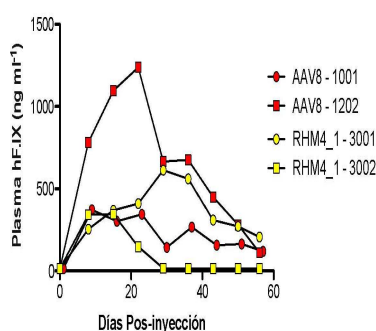


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

Figura 6



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
VARIANTE AAV Y COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS PARA TRANSFERENCIA DE GEN A CÉLULAS, ÓRGANOS Y TEJIDOS			
2	Datos del Solicitante / Titular		
Nombre:	THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:	34th Street and Civic Center Boulevard, Philadelphia, Pennsylvania 19104, Estados Unidos de América	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - PENNSYLVANIA - PHILADELPHIA
Identificación:			

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

1043928-

3

Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1. THE CHILDREN'S HOSPITAL OF
PHILADELPHIA

EE

1043928

4

Datos del Inventor

Nombre:

Katherine A. HIGH

**Dirección
Electrónica:**

clientes@cavelier.com

Dirección:

201 Greenway Lane,
Merion Station,
Pennsylvania 19066,
Estados Unidos de
América

**Domicilio/País de
constitución:**

ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA -
PENNSYLVANIA -
MERION STATION

Identificación:

☐ CEDULA DE
CIUDADANIA
☐ EMPRESA
EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE
EXTRANJERIA
☐ NIT
☒ No Aplica

Número:

-

5

Inventor(es)

Apellidos - Nombres

Domicilio

1. HIGH Katherine A.

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

2. YAZICIOGLU Mustafa N.

TURQUIA

3. ANGUELA Xavier

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6

Datos Inventor(es)

País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	MERION STATION	201 Greenway Lane, Merion Station, Pennsylvania 19066, Estados Unidos de América
2. TURQUIA	KOCAELI	CAYIROVA	Akse Mahallesi, Guzeltepe Konutlari, 450. Sok. A-3 blok D:7, Cayirova/Kocaeli, Turquia
3. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	PHILADELPHIA	Xavier; 1806 Montrose St., Philadelphia, PA 19146, Estados Unidos de América

7	Datos del Representante Legal / Apoderado		
Nombre:	JOSE ANDRES RINCON USCATEGUI	Dirección Electrónica:	clientes@cavelier.com
Dirección:	CARRERA. 4 No. 72-35	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 79780910-			

