IX en células transducidas. La figura 3D muestra

20 que una combinación de mutaciones, por ejemplo, tres residuos de lisina a arginina con cuatro o seis residuos de tirosina a fenilalanina, reducen las tasas de transducción.

Eliminación por CTL de hepatocitos HHL5-B7 mediante la utilización de VAA mutantes de lisina

25 Los presentes inventores evaluaron la eliminación por CTL de hepatocitos transducidos con determinados VAA mutantes de lisina divulgados en la presente memoria. Se utilizaron los materiales y procedimientos siguientes para evaluar la eliminación por CTL de hepatocitos transducidos.

Generación de vector

30 Se produjeron vectores VAA en células HEK-293 mediante la utilización de un enfoque de triple transducción tal como se ha descrito anteriormente (Matsushita, 1998) y se purificaron mediante procedimientos de centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (Ayuso, 2010). Se obtuvieron péptidos epitópicos de VAA sintetizados en Genemed Synthesis y se resuspendieron a una concentración de 5 mg/ml en DMSO al 100%.

35 Expansión *in vitro* de células T

40 Se descongelaron, lavaron, contaron y resuspendieron PBMC humanas (Cellular Technology Ltd.) a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio para linfocitos AIM-V (Gibco) que contenía suero humano al 3% (Bioreclamation), L-glutamina al 1% (Gibco) y penicilina/estreptomina al 1% (Gibco). Para cada condición de expansión, se añadieron 1×10^6 células (500 μ l) a cada pocillo en una placa de 24 pocillos (BD Falcon) en un volumen de 500 μ l. También se añadieron 1×10^6 (500 μ l) adicionales de esplenocitos irradiados (3000 rad) autólogos a cada pocillo como células nodriza, junto con 2.5 μ g/ml de β -2-microglobulina humana (Lee Biosolutions) y 10 ng/ml de IL-7 recombinante humana (R&D Systems). Las células se expandieron en presencia de péptido de VAA a una concentración final de 10 ng/ml a 37°C en 5% de CO₂. Se añadió IL-2 humana (Roche) a una concentración de 10 ng/ml al cultivo celular, después de las primeras 24 horas y subsiguientemente se reabasteció cada 48 horas. Las células se dividieron en nuevos pocillos según resultase necesario y se repitió la estimulación antigénica (antígeno y células nodriza) cada 7 a 10 días durante 3 rondas de reestimulación.

Ensayo de CTL

50 Se llevó a cabo un ensayo de CTL tal como se ha descrito anteriormente (Pien, 2009). Brevemente, se midió la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) tras la lisis de la diana mediada por CTL, con el ensayo de citotoxicidad no radioactivo Cyto Tox 96 (Promega). Se sembraron cuatro mil células diana hepatocitos HHL5 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano Microtest Primaria (BD Falcon) en DMEM que no contenía suero. Las

55 células diana se transdujeron a un MDI de 5000, 50,000 y 500,000 de cápside de VAA y se incubaron durante 18 horas a 37°C, con 5% de CO₂. Tras el tratamiento y la incubación, las células diana sembradas se lavaron una vez con medio antes de la adición de linfocitos T citotóxicos específicos de epítipo, expandidos tal como se ha indicado anteriormente. Se añadieron CTL en una proporción de células efectoras-diana de 10:1 durante 4 horas a 37°C,

5% de CO₂, y se midió la LDH tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con lectura del sustrato enzimático a 490 nm utilizando un espectrofotómetro (Spectramax).

Citometría de flujo

5

La expresión de GFP tras la transducción de VAA se midió mediante citometría de flujo. Se sembraron hepatocitos humanos de las líneas celulares HHL5 o Huh7 en DMEM que contenía suero de feto bovino al 10%, L-glutamina al 1% (Gibco) y penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco) a una densidad de 250,000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos Primaria Multiwell (BD Falcon). Las células se transdujeron a una MDI de 5000, 50000, o 500000 de vector VAA y se incubaron durante 18 horas a 37°C, con 5% de CO₂. Tras la incubación, las células se tripsinizaron, se lavaron dos veces con PBS, FBS al 2% y se fijaron con paraformaldehído al 2%. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACS Canto II utilizando el FACSDiva® (BD Biosciences) y se llevó a cabo un análisis adicional utilizando el software Flowjo® (Treestar).

10

15 Resultados del ensayo de CTL

Con el fin de llevar a cabo adicionalmente el efecto de las mutaciones de lisina sobre la transducción vírica, los presentes inventores utilizaron un ensayo *in vitro* de citotoxicidad mediada por CTL previamente desarrollado por el laboratorio de los presentes inventores a fin de someter a ensayo la funcionalidad de los vectores VAA (Pien *et al.*). Los resultados de transducción de VAA1 y VAA2 se muestran en las figuras 4, 5 y 6. En la figura 4, todas las mutaciones de lisina en la cápside VAA-1 resultaron en una reducción de la eliminación mediada por CTL de las células diana, sugiriendo que las mutaciones de la lisina conducen a un procesamiento y presentación de antígeno superficial menos eficientes con la transducción. Además, el efecto de las mutaciones de lisina aparentemente es aditivo, ya que los mutantes triples y cuádruples de lisina mostraban la mayor reducción de la eliminación mediada por CTL (figura 4A, B). Las mutaciones de la cápside VAA-2 mostraron un efecto similar. Véanse las figuras 5 y 6. La figura 7 muestra los resultados de transducción obtenidos al someter a ensayo las variantes de Rh74.

20

25

En resumen, los presentes inventores han encontrado que la mutación de los residuos de lisina en las cápsides de VAA a residuos de arginina incrementa la eficiencia de transducción del VAA. Los experimentos de los presentes inventores identificaron varias variantes que, tras la transducción, resultaron en niveles más elevados de expresión del transgén del factor IX humano (FIX) en ratones en comparación con animales que habían recibido vectores VAA no modificados.

30

Referencias

35

Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, *et al.* The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:10405-10410, 2002.

40

High KA, Aubourg P "rAAV human trial experience" *Methods Mol Biol.* 807:429-57, 2011. Zhong L, Zhao W, Wu J, Li B, Zolotukhin S, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Srivastava A. "A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis." *Mol. Ther.* 15(7):1323-30, julio de 2007. *Pub. elec.*: 17 de abril de 2007.

45

Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M, Herzog RW, Zolotukhin I, Warrington KH Jr, Weigel-Van Aken KA, Hobbs JA, Zolotukhin S, Muzyczka N, Srivastava A. "Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105(22):7827-32, 3 de junio de 2008.

50

Thrower J.S., Hoffman L., Rechsteiner M. y Pickart C. M., "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal", *EMBO J.* 19(1): 94-102 (4 de enero de 2000).

Bedford L, Lowe J, Dick LR, Mayer RJ, Brownell JE. "Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets", *Nat. Rev. Drug Discov.* 10(1):29-46 (enero, 2011).

55

Peng, J; Schwartz; Elias; Thoreen; Cheng; Marsischky; Roelofs; Finley *et al.*, "A proteomics approach to understanding protein ubiquitination". *Nature biotechnology* 21(8): 921-6 (agosto, 2003).

60

Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R. R., Mohan, A., Heyen, J. W., Goebel, M. G. y Iakoucheva, L. M., Identification, Analysis and Prediction of Protein Ubiquitination Sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 78(2):365-380, 2010.

TABLA 1

Comparison of AAV1, AAV2 and AAV8 lysine positions and their Ubiquitination predictions

Color Label: ██████████, **Azul: confianza media** ██████████, **Rojo: confianza elevada** ██████████, **Black: No ubiquitination prediction**

AAV1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLPGAPKPKANQQ**K**QDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV8 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLPGAPKPKANQQ**K**QDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV2 MAADGYLPDWLEDNLSEGIRQWWKLPKPPPPKPAERH**K**DDSRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60
 AAV-rh74 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLPGAPKPKANQQ**K**QDNRGLVLPGYKYLGPFGNGLD 60

AAV1 **K**GEPVNAADAAALEHD**K**AYDQQL**K**AGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120
 AAV8 **K**GEPVNAADAAALEHD**K**AYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120
 AAV2 **K**GEPVNEADAAALEHD**K**AYDRQLDSGDNPYLRYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120
 AAV-rh74 **K**GEPVNAADAAALEHD**K**AYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV1 AKKRVLEPLGLVEEGA**K**TAPG**KK**RPVEQSPQ-EPDSSSGIG**K**TGQQPAKKRLNFGQTGDS 179
 AAV8 AKKRVLEPLGLVEEGA**K**TAPG**KK**RPVEPSPQRSPDSSTGIG**K**KGQQPARKRLNFGQTGDS 180
 AAV2 AKKRVLEPLGLVEEPPV**K**TAPG**KK**RPVEHSPV-EPDSSSGTG**K**AGQQPARKRLNFGQTGDA 179
 AAV-rh74 AKKRVLEPLGLVESPV**K**TAPG**KK**RPVEPSPQRSPDSSTGIG**K**KGQQPAKKRLNFGQTGDS 180

AAV1 ESVPDPQPLGEPATPAVGPPTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRV 239
 AAV8 ESVPDPQPLGEPAAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV 240
 AAV2 DSVPDPQPLGQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLMGDRV 239
 AAV-rh74 ESVPDPQPIGEPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV 240

AAV1 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTG-ASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQ 298
 AAV8 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQ 300
 AAV2 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQIS--SQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQ 297
 AAV-rh74 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQ 300

AAV1 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTNDGVTIANNLTSTVQVFSQSEYQLPYVLGSA 358
 AAV8 RLINNNWGFPRKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGT**K**TIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA 360
 AAV2 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSA 357
 AAV-rh74 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGT**K**TIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA 360

AAV1 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSYTFEE 418
 AAV8 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFQFTYTFED 420
 AAV2 HQGCLPPFPADVFMVMPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFTFSYTFED 417
 AAV-rh74 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNFEFSYNFED 420

AAV1 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQN**K**DLLFSRGSPPAGMSVQPKNW 478
 AAV8 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNTMANQAKNW 480
 AAV2 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQ**R**LQFSQAGASDIRDQSRNW 477
 AAV-rh74 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNW 480

ES 2 862 912 T3

AAV1 LPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDDEKFFPMS 538
 AAV8 LPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSNFAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDDEERFFPSN 540
 AAV2 LPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDDEKFFPQS 537
 AAV-rh74 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDDEERFFPSS 540

AAV1 GVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNFQSSSTDPATGDVHA 598
 AAV8 GILIFGKQNAARDNADYSVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGVADNLQQQNTAPQIGTVNS 600
 AAV2 GVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIKRTTNPVATEEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNT 597
 AAV-rh74 GVLIFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS 600

AAV1 MGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANP 658
 AAV8 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP 660
 AAV2 QGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANP 657
 AAV-rh74 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP 660

AAV1 PAEFSATKFAFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNN 718
 AAV8 PTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTE 720
 AAV2 STTFSAAKFAFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSVNVDFVDTN 717
 AAV-rh74 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE 720

AAV1 GLYTEPRPIGTRYLTRP- 735
 AAV8 GYSEPRPIGTRYLTRNL 738
 AAV2 GYSEPRPIGTRYLTRNL 735
 AAV-rh74 GTYSEPRPIGTRYLTRNL 738

Tabla 2

Predicción de ubiquitinación de cápside VAA8			
Lisina	Superficie	Predicción según Ubipred	Producción de vector
26	NA (no en VP3)		
31	NA (no en VP3)		
33	NA (no en VP3)		
38	NA (no en VP3)	Confianza baja	Sí
51	NA (no en VP3)		
61	NA (no en VP3)	Confianza baja	
77	NA (no en VP3)	Confianza baja	
122	NA (no en VP3)		
123	NA (no en VP3)		
137	NA (no en VP3)	Confianza elevada	Sí
142	NA (no en VP3)		
143	NA (no en VP3)	Confianza baja	Sí
162	NA (no en VP3)		
163	NA (no en VP3)		
170	NA (no en VP3)		
259	Sí		Sí
312			
317			
324			
333	Sí	Confianza intermedia	Sí
478			

Predicción de ubiquitinación de cápside VAA8			
Lisina	Superficie	Predicción según Ubipred	Producción de vector
510	Sí		Sí
530		Confianza intermedia	Sí
547	Sí		Sí
569	Sí	Confianza baja	Sí
623			
643			
652			No empaquetado
668	Sí	Confianza baja	Sí
691		Confianza baja	
695		Confianza baja	
709	Sí	Confianza baja	Sí

Software UbPred (<http://www.ubpred.org/>):

- 5 Radivojac P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R. R., Mohan, A., Heyen, J. W., Goebel, M. G. y Iakoucheva, L. M., Identification, Analysis and Prediction of Protein Ubiquitination Sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 78(2):365-380 (2010).