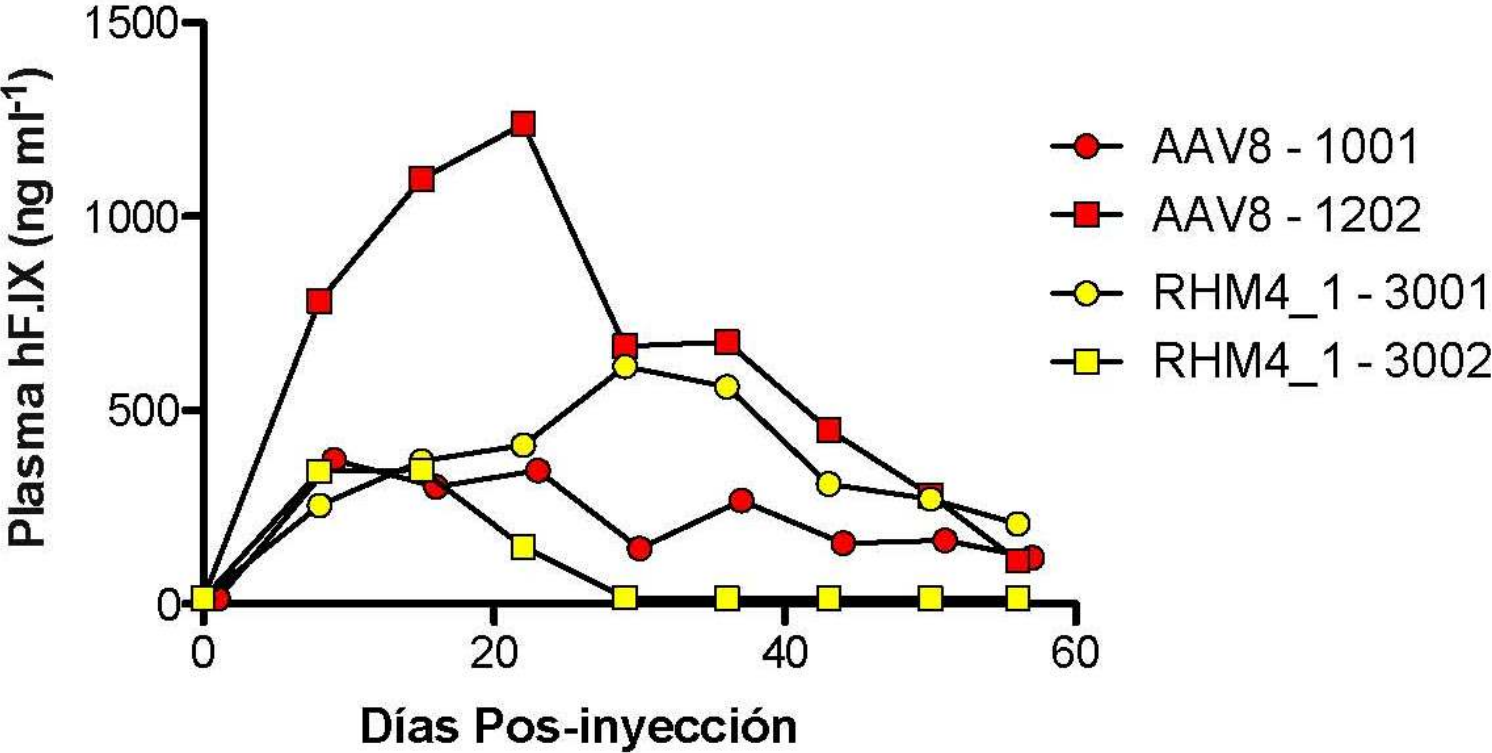
Presentación de Poder	
Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	Datos Solicitud: PCT / WO		
Número Solicitud:	PCT/US2014/047670	Fecha Solicitud:	22/07/2014
Número Publicacion:	WO 2015/013313 A3	Fecha Publicacion:	29/01/2015

9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO
---	----------------------------	--

	(33) País de origen	Código del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/857,161	22/07/2013
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/985,365	28/04/2014
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		56	Pago Reivindicaciones:	No
11	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
12	Documentos Anexos			
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos				

Figura 6



VARIANTE AAV Y COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS PARA TRANSFERENCIA DE GEN A CÉLULAS, ÓRGANOS Y TEJIDOS

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense No. 61/985,365, presentada el 28 de abril de 2014 y la Solicitud Provisional Estadounidense No. 61/857,161, presentada el 22 de julio de 2013, todas estas solicitudes se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Introducción

[0002] Los trastornos genéticos, causados por la ausencia o un defecto en un gen deseable (pérdida de función) o expresión de un gen no deseado o defectuoso o (ganancia de función) conducen a una variedad de enfermedades. Un ejemplo de trastorno genético de pérdida de función es la hemofilia, un trastorno hemorrágico hereditario causado por la deficiencia en el factor de coagulación VIII (FVIII, hemofilia A) o factor IX (FIX, hemofilia B). Un ejemplo de trastorno genético de ganancia de función es la enfermedad de Huntington, una enfermedad causada por un gen “HTT” patológico (codifica la proteína huntingtina) que codifica una proteína mutada que se acumula dentro y conduce a la destrucción gradual de neuronas, particularmente en los ganglios basales y la corteza cerebral.

[0003] El tratamiento actual para la hemofilia consiste en la administración intravenosa del factor de coagulación recombinante ya sea a pedido, en caso de que se presente sangrado, o profilácticamente. Sin embargo, este planteamiento terapéutico tiene varios inconvenientes tales como la necesidad de repetidas infusiones, el costo del tratamiento, el riesgo de desarrollar respuestas inmunes de factor antiterapéutico, y el riesgo de sangrados potencialmente fatales. Estas limitaciones han impulsado el desarrollo de terapias basadas en genes para la hemofilia. Para este fin, la hemofilia es ideal para la terapia basada en la transferencia de gen cuando 1) la ventana terapéutica es bien amplia, cuando los niveles justo sobre 1% de lo normal o normal ya puede dar como resultado un cambio del fenotipo de grave a moderado, y los niveles de 100% no están asociados con ninguno de los efectos secundarios; 2) la expresión específica del tejido del transgén terapéutico no se requiere estrictamente; y 3) hay una experiencia considerable en la medición de los puntos finales de la eficacia terapéutica. Además, se ha demostrado que la expresión hepática de factor de coagulación induce la tolerancia inmunológica al factor de coagulación en sí, reduciendo la probabilidad de respuestas inmunes potencialmente dañinas contra el factor de coagulación.

[0004] Actualmente, el los vectores de virus adeno-asociado (AAV) son reconocidos como los vectores de transferencia de gen de elección ya que tienen el mejor perfil de seguridad y eficacia para el suministro de genes *in vivo*. De los serotipos AAV aislados hasta el momento, se han usado AAV2 y AAV8 para tener como objetivo el hígado de humanos afectados por hemofilia B grave. Ambos vectores trabajaron eficientemente y en el caso de AAV8 se documentó la expresión a largo

plazo del transgén terapéutico. Datos recientes en humanos mostraron que tener como objetivo el hígado con un vector de AAV alcanza una expresión a largo plazo del transgén FIX a niveles terapéuticos.

[0005] Si bien estos datos son prometedores, la identificación de serotipos AAV con alta tropismo para el hígado y baja seroprevalencia en humanos (un huésped natural para el tipo natural AAV) es fundamental para 1) lograr niveles terapéuticos de la expresión del transgén en el hígado en dosis de vector más bajo posible para disminuir el riesgo de desencadenar respuestas inmunes anti-cápside AAV; y 2) los serotipos alternos de AAV con seroprevalencia única permitirán tratar a aquellas poblaciones de pacientes que lo contrario no son elegibles para la transferencia de gen AAV debido a la inmunidad humoral preexistente respecto a AAV. La invención se ocupa de estas necesidades y proporciona beneficios adicionales.

Resumen

[0006] [0006] La invención proporciona un vector AAV-Rh74 de serotipo de virus adeno-asociado (AAV), y vectores AAV relacionados y las partículas virales. Tales vectores incluyen AAV-Rh74 que tienen como objetivo las células de hepatocitos del hígado, entre otros tipos de células. Como un vector para el suministro de secuencia de polinucleótidos, los vectores AAV-Rh74 y los vectores AAV relacionados dirigen la expresión del polinucleótido en las células. Los polinucleótidos que codifican las proteínas, tales como proteínas para aplicaciones terapéuticas son capaces de ser expresado a niveles terapéuticos después de la administración.

[0007] Los vectores ejemplares AAV-Rh74 y los vectores AAV relacionados incluyen variantes AAV-Rh74. Las variantes de cápside particulares incluyen una secuencia de cápside Rh74 con una sustitución de aminoácido en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 o 202, de la secuencia de la cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO: 1). En aspectos particulares, los residuos corresponden a un aminoácido A, V, P o N en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 o 202 de la secuencia de la cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO: 1). En aspectos más particulares, la secuencia de la cápside tiene un residuo de A en la posición de aminoácido 195; un residuo V, en las posiciones de aminoácidos 199, un residuo P en la posición del aminoácido 201, o un residuo de N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de la cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO: 1). En aspectos más particulares, la secuencia de la cápside tiene cualquiera de dos, tres o los cuatro de los siguientes: un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V, en las posiciones de aminoácidos 199, un residuo P en la posición del aminoácido 201, o un residuo de N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de la cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO: 1).

[0008] Las partículas recombinantes AAV de la invención incluyen una secuencia de cápside de AAV de cualquier variante de cápside como RHM4-1 (SEQ ID NO: 5), RHM15-1 (SEQ ID NO: 6), RHM15-2 (SEQ ID NO: 7), RHM15-3 / RHM15-5 (SEQ ID NO: 8), RHM15-4 (SEQ ID NO: 9) o RHM15-6 (SEQ ID NO: 10). En modalidades particulares, una partícula recombinante AAV

encapsida o empaqueta un genoma de vector (por ejemplo, un vector viral tal como un genoma de vector AAV). Tales partículas recombinantes AAV de la invención incluyen un genoma de vector viral (por ejemplo, AAV) que también incluye una secuencia de polinucleótido heterólogo.