Tabla 3

Mutación de VAA8	Vector	Rendimiento (concentración de vector vg/RB)	Comparación con el WT
Tipo salvaje	hAAT-hFIX16	1.24 E+13	NA
K38R	hAAT-hFIX16	2.32 E+13	reducción
K137R	hAAT-hFIX16	1.53 E+13	incremento
K143R	hAAT-hFIX16	2.21 E+13	reducción
K259R	hAAT-hFIX16	1.03 E+13	ligero incremento
K333R	hAAT-hFIX16	9.46 E+12	incremento
K510R	hAAT-hFIX16	1.04 E+13	reducción
K530R	hAAT-hFIX16	1.61 E+13	incremento
K547R	hAAT-hFIX16	1.17 E+13	igual
K569R	hAAT-hFIX16	1.38 E+13	incremento
K668R	hAAT-hFIX16	1.41 E+13	igual
K709R	hAAT-hFIX16	1.38 E+13	reducción
K530R/K569R	hAAT-hFIX16	1.34 E+13	igual
K(137/333/530) R	hAAT-hFIX16	7.00 E+12	incremento
K(137/333/530/709)R	hAAT-hFIX16	6.64 E+12	reducción
K(137/333/530/569)R	hAAT-hFIX16	9.03 E+12	igual
K(137/259/333/530/547/569)R	hAAT-hFIX16	7.62 E+12	igual
Y(253/275/447/703/707/733)Y	hAAT-hFIX16	9.87 E+12	ligero incremento
Y(253/275/447/703/707/733)Y + K(137/333/530) R	hAAT-hFIX16	3.24 E+12	reducción
Y(253/275/447/733) F	hAAT-hFIX16	8.58 E+12	ligero incremento
Y(253/275/447/733)F + K(137/333/530)R	hAAT-hFIX16	3.30 E+12	reducción
K(137/333/530/547)R	hAAT-hFIX16	5.85 E+12	no sometido a ensayo
K(137/259/333/530/547)R	hAAT-hFIX16	7.68 E+12	no sometido a ensayo
Y733F.	hAAT-hFIX16	8.30 E+12	incremento
Y(733/447) F	hAAT-hFIX16	1.19 E+13	incremento
Y(703/707)F	hAAT-hFIX16	1.05 E+13	incremento
Y(733/447/253)F	hAAT-hFIX16	1.35 E+13	incremento
Y(733/447/275) F	hAAT-hFIX16	7.26 E+12	incremento

Mutación de VAA1	Vector	Rendimiento (concentración de vector vg/RB)
VAA1 WT	CMV-GFP	6.71E+12
AAV1 K137R/K459R/K533R	CMV-GFP	8.35E+12
VAA1 K(137/459/533/707)R	CMV-GFP	6.97E+12

ES 2 862 912 T3

Mutación de VAA1	Vector	Rendimiento (concentración de vector vg/RB)
VAA1 K137R	CMV-GFP	7.96E+12
VAA1 K459R	CMV-GFP	6.57E+12
VAA1 K533R	CMV-GFP	5.00E+12
VAA1 K707R	CMV-GFP	5.66E+12
VAA1 K528R	CMV-GFP	7.28E+12
VAA1 Y50A	CMV-GFP	7.93E+12

Administración de CMH

Mutación de VAA2	Vector	Rendimiento (concentración de vector vg/RB)	
VAA2	CMV GFP	1.15e12.	
VAA2 K137R	CMV-GFP	6.24E+12	
VAA2 K532R	CMV-GFP	5.73E+12	
VAA2 K527R	CMV-GFP	4.92E+12	
VAA2 Y50A	CMV-GFP	5.59E+12	
Mutación de RH74	Vector	Rendimiento (concentración de vector vg/RB)	
RH74 WT	hAAT-hFIX19	1.51E+13	
Rh74 TMR	hAAT-hFIX16	7.62E+12	
Rh74 TMR+552R	hAAT-hFIX16	6.91E+12	
Rh74 TMR+709R	hAAT-hFIX16	4.18E+12	
Rh74 HMF	hAAT-hFIX 16	6.83E+12	
Rh74 HMR+195/202	hAAT-hFIX19	3.79E+12	
Rh74 HMR+195/202+K38R	hAAT-hFIX19	3.00E+12	
Rh74 HMR+195/202+K51R	hAAT-hFIX 19	3.54E+12	
Rh74 HMR+195/202+K61R	hAAT-hFIX19	5.14E+12	
Rh74 HMR+195/202+K77R	hAAT-hFIX19	5.86E+12	
Rh74 HMR+195/202+K(122/123)R	hAAT-hFIX19	5.51E+12	
Rh74 HMR+195/202+K(142/143)R	hAAT-hFIX19	5.75E+12	
RHM13_1	hAAT-hFIX19	7.3132E+12	
RHM17_1	hAAT-hFIX19	5.928E+12	
RHM14_2	hAAT-hFIX19	6.084E+12	
RHM15_1	hAAT-hFIX19	5.0396E+12	
Definición de TMR=K(137/333/530)R			
Definición de HMF=Y(253/275/447/703/707/733)F			
Definición de HMR:K(137/259/333/530/552/569)R			
Definición de 195/202: G195A+ L199V+ S201P+ G202N			

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yazicioglu, Mustafa N. Mingozzi, Federico Anguela, Xavier M. High, Katherine A.

5 <120> Composiciones y procedimientos para la transferencia genética altamente eficiente mediante la utilización de variantes de cápside de VAA

<130> 3460-P05503WO00

10 <140> PCT/US2010/037170
<141> 2013-04-18

<150> 61/635,273
<151> 2012-04-18

15 <150> 61/794,995
<151> 2013-03-15

<160> 60

20 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 735

25 <212> PRT

<213> Virus adenoasociado 1

<400> 1

```

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1      5      10      15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20      25      30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35      40      45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50      55      60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65      70      75      80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85      90      95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100     105
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115     120     125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130     135     140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
 145     150     155     160
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165     170     175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180     185     190
Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195     200     205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
 210     215     220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225     230     235     240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245     250     255
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
 260     265     270
Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
 275     280     285
    
```

ES 2 862 912 T3

His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
 290 295 300
 Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
 305 310 315 320
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
 325 330 335
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
 355 360 365
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590
 Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 Thr Asp Gly His Phe His Gln Gly Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
 625 630 635 640
 Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700
 Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
 705 710 715 720
 Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro
 725 730 735

<210> 2
 <211> 738
 5 <212> PRT
 <213> Virus adenoasociado 8

<400> 2
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

10

ES 2 862 912 T3

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

<210> 3

<211> 735

5 <212> PRT

<213> Virus adenoasociado 2

<400> 3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro
 20 25 30
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu

10

Thr Ser Thr Val 325 Gln Val Phe Thr Asp Ser 330 Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 Val Leu Gly 340 Ser Ala His Gln Gly 345 Cys Leu Pro Pro Phe 350 Pro Ala Asp
 Val Phe Met 355 Val Pro Gln Tyr Gly 360 Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 Gln Ala Val Gly Arg Ser 375 Phe Tyr Cys Leu 380 Glu Tyr Phe Pro Ser
 385 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr 395 Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
 400 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr
 405 410 415
 Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 420 425 430
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 435 440 445 450 455 460
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
 465 470 475 480 485 490 495
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
 500 505 510
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
 515 520 525
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro 530 Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 535 540 545
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 550 555 560
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 565 570 575
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
 595 600 605
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
 610 615 620
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
 625 630 635 640
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
 645 650 655
 Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
 660 665 670
 Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys
 675 680 685
 Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr
 690 700
 Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr
 705 710 715 720
 Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735

<210> 4

<211> 738

5 <212> PRT

<213> Virus adenoasociado rh.74

<400> 4

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

10

ES 2 862 912 T3

Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
 145 150 155 160
 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
 180 185 190
 Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
 210 215 220
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
 245 250 255
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540
 Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
 545 550 555 560
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
 580 585 590
 Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
 610 615 620
 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe

ES 2 862 912 T3

625 Gly Leu Lys His Pro 630 Pro Pro Gln Ile Leu 635 Ile Lys Asn Thr Pro Val
 645 Pro Ala Asp Pro Thr Thr Phe Asn 650 Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
 660 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
 675 Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys 680 Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
 690 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
 705 Gly Thr Tyr Ser Glu 710 Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
 725 730 735
 Asn Leu

- 5 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
 <223> cebador

- <400> 5
 ctcaacgga ctgcacaggg gggagcc 27

- 15 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
 <223> cebador

- <400> 6
 ggctccccc tgotgagtc gttgaag 27

- 25 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
 <223> cebador

- <400> 7
 gcctacgacc agcagctcag agcgggtgac 30

- 35 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- 40 <220>
 <223> cebador

- <400> 8
 gtcacccgct ctgagctgct ggtcgttagc 30

- 50 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- <220>
 <223> cebador

- 55 <400> 9

tggttgagga aggcgctagg acggctcct 29
 <210> 10
 <211> 29
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 10
 aggagccgtc ctagcgctt cctcaacca 29
 <210> 11
 15 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 11
 ctaagacggc tctggaaag agacgtccg tag 33
 25 <210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 12
 ctaccggacg tctcttcca ggagccgtct tag 33
 35 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 45 cgggcatcgg caggacagc cagca 25
 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 14
 tgctggcctg tctgccgat gcccg 25
 <210> 15
 <211> 33
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 65 <400> 15

ES 2 862 912 T3

agtccggaag tgcccaaac agggacttgc tgt 33
 <210> 16
 <211> 33
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 16
 acagcaagtc cctgttttgg gcacttccgg act 33
 <210> 17
 15 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 17
 gcactgctat ggctcacac agagacgacg aag 33
 25 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 18
 35 cttcgtcgtc tctgtgtgag gccatagcag tgc 33
 <210> 19
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 45 caagacgac gaagacaggt tcttcccat gagcg 35
 <210> 20
 <211> 35
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 20
 cgctcatggg aaagaacctg tctcgtcgt ctttg 35
 <210> 21
 <211> 39
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 65 <400> 21

5 tgcaatgacac atccaattat gcaagatctg ccaacgttg 39
 <210> 22
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 22
 caacgttggc agatcttgca taattggatg tgtactgca 39

 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 23
 ggttgaggaa ggcgctagga cggctcctgg 30
 20 <210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 24
 ccaggagccg tcctagcgcc ttcctcaacc 30
 30 <210> 25
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador

 <400> 25
 gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taacc 35
 40 <210> 26
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador

 <400> 26
 ggttattggc gatggtcctg gtccttcat tctgc 35
 50 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador

 <400> 27

gcatcgctat ggcaacacac agagacgacg agg 33

<210> 28
 <211> 33
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

10 <400> 28
 cctcgtcgtc tctgtgtgtt gccatagcga tgc 33

<210> 29
 <211> 41
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

20 <400> 29
 gtacacctcc aactactaca gatctacaag tgtggacttt g 41

25 <210> 30
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 30
 35 caaagtccac actgtagat ctgtagtagt tggagggtga c 41

<210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 31
 45 gcccgagag cggcataggg acgacag 27

<210> 32
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

55 <400> 32
 ctgtgtccc tatgccgctc tgcgggc 27

<210> 33
 <211> 32
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

65 <400> 33

ES 2 862 912 T3

cctggttgag gaacctgta ggacggctcc gg 32
 <210> 34
 <211> 32
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 10
 <400> 34
 ccggagccgt ctaacaggt tcctcaacca gg 32
 <210> 35
 15 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 35
 agacggctcc gggaaaaagg aggccggtta 29
 25 <210> 36
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 36
 35 taccggcctc cttttcccg gagccgtct 29
 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 37
 45 cctcgggaac cggaagggcg ggcc 24
 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 38
 ggcccgcct tccggtccc gagg 24
 <210> 39
 <211> 32
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 65 <400> 39

ES 2 862 912 T3

ccgccagcag cgagtatcaa ggacatctgc gg 32
 <210> 40
 <211> 32
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 10
 <400> 40
 ccgcagatgt ccttgatact cgctgctggc gg 32
 <210> 41
 15 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 41
 cggccatggc aagccacagg gacgatgaa 29
 25 <210> 42
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 42
 35 ttcatcgtcc ctgtggcttg ccatggccg 29
 <210> 43
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 43
 45 acaaggacga tgaagaaagg tttttcctc agagcgg 37
 <210> 44
 <211> 37
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 55 <400> 44
 ccgctctgag gaaaaaacct ttctcatcg tccttgt 37
 <210> 45
 <211> 31
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 65 <400> 45

ES 2 862 912 T3

ctggttgaat cgccggttag gacggctct g 31

5 <210> 46
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 46
 gaccaactta gcgccaatc ctgccgagga c 31

15 <210> 47
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 47
 gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgcaa taacc 35

25 <210> 48
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 48
 ggttattggc gatggtcctg gtccttcat tctgc 35

35 <210> 49
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 49
 gttgccatgg ctaccacag ggacgacgaa 30

45 <210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador

<400> 50
 ttcgtcgtcc ctgtggtag ccatggcaac 30

55 <210> 51
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador

65 <400> 51

ES 2 862 912 T3

ggaacaggg agctggaaga gacaacgtgg actat 35

5 <210> 52
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 52
atagtccacg ttgtctctc cagctccctg ttcc 35