[0009] La transferencia de polinucleótido mediada por el vector AAV-Rh74 y el vector relacionado AAV produjo niveles de expresión de proteínas que fueron significativamente mayores que varios otros serotipos estudiados actualmente en entornos clínicos y preclínicos. En particular, el AAV-Rh74 tiene como objetivo a polinucleótidos al hígado con eficacia al menos comparable o superior al estándar de oro para la transducción de hígado, AAV8, tanto en ratones como en perros con hemofilia B. (Ver, por ejemplo, las Figuras 1 y 2). Las variantes AAV-Rh74 tales como, por ejemplo, polinucleótidos diana de la variante de cápside RHM4-1 (SEQ ID NO: 5) en el hígado con una eficiencia comparable o superior a AAV8 y superior a Rh74 AAV en ratones (ver, por ejemplo, la Figura 5). Además, los datos en primates no humanos muestran que las variantes AAV-Rh74 y AAV-Rh74 como RHM4-1 son aproximadamente dos veces más potente que el AAV8 en la mediación de expresión derivado de hígado de hFIX (ver, por ejemplo, las Figuras 4 y 6).

[0010] De este modo, las variantes AAV-Rh74 y AAV-Rh74 tales como las variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1) se pueden usar para suministrar polinucleótidos, tales como secuencias de codificación de gen, para expresar proteínas que proporcionan un beneficio deseable o terapéutico, así como para los nucleótidos inhibidores que reducen o inhiben la expresión de un gen no deseable o defectuoso, tratando de este modo una variedad de enfermedades. Por ejemplo, se pueden usar las variantes de cápside AAV-Rh74 y AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1) como vectores para suministrar a las células, tejidos y órganos, tales como genes terapéuticos hepáticos (por ejemplo, FIX, FVIII) para tratar la hemofilia A, B, etc. Tales vectores de la variante de cápside AAV-Rh74 y AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1) se pueden usar también para suministrar genes para una amplia gama de otras deficiencias metabólicas metabólicos o de proteína plasmática, o para otros fines terapéuticos, tales como, pero no limitados a genes que codifican nucleasas de dedos de zinc para llevar a cabo la edición de genoma en el hígado, y para el suministro local (hígado) de agentes inmunomoduladores tales como alfa-interferón para el tratamiento de infecciones por el virus de la hepatitis, o para tratar virtualmente cualquier enfermedad que requiere ya sea la transducción de hígado o presencia del producto transgénico terapéutico en el torrente sanguíneo (que se puede lograr teniendo como objetivo los transgenes para la expresión hepática).

[0011] Además del suministro eficiente de los polinucleótidos mediante vectores AAV-Rh74 y AAV relacionados, tales como las variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1) en células *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, la prevalencia de anticuerpos anti-AAV-Rh74 en los seres humanos es menor que los anticuerpos anti-AAV2, y difiere de la de los anticuerpos anti-AAV8 (Tabla 1). Debido a la baja seroprevalencia, los vectores AAV-Rh74 y AAV relacionados tales como variantes (cápside) AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1) se pueden usar en

un porcentaje mayor de los seres humanos que de otra manera no serían elegibles para la transferencia de genes, por ejemplo, los seres humanos que pueden ser sero-positivo para otros serotipos de AAV (por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV 7, AAV8, AAV9, AAV 10, AAV 11, etc.). Además, los vectores AAV-Rh74 y los relacionados, tales como las variantes AAV-Rh74 que incluyen variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1) se puede producir de forma eficiente a títulos altos (Tabla 2). De este modo, los vectores AAV-Rh74 y los AAV relacionados se pueden producir en grandes cantidades para las enfermedades clínicas más prevalentes.

[0012] De acuerdo con la invención, se proporcionan vectores recombinantes AAV-Rh74 y vectores AAV relacionados, tales como variantes AAV-Rh74 tales como partículas de variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1) que incluyen genomas de vector AAV (encapsidado, paquete). En una modalidad, un vector recombinante AAV incluye una secuencia de polinucleótido heterólogo. En otra modalidad, un genoma del vector recombinante AAV se encapsida o empaqueta mediante una cápside de AAV-Rh74 o una AAV relacionada tales como las variantes AAV-Rh74 tal como una variante de cápside (por ejemplo, RHM4-1).

[0013] En los vectores recombinantes AAV de la invención, tales como los vectores AAV-Rh74 y vectores AAV relacionados, tales como partículas de variantes (cápside) AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1) que incluyen genomas de vectores recombinantes AAV (encapsidado, paquete), la secuencia de polinucleótido heterólogo puede ser transcrito y, posteriormente, traducido a una proteína. Alternativamente, el polinucleótido heterólogo puede ser transcrito en una transcripción que en sí misma tiene una función o actividad (por ejemplo, como un ácido nucleico inhibidor).