15 <210> 53
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 53
ctaaccagcg aggaagaaat aaggaccacc aacc 35

25 <210> 54
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 54
gggttggtgg tcctatttc ttctcgctg gttag 35

35 <210> 55
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

<400> 55
cgagtgggag ctgcagaggg agaacagcaa 30

45 <210> 56
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador

55 <400> 56
ttgctgttct ccctctgcag ctcccactcg 30

60 <210> 57
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> cebador

<400> 57

ES 2 862 912 T3

gctgcagaag gagaacagca gacgctggaa cc 32

<210> 58
<211> 32
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

10

<400> 58
ggtccagcg tctgctgttc tcctctgca gc 32

<210> 59
15 <211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> cebador

<400> 59
agtacacttc caactactac agatctacaa atgtggactt tgc 43

25 <210> 60
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> cebador

<400> 60
35 gcaaagtcca catttgtaga tctgtagtag ttggaagtgt act 43

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector virus adenoasociado (VAA) que comprende una proteína de cápside VP1 que comprende una o más sustituciones de lisina seleccionadas de entre K61R, K84R, K137R, K143R, K161R, K459R, K533R y K707R de la proteína de cápside VP1 del VAA1, en el que dicho vector comprende además un minigén que comprende repeticiones terminales invertidas de VAA y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga operablemente ligada a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto a partir de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula huésped, en el que dicha sustitución de lisina resulta eficaz para inhibir la ubiquitinación de dicha proteína de cápside, incrementando de esta manera la transducción de dicho vector VAA en una célula diana, en comparación con un vector VAA que comprende la proteína de cápside VP1 de VAA1 sin la sustitución o sustituciones de lisina.
- 15 2. Vector virus adenoasociado (VAA) que comprende una proteína de cápside VP1 que comprende una o más sustituciones de lisina seleccionadas de entre K39R, K137R, K143R, K161R, K490R, K527R y K532R de la proteína de cápside VP1 del VAA2, en el que dicho vector comprende además un minigén que comprende repeticiones terminales invertidas de VAA y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga operablemente ligada a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto a partir de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula huésped, en el que dicha sustitución de lisina resulta eficaz para inhibir la ubiquitinación de dicha proteína de cápside, incrementando de esta manera la transducción de dicho vector VAA en una célula diana, en comparación con un vector VAA que comprende la proteína de cápside VP1 de VAA2 sin la sustitución o más sustituciones de lisina.
- 25 3. Vector virus adenoasociado (VAA) que comprende una proteína de cápside VP1 que comprende una o más sustituciones de lisina seleccionadas de entre K137R, K333R, K530R y K569R de la proteína de cápside VP1 del VAA8, en el que dicho vector comprende además un minigén que comprende repeticiones terminales invertidas de VAA y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga operablemente ligada a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto a partir de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula huésped, en el que dicha sustitución de lisina resulta eficaz para inhibir la ubiquitinación de dicha proteína de cápside, incrementando de esta manera la transducción de dicho vector VAA en una célula diana, en comparación con un vector VAA que comprende la proteína de cápside VP1 de VAA8 sin la sustitución o sustituciones de lisina.
- 30 4. Vector virus adenoasociado (VAA) que comprende una proteína de cápside VP1 que comprende una o más sustituciones de lisina seleccionadas de entre K137R, K333R, K552R y K709R de la proteína de cápside VP1 del VAA-rh74, en el que dicho vector comprende además un minigén que comprende repeticiones terminales invertidas de VAA y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga operablemente ligada a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto a partir de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula huésped, en el que dicha sustitución de lisina resulta eficaz para inhibir la ubiquitinación de dicha proteína de cápside, incrementando de esta manera la transducción de dicho vector VAA en una célula diana, en comparación con un vector VAA que comprende la proteína de cápside VP1 de VAA-rh74 sin la sustitución o sustituciones de lisina.
- 35 5. Vector VAA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto de expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga es un péptido o ácido nucleico terapéutico.
- 40 6. Vector VAA según la reivindicación 5, en el que el péptido terapéutico es un factor de coagulación seleccionado del grupo que consiste en Factor VIII, Factor IX y un fragmento funcional de los mismos.
- 45 7. Vector VAA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto de expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga es una IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, inmunoglobulina quimérica, anticuerpo humanizado o un anticuerpo de una sola cadena.
- 50 8. Vector VAA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto de expresión es un ARNi antivírico.
- 55 9. Vector VAA según la reivindicación 8, en el que dicho ARN inhibidor resulta eficaz para inhibir la expresión de un gen diana eucariótico.
- 60 10. Vector VAA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende 2, 3 o 4 sustituciones de lisina.
- 60 11. Composición farmacéutica que comprende el vector VAA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador fisiológicamente compatible para la misma.
- 60 12. Cultivo celular que comprende el vector VAA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho vector ha sido introducido en la célula.
- 65 13. Vector VAA según la reivindicación 6 para utilizar en un procedimiento de tratamiento de la hemofilia A o hemofilia B.

VAA1

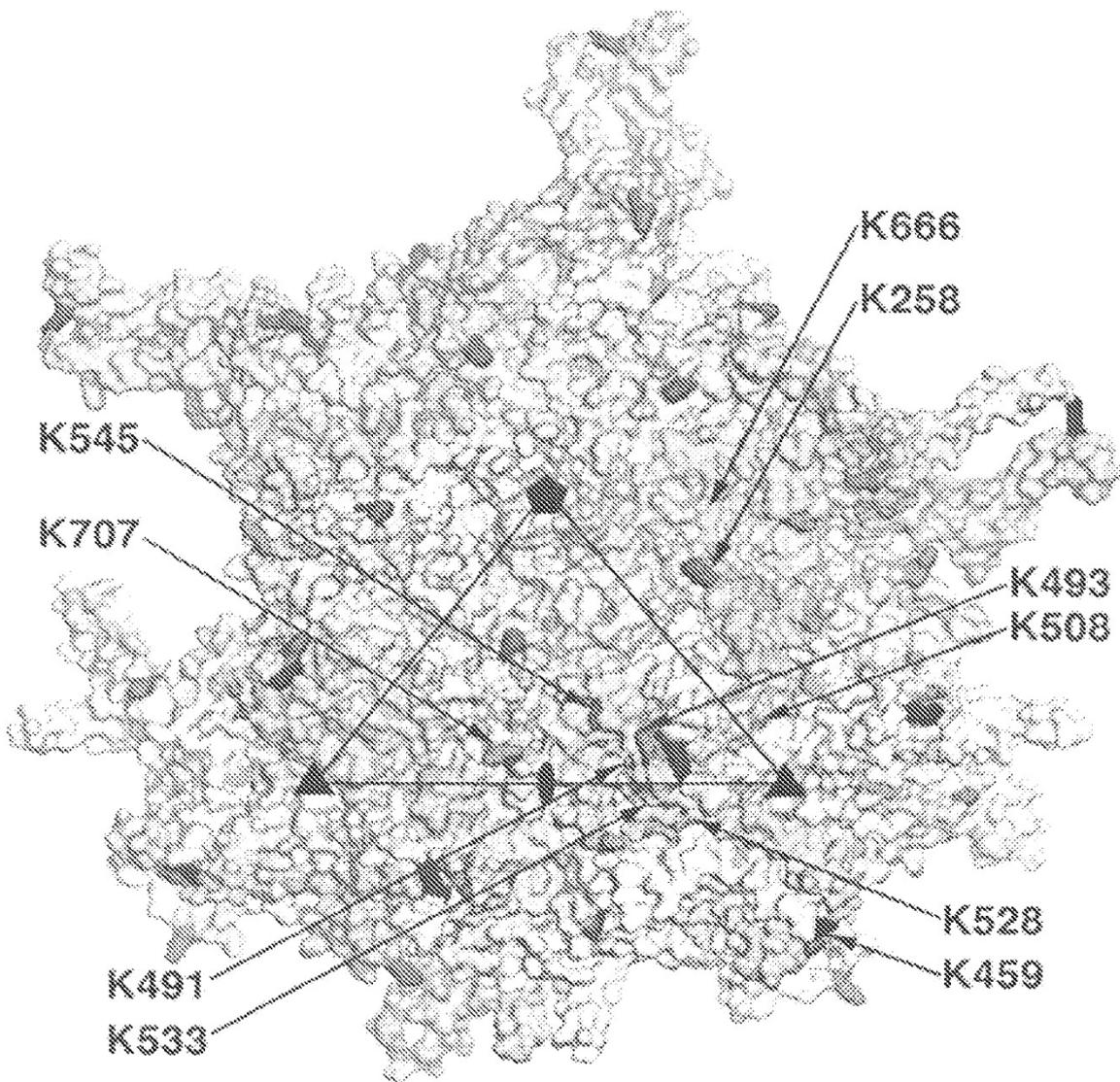


Figura 1A

VAA2

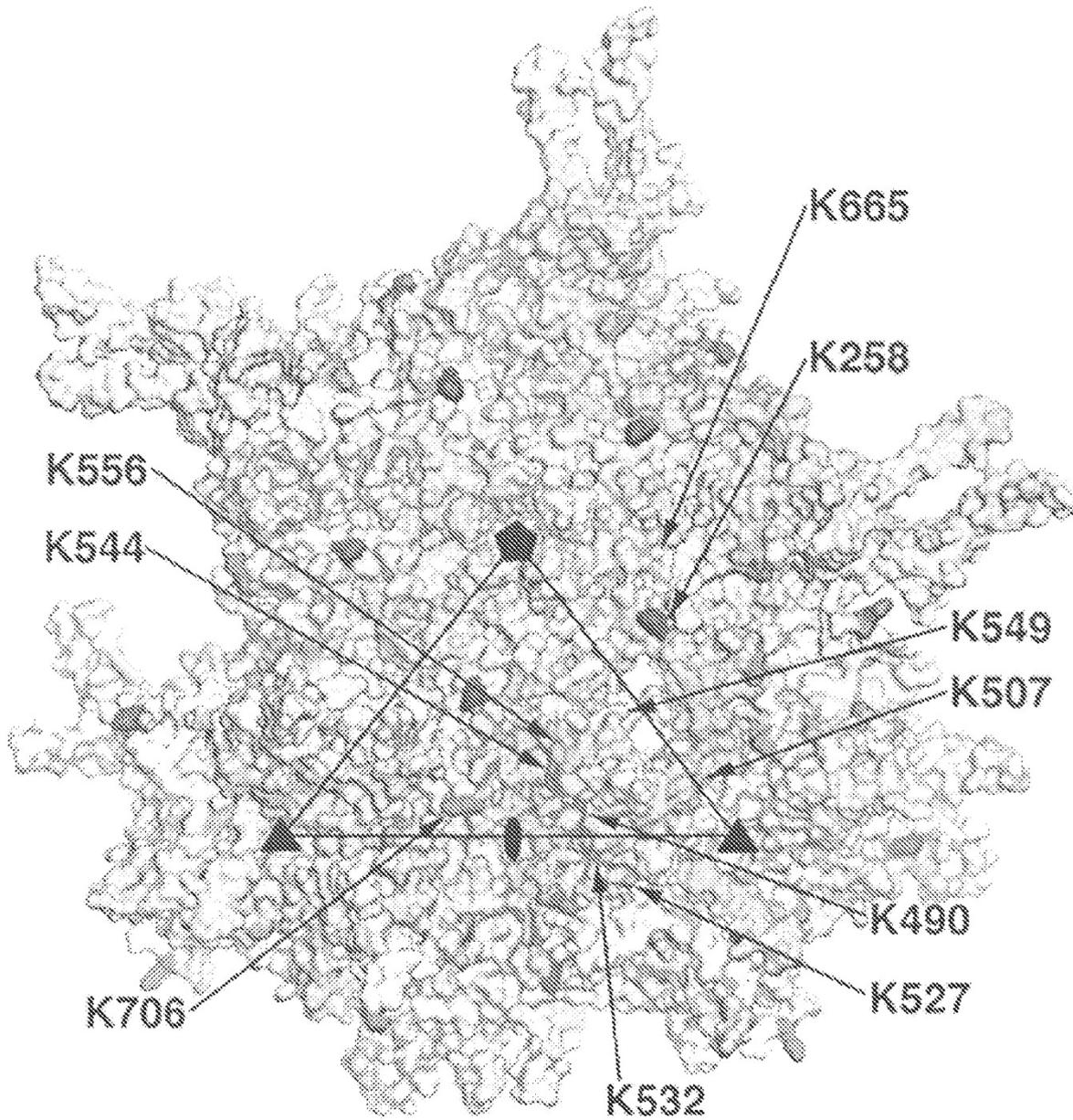


Figura 1B

VAA8

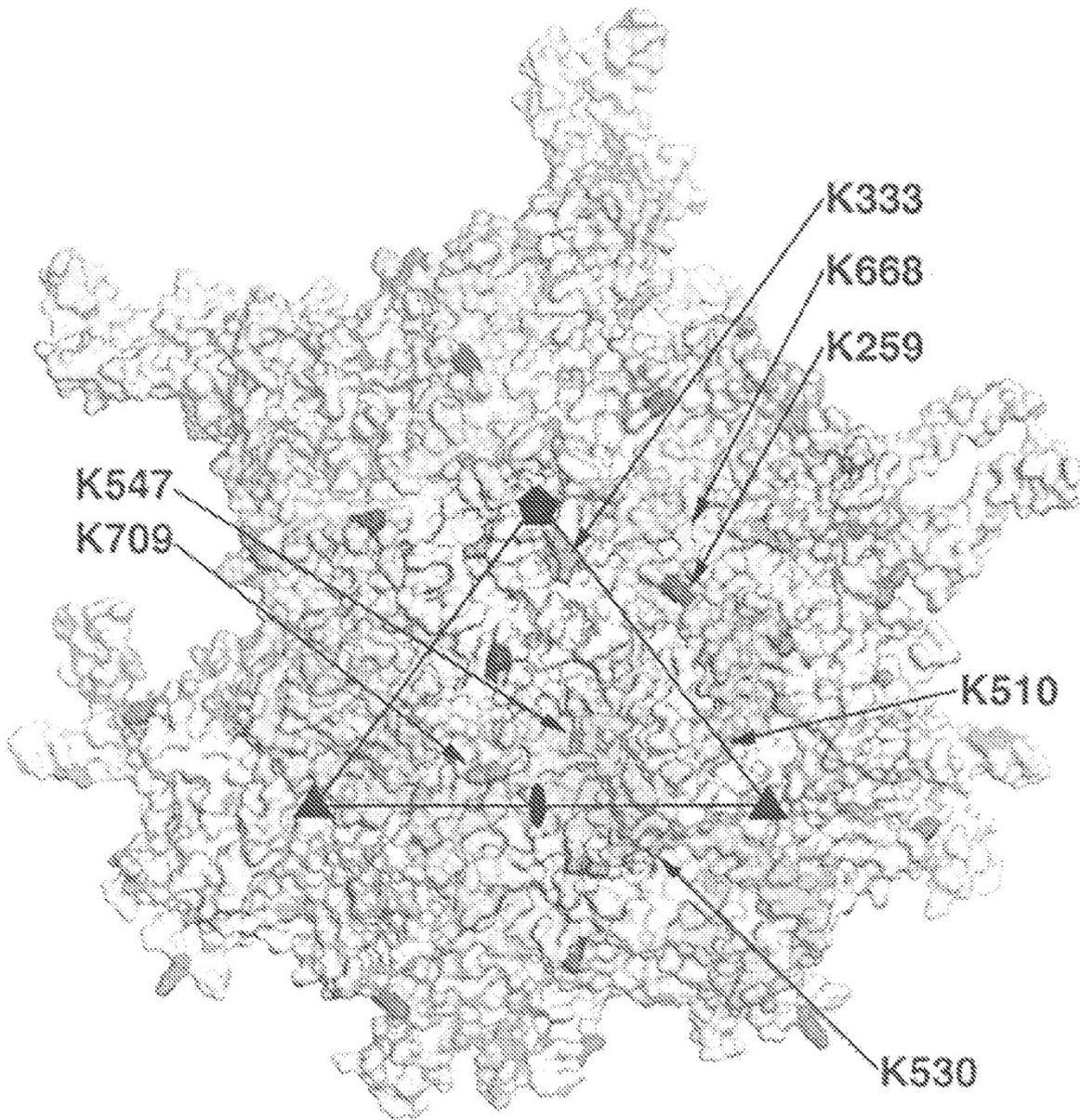


Figura 1C

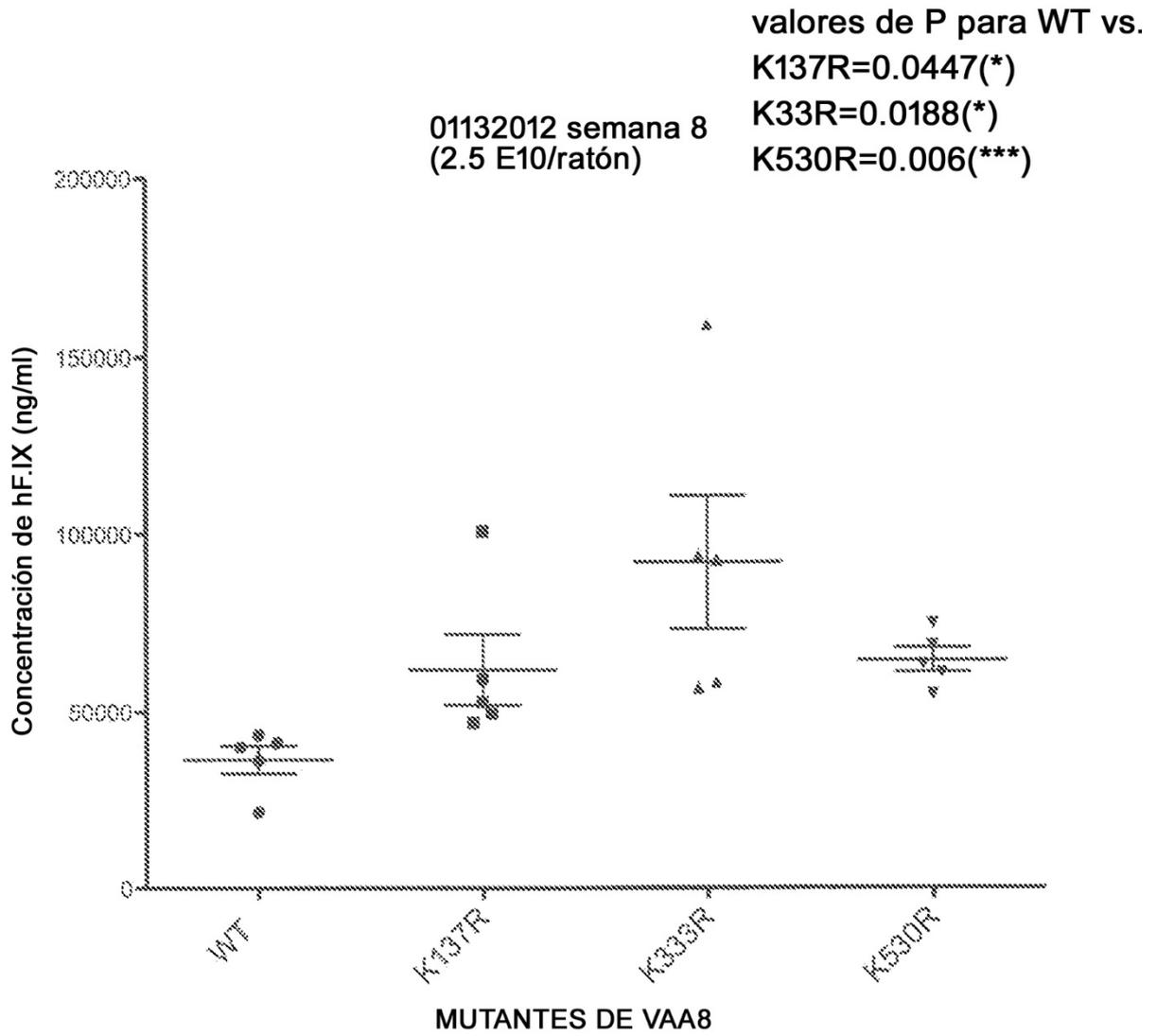


Figura 2A

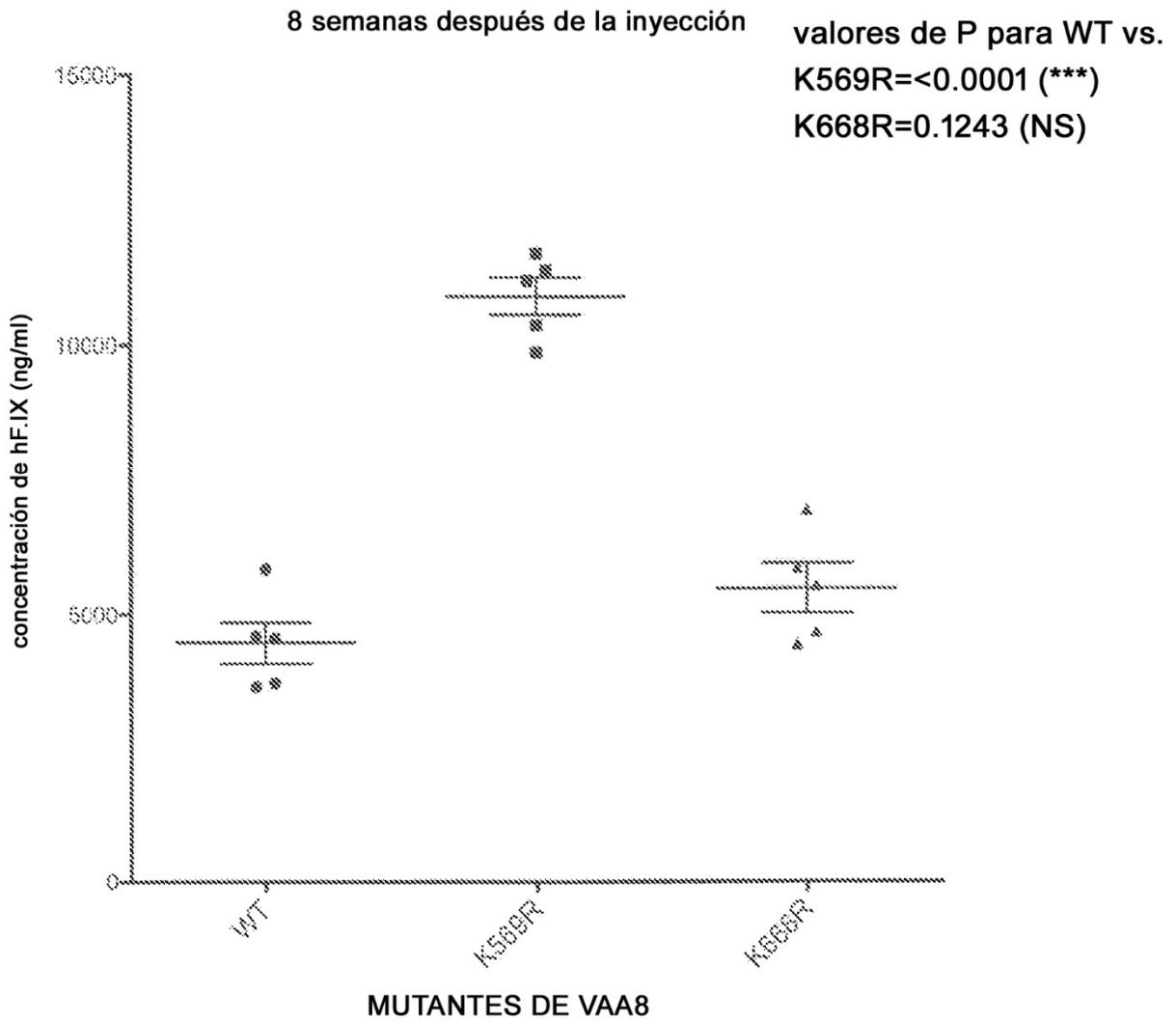
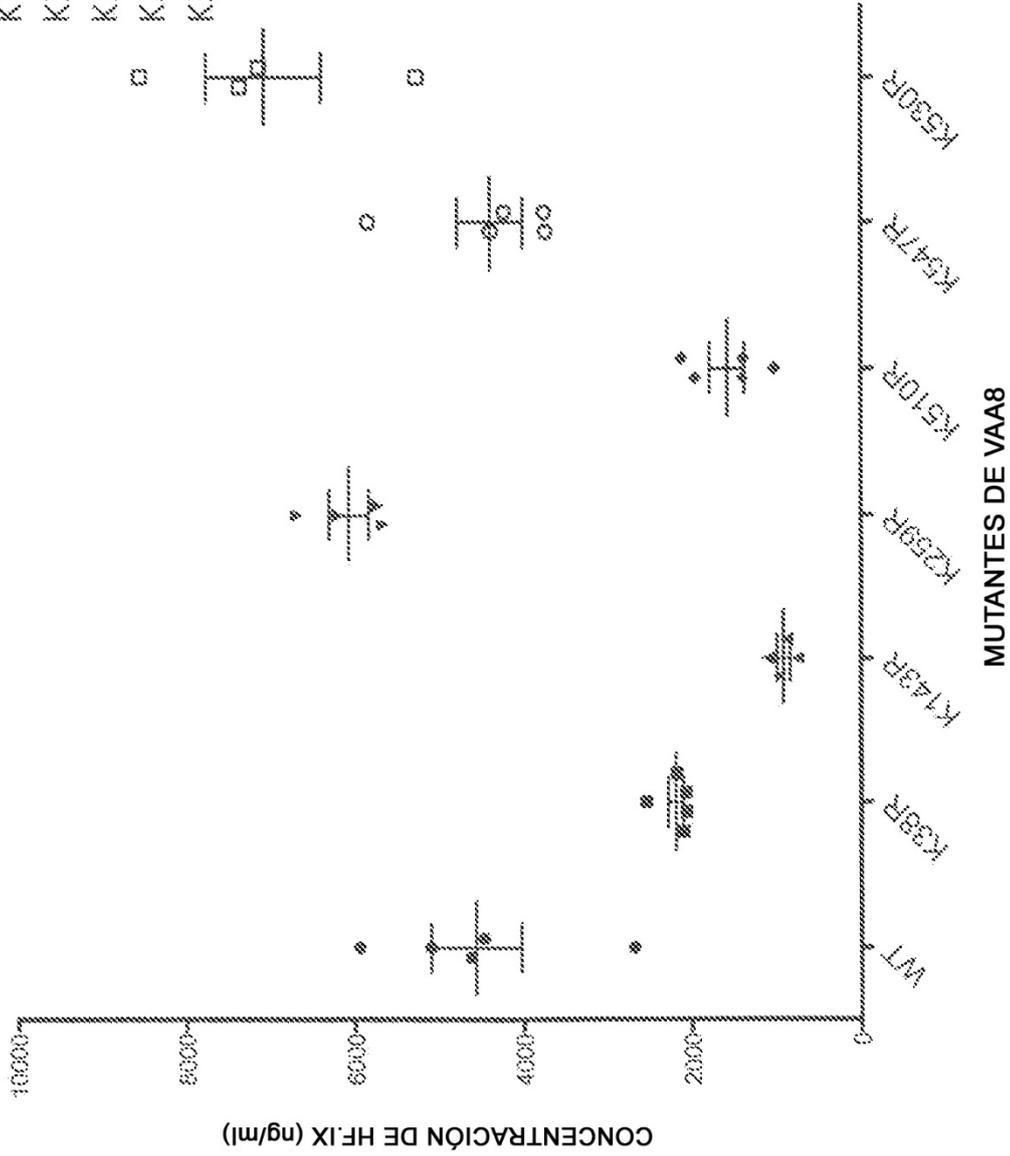