[0014] En varios aspectos, la secuencia de polinucleótido heterólogo codifica una proteína terapéutica. En aspectos particulares, la proteína es un factor de coagulación de la sangre (por ejemplo, Factor XIII, Factor IX, Factor X, Factor VIII, Factor VIIa, o proteína C), CFTR (proteína reguladora de la membrana de fibrosis quística), un anticuerpo, proteína de epitelio específico de pigmento de la retina 65 kDa (RPE65), eritropoyetina, receptor de LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, la adenosina deaminasa (ADA), un transportador de metal (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en la enfermedad de almacenamiento lisosomal (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento (por ejemplo, factores 1 y 2 de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento α y β de transformación, etc.), una citoquina (por ejemplo, α interferón, β -interferón, γ -interferón, interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, linfoxina, etc.), un

producto de gen suicida (por ejemplo, virus herpes simplex timidina quinasa, citosina desaminasa , toxina de la difteria, citocromo P450, desoxicitidina quinasa, factor de necrosis tumoral, etc.), una proteína de resistencia a los medicamentos (por ejemplo, que proporciona resistencia a un fármaco usado en la terapia del cáncer), una proteína supresora de tumores (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), poliposis adenomatosa coli (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un péptido tolerogénico o inmunogénico o proteína Tregitopes o hCDR1, insulina, glucoquinasa, guanilato ciclasa 2D (LCA-GUCY2D), proteína Rab escolta 1 (Choroideremia), LCA 5 (LCA-Lebercilin), aminotransferasa cetoácido ornitina (Gyrate Atrophy), Retinoschisin 1 (X-ligado Retinosquiosis), USH1C (de síndrome de Usher 1C), GTPase pigmentosa retinitis X-ligado (XLRP) , (formas de AR de RP: retinitis pigmentosa) MERTK, DFNB1 (Connexin 26 sordera), ACHM 2, 3 y 4 (Acromatopsia), PKD-1 o PKD-2 (enfermedad del riñón poliquístico), TPP1, CLN2, deficiencia del gen causal de enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, sulfatasas, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP, NPC1, VPC2, proteínas activadoras de esfingolípidos, etc.), uno o más nucleasas de dedos de zinc para la edición de genoma, o secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma.

[0015] En aspectos adicionales, la secuencia de polinucleótido heterólogo codifica una proteína terapéutica que a su vez inhibe la expresión o función de una proteína no deseada o aberrante (disfuncional) presente (endógena) en un sujeto. En otros aspectos, la secuencia de polinucleótido heterólogo es un polinucleótido que, cuando se transcribe, se transcribe en un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, ARN inhibidor). En aspectos más particulares, un ácido nucleico inhibidor es una secuencia de cadena sencilla, o forma una secuencia de doble o de triple cadena. En aspectos más particulares adicionales, un ácido nucleico inhibidor es un micro-ARN (miARN), siARN, shARN, ARN trans-empalme, el ARN antisentido o ARN que forma un triple.

[0016] En aspectos más particulares más, un ácido nucleico inhibidor inhibe la expresión de: gen de huntingtina (HTT), un gen asociado con la atrofia dentatorubropallidolusian (por ejemplo, atrofina 1, ATN1); receptor de andrógenos en el cromosoma X en la atrofia muscular espinobulbar, la proteína Ataxina-1, -2, -3, y -7, Cav2.1 P / Q canal de calcio dependiente de la tensión se codifica mediante el (CACNA1A), proteína de unión a TATA, hebra opuesta Ataxina 8, también conocido como ATXN8OS, serina/-treonina proteína fosfatasa 2A 55 kDa subunidad reguladora B beta isoforma en la ataxia espinocerebelosa (tipo 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 17), *FMR1* (retraso mental X frágil 1) en el síndrome de X frágil, *FMR1* (retraso mental X frágil 1) en el síndrome de temblor / ataxia X-asociado frágil, *FMR1* (retraso mental 2X frágil) o AF4 / FMR2 miembro de la familia 2 en retraso mental XE frágil; Miotonina-proteína quinasa (MT-PK) en la distrofia miotónica; la frataxina en la ataxia de Friedreich; un mutante de un gen superóxido dismutasa 1 (SOD1) en la esclerosis lateral amiotrófica; un gen implicado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y / o la enfermedad de Alzheimer; apolipoproteína B (APOB) y convertasa subtilisina proproteína / Kexin tipo 9

(PCSK9), hipercolesterolemia; Tat del VIH, virus de la inmunodeficiencia humana transactivador del gen de transcripción, en la infección por el VIH; TAR VIH, TAR VIH, el gen del elemento de respuesta del virus transactivador del virus de la inmunodeficiencia humana, en la infección por el VIH; receptor de quimiocinas C-C (CCR5) en la infección por el VIH; proteína de la nucleocápside del virus del sarcoma de Rous (RSV) en la infección por VRS, microARN específico de hígado (miR-122) en la infección por el virus de la hepatitis C; p53, lesión renal aguda o trasplante de riñón con función retardada del injerto o insuficiencia renal aguda con lesión renal; proteína quinasa N3 (PKN3) en malignidades recurrentes adelantadas o de tumores sólidos metastásicos; LMP2, LMP2 también conocido como la subunidad proteasoma tipo beta 9 (PSMB 9), el melanoma metastásico; LMP7, también conocido como la subunidad del proteasoma de tipo beta 8 (PSMB 8), melanoma metastásico; MECL1 también conocido como la subunidad proteasoma tipo beta 10 (PSMB 10), el melanoma metastásico; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los tumores sólidos; proteína kinesin husillo en tumores sólidos, supresor de la apoptosis de las células B de CLL / linfoma (BCL-2) en la leucemia mieloide crónica; reductasa ribonucleótida M2 (RRM2) en tumores sólidos; furina en tumores sólidos; quinasa similar a polo 1 (Plk1) en tumores hepáticos, diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) en la infección por hepatitis C, beta-catenina en la poliposis adenomatosa familiar; receptor adrenérgico beta 2, glaucoma; RTP801 / REDD1 también conocida como proteína transcripción 4-inducible daños DAN, en edema macular diabético (DME) o degeneración macular relacionada con la edad; receptor de factor de crecimiento vascular endotelial I (VEGFR1) en la degeneración macular relacionada con la edad o neivascularization coroidea, caspasa 2 en la neuropatía óptica isquémica no arterítica; proteína mutante de queratina 6A N17K en paquioniquia congénita; genoma del virus de la gripe A/ secuencias de genes en la infección por influenza; síndrome respiratorio agudo severo (SARS) del genoma del coronavirus / secuencias de genes en la infección por SARS; genoma del virus sincicial respiratorio / secuencias de genes en la infección por el virus sincicial respiratorio; genoma de filovirus ébola / secuencia de genes en la infección por ébola; genoma del virus de la hepatitis B y C / secuencias de genes en la infección por hepatitis B y C; genoma del virus del herpes simplex (HSV) / secuencias de genes en la infección por HSV, genoma del virus Cocksackie B3 / secuencias de genes en la infección por virus coxsackie B3; silenciamiento de un alelo patogénico de un gen (silenciamiento específico de alelo) como torsina A (TOR1A) en la distonía primaria, clase pan I y HLA-alelo específico en el trasplante; gen de la rodopsina mutante (RHO) en la retinosis pigmentaria autosómica dominante heredado (adRP); o el ácido nucleico inhibidor se une a una transcripción de cualquiera de los genes o secuencias anteriores.

[0017] Los vectores recombinantes AAV y los vectores AAV-Rh74 y los vectores AAV relacionados de la invención tales como variantes de vectores AAV-Rh74 como partículas de las variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1) que incluyen un genoma de vector recombinante AAV

(encapsidado, paquete) incluyen elementos adicionales que funcionan en cis o en trans. En modalidades particulares, un vector viral recombinante (por ejemplo, AAV) y / o vector AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados tales como partículas de variantes (cáspide) AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1) que incluye un genoma de vector recombinante AAV (encapsidado, paquete) también tiene: una o más secuencias de repetición terminal invertida (ITR) que flanquean el terminal 5' o 3' de la secuencia de polinucleótido heterólogo; una secuencia de control de expresión que dirige la transcripción de la secuencia de polinucleótido heterólogo (por ejemplo, un promotor o potenciador que contribuye a la transcripción de la secuencia de polinucleótido heterólogo, tal como un elemento de control constitutivo o regulable, o elemento de control de expresión de tejido específico); una secuencia de poli-adenina localizado 3' de la secuencia de polinucleótido heterólogo; un marcador seleccionable (por ejemplo, una proteína que proporciona resistencia a los antibióticos, tales como resistencia a la kanamicina); y / o un origen de replicación.