Figura 2B

valores de P para WT vs.

- K38R=0.0023(**)
- K143R=0.0006(***)
- K259R=0.0507(NS)
- K510R=0.0008(***)
- K333R=0.8032(NS)
- K530R=0.0211 (*)

SEMANA 8

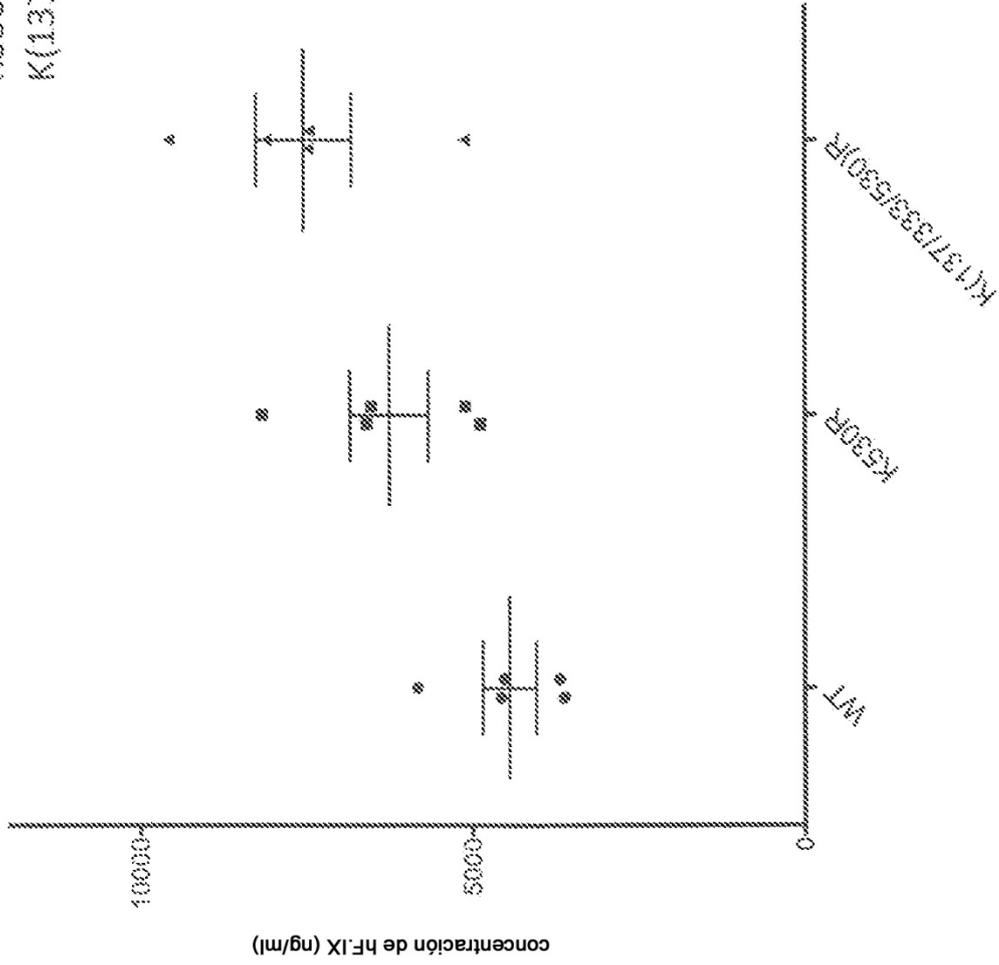


MUTANTES DE VAA8

Figura 2C

valores de P para WT vs.
K530R=0.0351 (*)
K(137/333/530)R= 0.0054(**)

semana 8



MUTANTES DE VAA8

Figura 3A

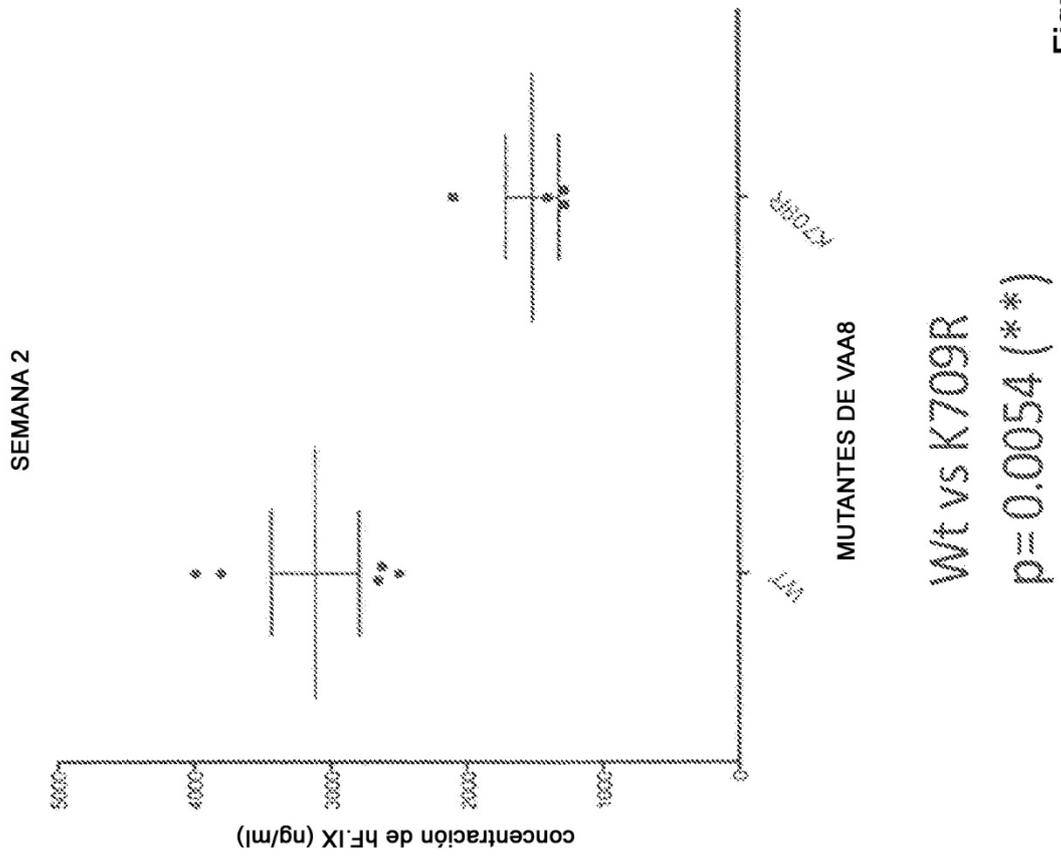
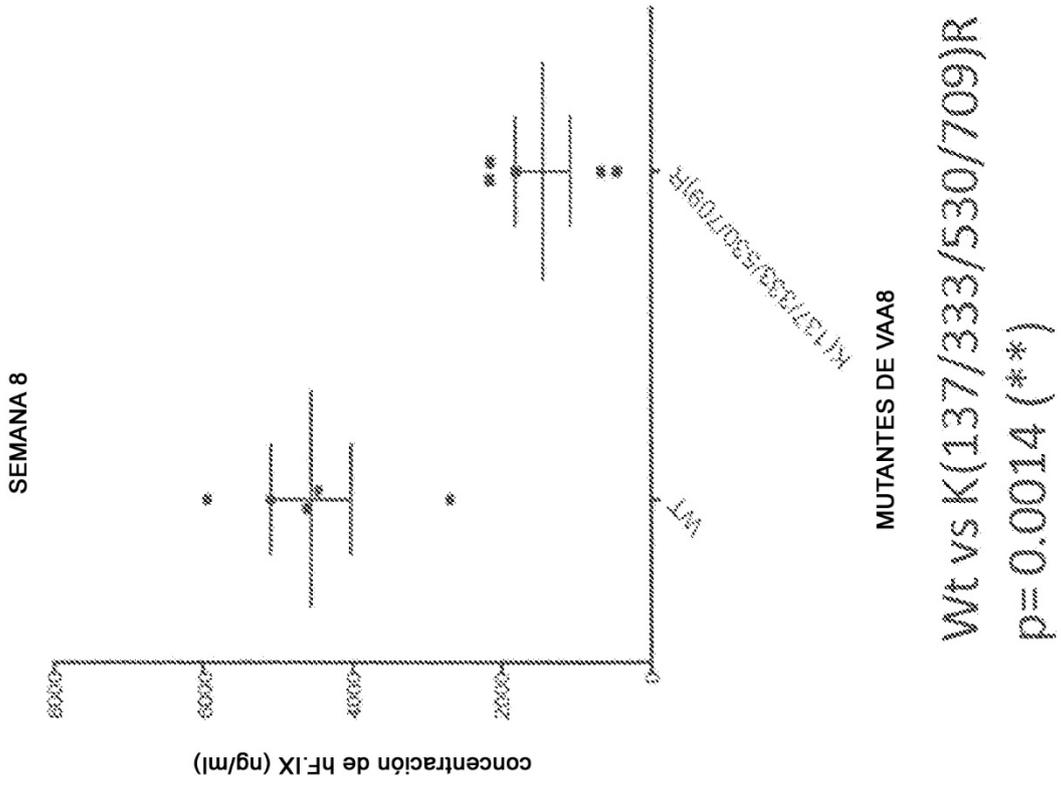
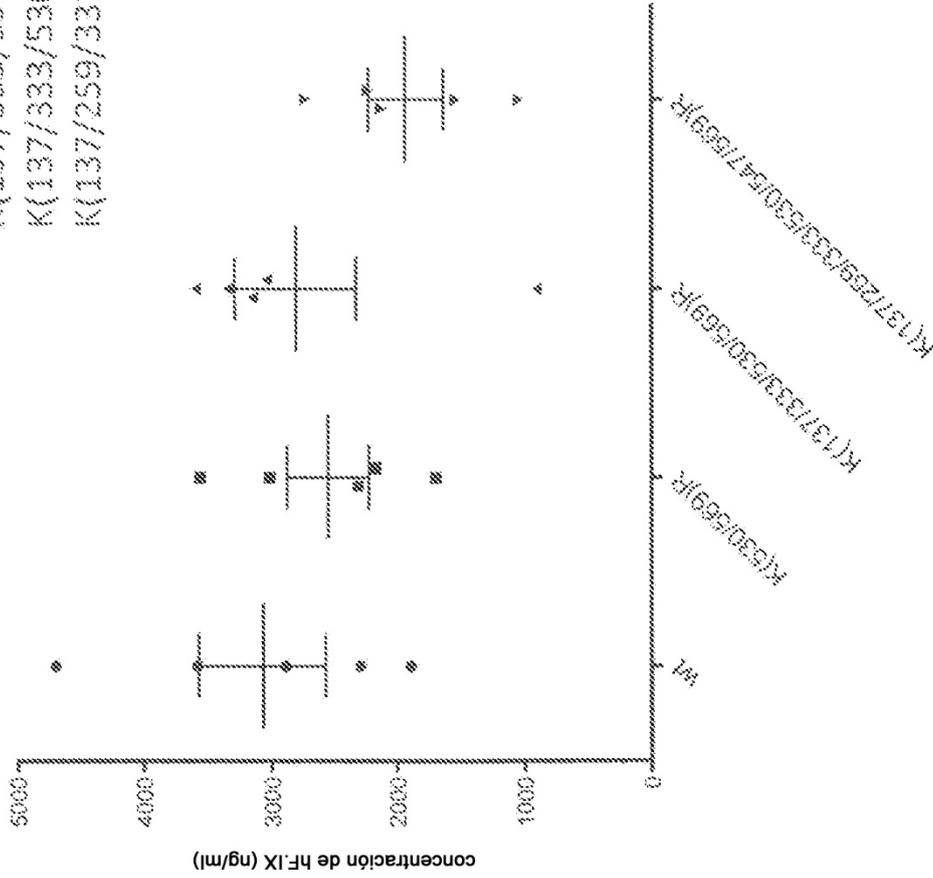