[0018] Los vectores recombinantes AAV y los vectores AAV-Rh74 y los vectores AAV relacionados de la invención tales como las variantes AAV-Rh74 que incluyen partículas de la variante de cáspide (por ejemplo, RHM4-1) que incluyen un genoma del vector recombinante AAV (encapsidado, paquete) también puede incluir elementos adicionales. En una modalidad, un genoma de vector recombinante incluye una secuencia de polinucleótido heterólogo y una secuencia de polinucleótidos de relleno o embutidora. En aspectos particulares, una secuencia de polinucleótido heterólogo tiene una longitud de menos de aproximadamente 4,7 Kb. En otros aspectos particulares, una secuencia de polinucleótido heterólogo tiene una longitud de menos de 4,7 Kb y se coloca dentro de dos secuencias ITR de virus adeno-asociado (AAV). En aspectos particulares adicionales, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora que tiene una longitud que cuando se combina con la secuencia de polinucleótido heterólogo la longitud combinada total de la secuencia de polinucleótido heterólogo y la secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora está entre aproximadamente 3.0-5.5Kb, o entre aproximadamente 4.0- 5.0Kb, o entre aproximadamente 4.3-4.8Kb.

[0019] Las secuencias de polinucleótidos de relleno o embutidoras pueden ser localizadas en la secuencia del vector en cualquier posición deseada de tal manera que no impide una función o actividad del vector. En un aspecto, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora no está colocada entre un ITR 5' y / o 3' que flanquea los respectivos términos 5' y / o 3' de una secuencia de polinucleótido heterólogo. En otro aspecto, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora se coloca dentro de un ITR 5' y / o 3' que flanquea los respectivos términos 5' y / o 3' de una secuencia de polinucleótido heterólogo. En un aspecto adicional, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora se coloca adyacente a ITR 5' y / o 3' que flanquea los respectivos términos 5' y / o 3' de una secuencia de polinucleótido heterólogo. En un aspecto adicional, una secuencia de

polinucleótido de relleno o embutidora se coloca dentro de una secuencia de polinucleótido heterólogo, por ejemplo, análogo a un intrón dentro de un ácido nucleico genómico.

[0020] En consecuencia, en diversas modalidades, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora se coloca adyacente a una secuencia ITR AAV; posicionado dentro de las dos secuencias ITR de virus adeno-asociados (AAV); situado en el exterior de las secuencias ITR de virus adeno-asociado (AAV); o hay dos secuencias de polinucleótidos de relleno o embutidora, una primera secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora posicionada dentro de las dos secuencias ITR de virus adeno-asociado (AAV), y una segunda secuencia de polinucleótidos de relleno o embutidora colocada fuera de las secuencias ITR de virus adeno-asociado (AAV) .

[0021] En aspectos más particulares, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora que tiene una longitud total que cuando se combina con dicha secuencia de polinucleótido heterólogo la longitud total combinada de la secuencia de polinucleótido heterólogo y la secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora está entre aproximadamente 3.0-5.5Kb, entre aproximadamente 4.0-5.0Kb, o entre aproximadamente 4.3-4.8Kb, cuando se coloca dentro de las dos secuencias ITR de virus adeno-asociado (AAV). En otros aspectos más particulares, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora tiene una longitud mayor que 4.7Kb, entre aproximadamente 5.0-10.0Kb, o entre aproximadamente 6.0-8.0Kb, cuando se encuentra fuera de las dos secuencias ITR del virus adeno-asociado (AAV).

[0022] En varios aspectos adicionales, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora es una secuencia entre aproximadamente 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1,000, 1,000-1,500, 1,500-2,000, 2,000-2,500, 2,500-3,000, 3,000-3,500, 3,500-4,000, 4,000-4,500, 4,500-5,000, 5,500-6,000, 6,000-7,000, 7,000-8,000, o 8,000-9,000 nucleótidos de longitud.

[0023] Típicamente, una secuencia de polinucleótidos de relleno o embutidora es inerte o inocua y no tiene ninguna función o actividad. En diversos aspectos particulares, una secuencia de polinucleótidos de relleno o embutidora no es una secuencia de polinucleótidos bacteriana, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora no es una secuencia que codifica una proteína o péptido, una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora es una secuencia distinta de cualquiera de: la secuencia de polinucleótido heterólogo, una secuencia AAV de repetición terminal invertido (ITR), un elemento de control de expresión, un origen de replicación, un marcador seleccionable o una secuencia poli-adenina (poli-A).