Figura 3B

valores de P para WT vs.
K(530/569)R=0.4090(NS)
K(137/333/530/569)R=0.7154 (NS)
K(137/333/530/569)R=0.7154 (NS)
K(137/259/333/530/547/569)R=0.0846 (NS)

8 semanas después de la inyección

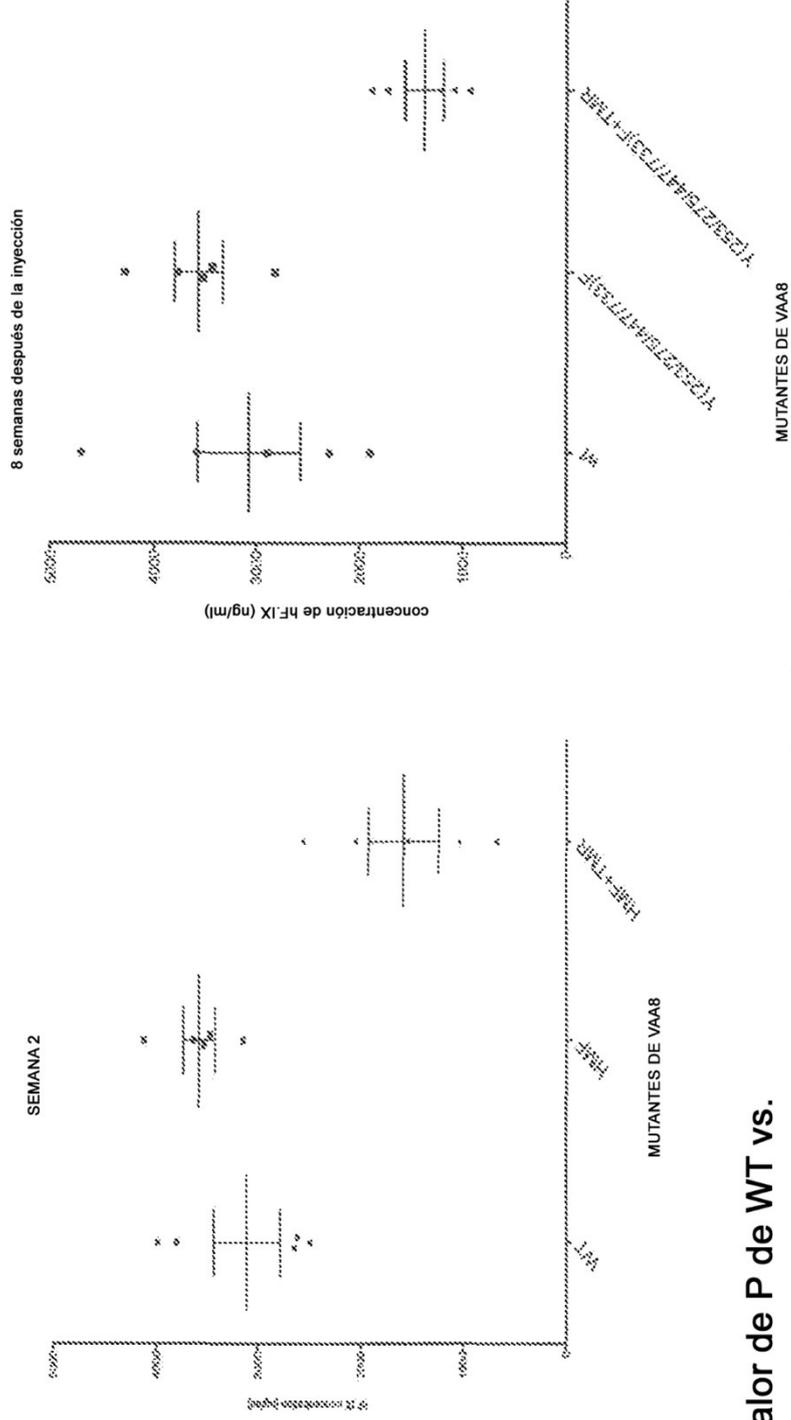


MUTANTES DE VAA8

Figura 3C

MDI: 2.5 E9/ ratón

La combinación de 6 o 4 mutantes de tirosina y 3 mutantes de lisina reduce el empaquetamiento y eficiencia de transducción del VAA8



valor de P de WT vs.

HMF= 0.2279

HMF+TMR=0.0116 (*)

TMR= K(137/333/530)R

HMF= Y(253/275/447/703/733)F

Figura 3D

Eliminación por CTL de hepatocitos HHL5-B7 transducidos con VAA-1 mutantes de lisina

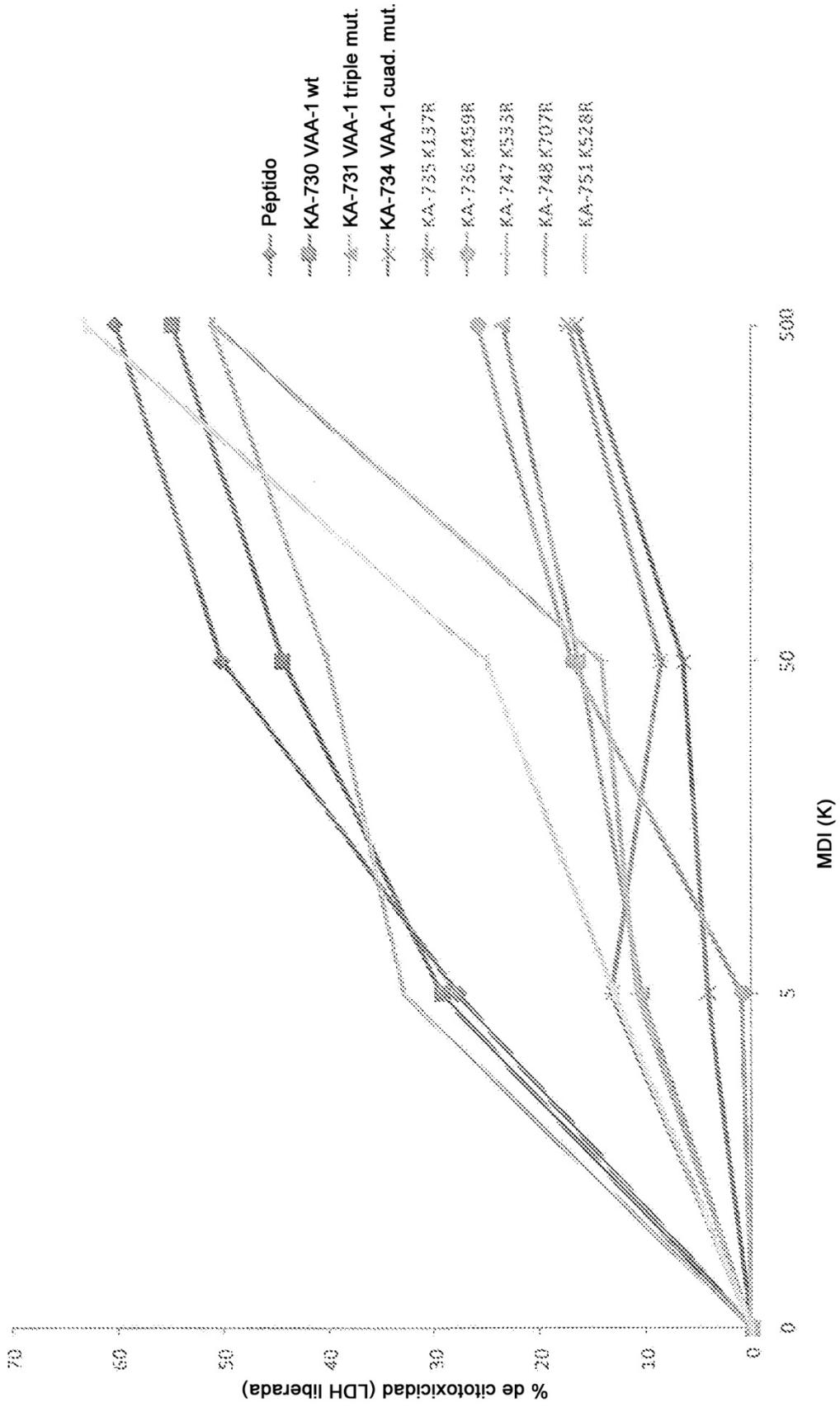


Figura 4A

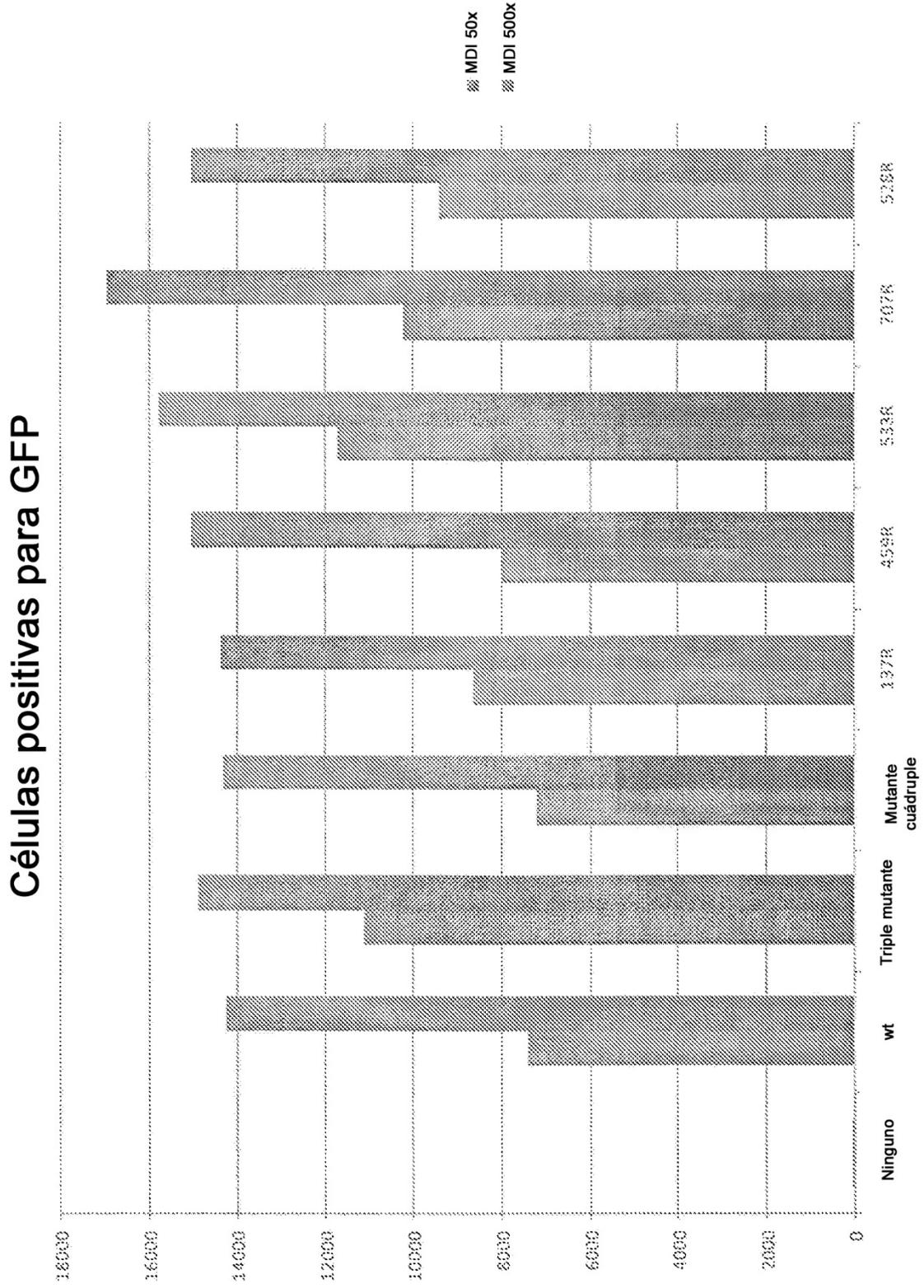
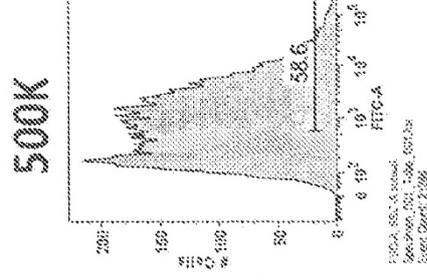
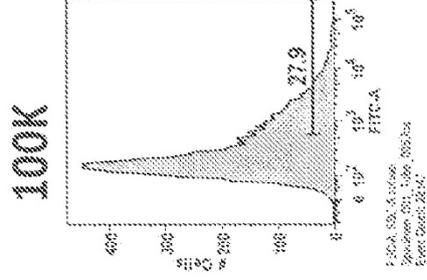
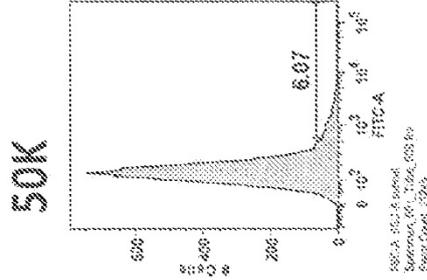
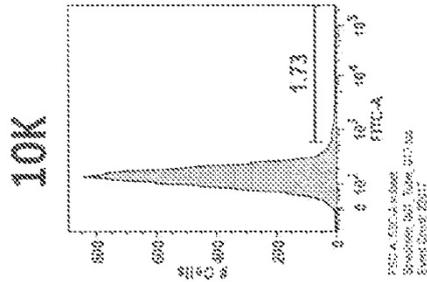
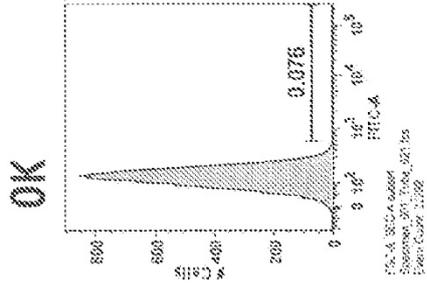
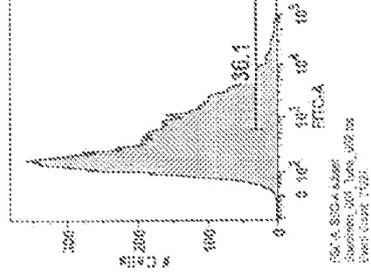
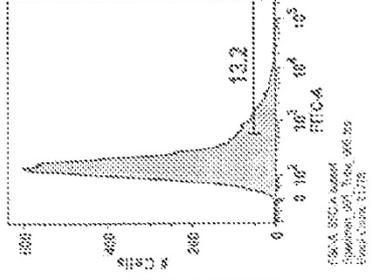
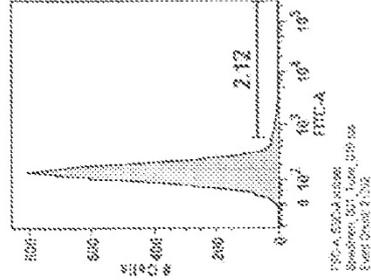
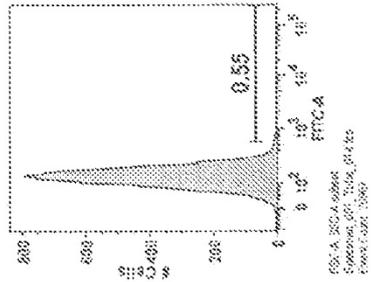


Figura 4B



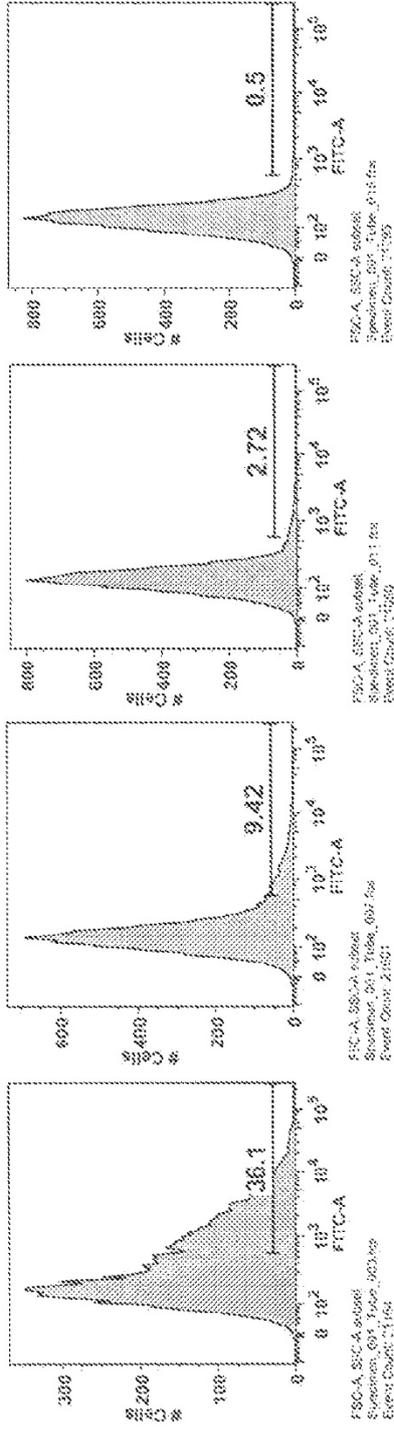
VAA2 K137R



VAA2 K532R

Figura 5A

VAA2 K527R



VAA2 WT

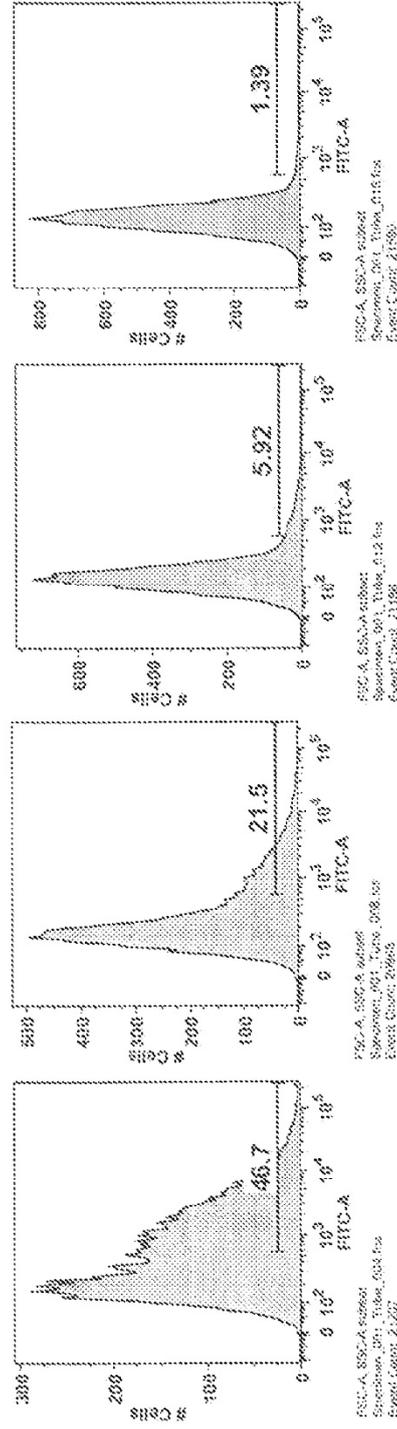


Figura 5A (continuación)

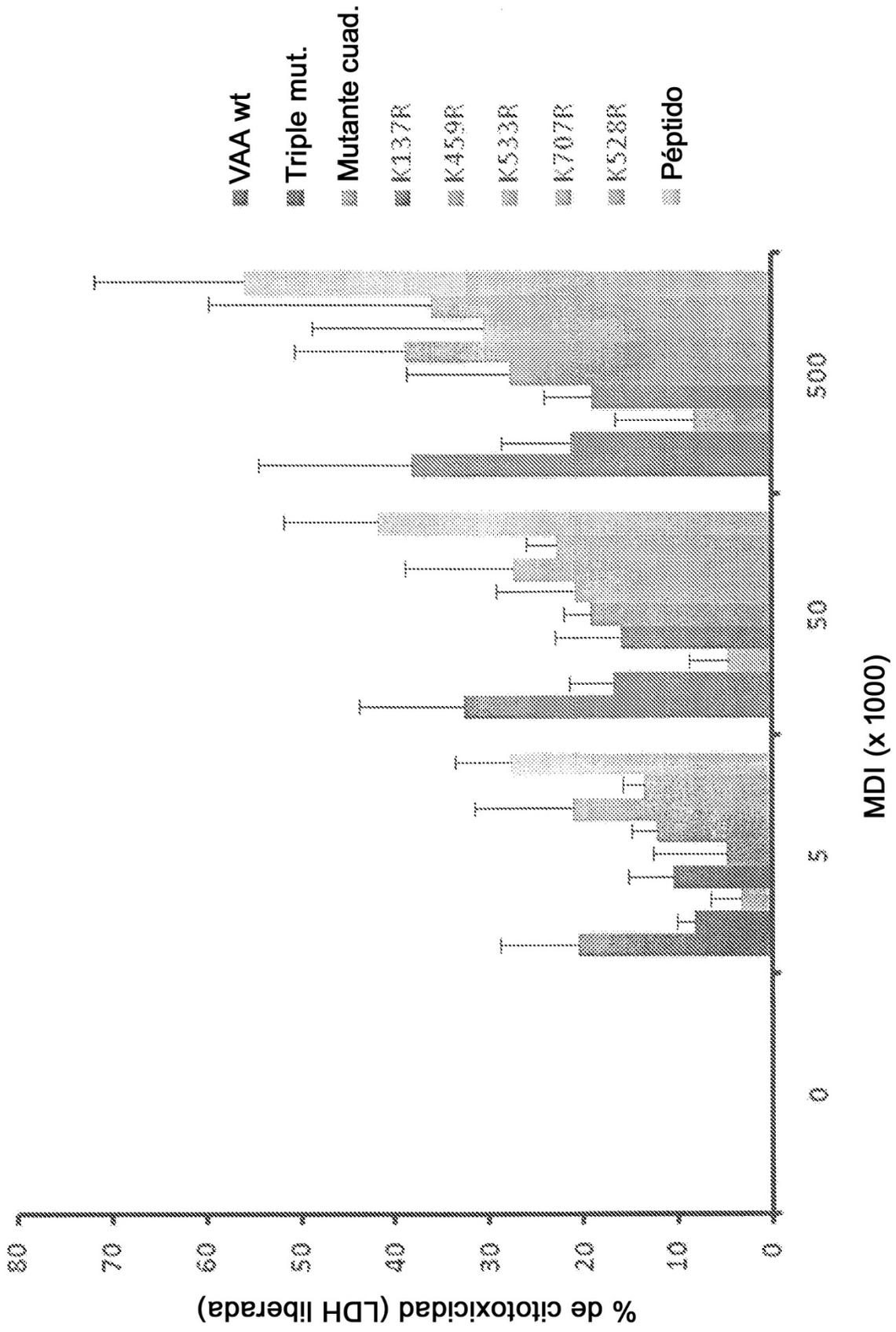


Figura 5B

Eliminación por CTL de hepatocitos HHL5-B7 transducidos por VAA-2 mutantes de lisina

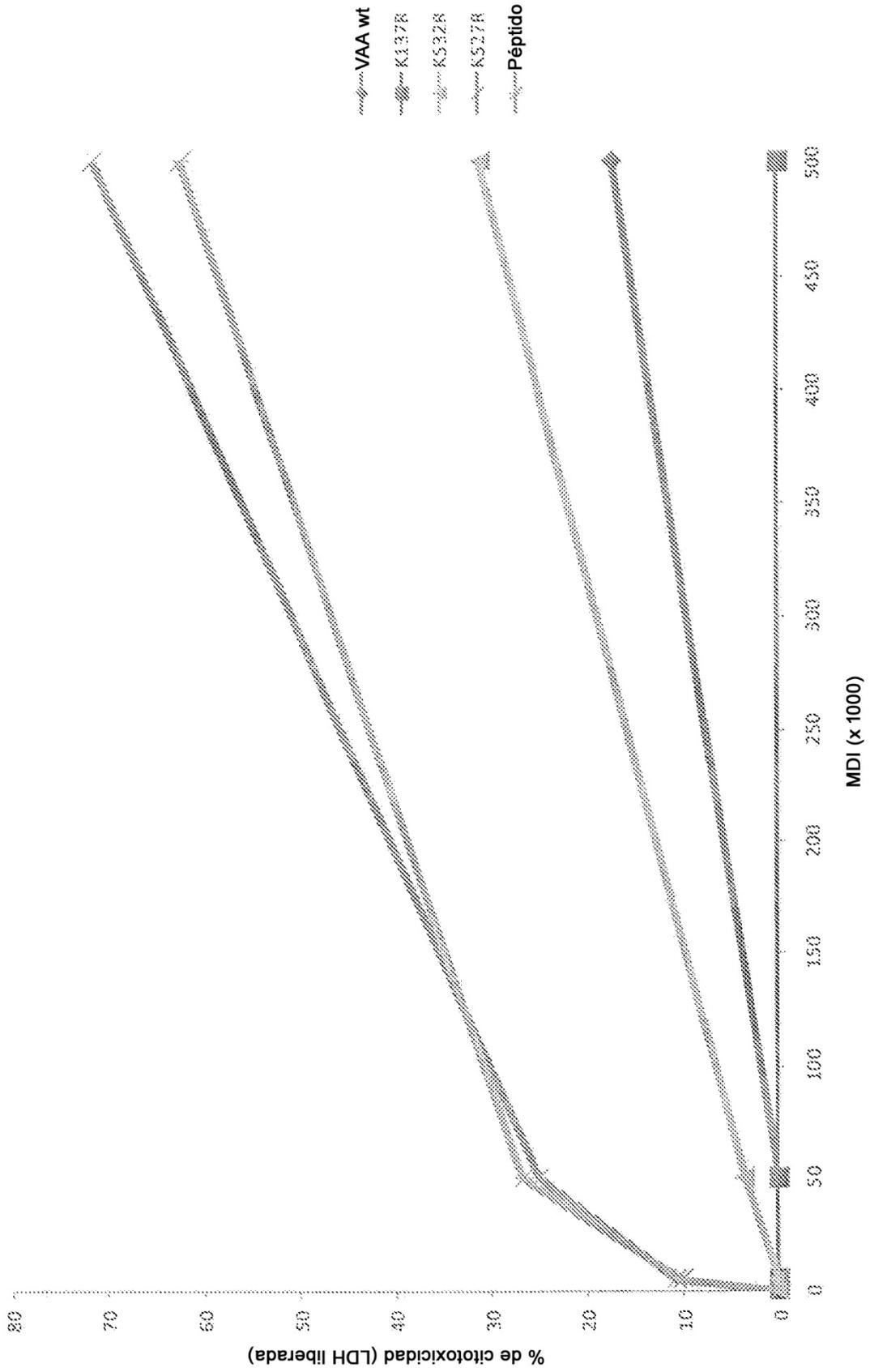


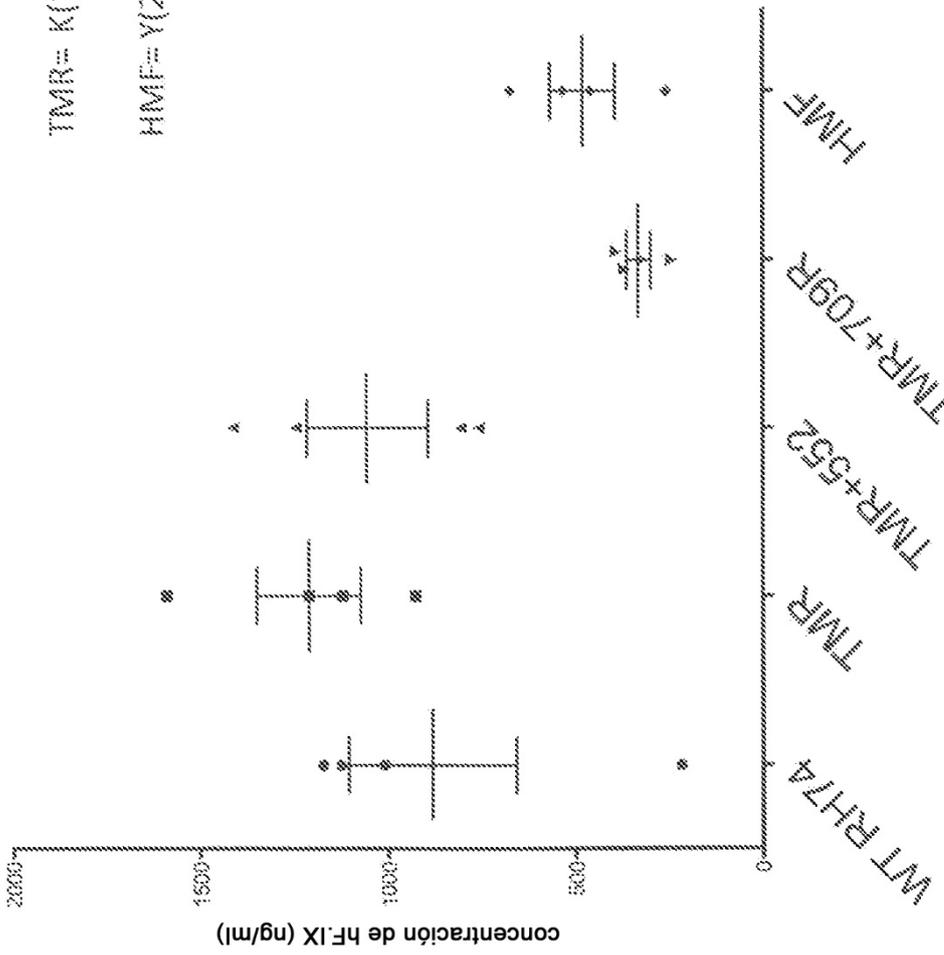
Figura 6

Rh74

dilución 1:100

TMR= K(137/333/530)R

HMF= Y(253/275/447/703/707/733)F



mutantes de RH74

Figura 7A

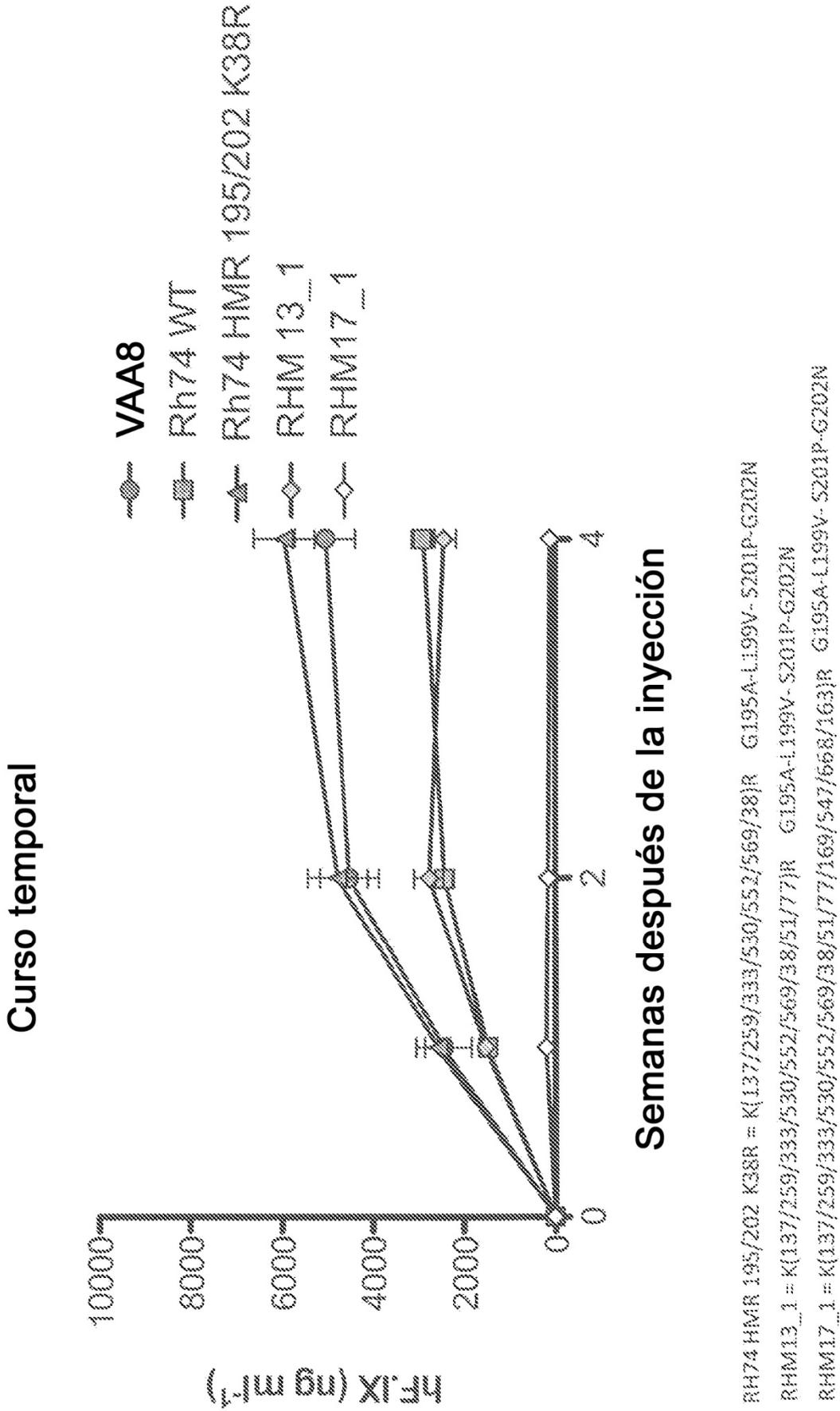


Figura 7C

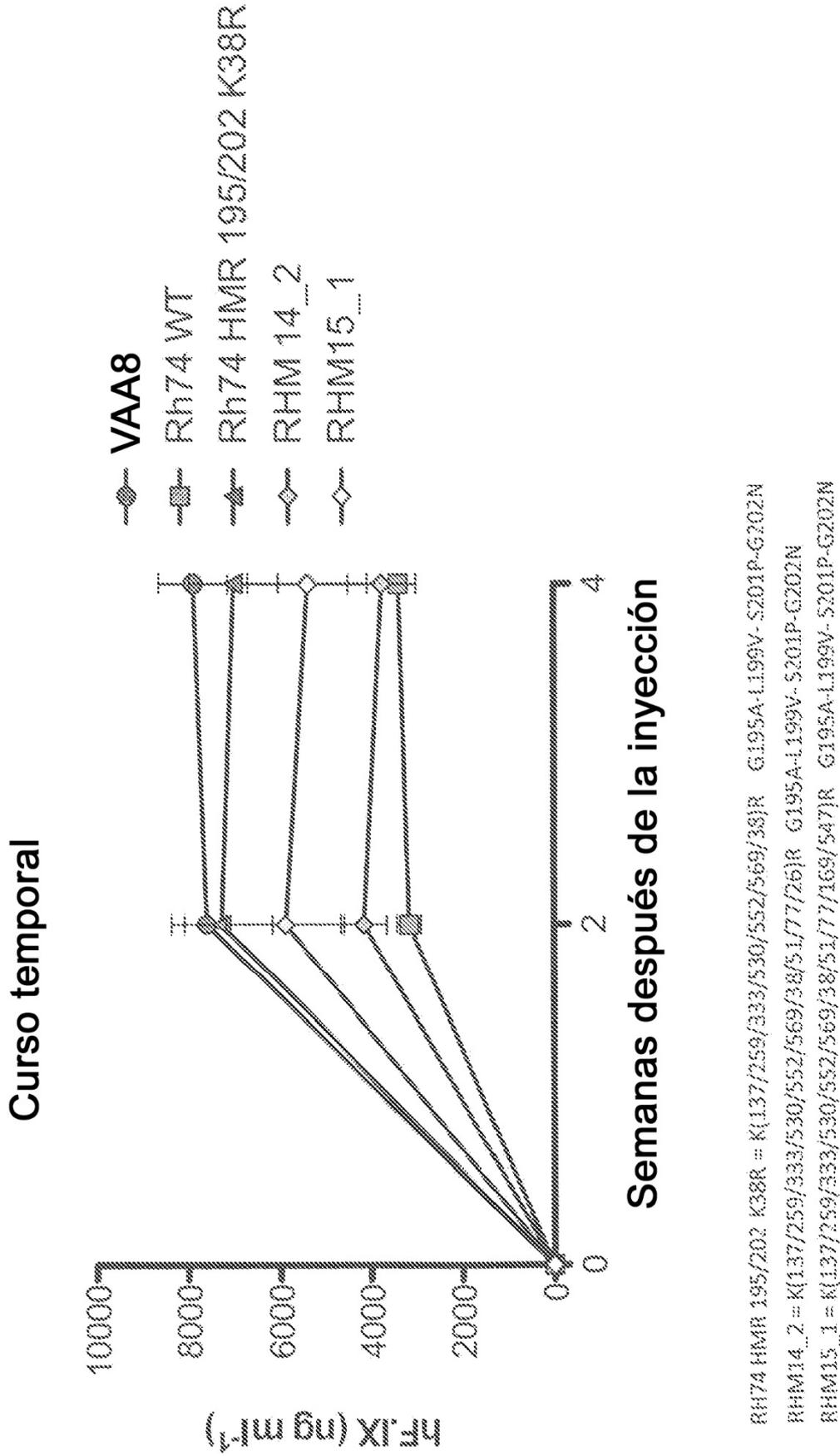


Figura 7D