[0024] En varios aspectos particulares adicionales, una secuencia de polinucleótidos de relleno o embutidora es una secuencia de intrón que se relaciona con o sin relación con la secuencia de polinucleótido heterólogo. En aspectos particulares, la secuencia de intrón se coloca dentro de la secuencia de polinucleótido heterólogo. En otros aspectos particulares, la secuencia de intrón se relaciona con la secuencia de polinucleótido heterólogo ya que el intrón está en el ADN genómico,

tal como el ADN genómico que codifica una proteína cuya proteína también está codificada por la secuencia de polinucleótido heterólogo.

[0025] Los vectores recombinantes AAV y AAV-Rh74 y los vectores AAV relacionados de la invención tales como las variantes AAV-Rh74 como partículas de la variante de cápside (por ejemplo, RHM4-1) que incluyen un genoma del vector recombinante AAV (encapsidado, paquete) se puede incluir dentro de las células. En tales modalidades, las células pueden comprender células auxiliares lisadas para producir partículas de virus (AAV) (por ejemplo, vectores AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados, tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1)), o las células diana en la que se desea expresar la secuencia de polinucleótido heterólogo.

[0026] Los vectores recombinantes AAV y los vectores AAV-Rh74 y los vectores AAV relacionados de la invención tales como partículas de las variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1) que incluyen genoma del vector recombinante AAV (encapsidado, paquete) puede ser incluido dentro composiciones farmacéuticas. Tales composiciones son útiles para la administración del vector recombinante (por ejemplo, AAV) y partículas de virus tales como vectores AAV-Rh74 y vectores AAV relacionados, tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1) que incluyen genomas del vector recombinante (encapsidado, el paquete) (por ejemplo, AAV) a un sujeto.

[0027] Los vectores recombinantes AAV y los vectores AAV-Rh74 y los vectores AAV relacionados de la invención, tales como partículas de variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1) que incluyen un genoma de vector recombinante AAV (encapsidado, paquete) se puede usar en diversos métodos y usos. Por consiguiente, se proporcionan métodos y usos para el suministro o la transferencia de una secuencia de polinucleótido heterólogo en un organismo o célula, tal como un mamífero o una célula de un mamífero.

[0028] En una realización, un método o uso incluye la administración de un vector de virus adeno-asociado (AAV) que incluye una secuencia de polinucleótido heterólogo (por ejemplo, vía un vector AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como una partícula de variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside tales como RHM4-1)) que incluye el genoma de vector (encapsidado, paquete) a un mamífero o una célula de un mamífero bajo condiciones adecuadas para suministrar o transferir la secuencia de polinucleótido heterólogo en el mamífero o la célula de un mamífero. En un aspecto, el método o uso permite realizar una transferencia / suministro del polinucleótido heterólogo en el mamífero y / o la célula. En otro aspecto, el método permite la transferencia / suministro del polinucleótido heterólogo en el mamífero y / o la célula, y la posterior transcripción del polinucleótido heterólogo que forma de este modo una transcripción. En un aspecto adicional, el método permite la transferencia / suministro del polinucleótido heterólogo en la célula, la transcripción posterior para formar una transcripción y traducción subsiguiente para formar un producto génico (proteína). En particular, por ejemplo, en los dos últimos aspectos una secuencia de

polinucleótido heterólogo está unida operativamente a un elemento de control de expresión que confiere la transcripción de la secuencia de polinucleótido heterólogo, y opcionalmente la posterior traducción de la transcripción.

[0029] En modalidades adicionales, un método o uso es para el suministro o transferencia de una secuencia de polinucleótido heterólogo en un sujeto (por ejemplo, mamífero) o una célula de un sujeto (por ejemplo, mamífero), e incluye la administración de un virus (por ejemplo, AAV- Rh74 o AAV relacionados tales como una partícula de las variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1)), una pluralidad de tales partículas virales (por ejemplo, AAV), o una composición farmacéutica de dicha partícula viral (por ejemplo, AAV-Rh74 tal o AAV relacionado tales como una partícula de las variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1)) o una pluralidad de dichas partículas virales (por ejemplo, AAV) a un sujeto (por ejemplo, mamífero) o una célula del sujeto (por ejemplo, mamífero), ofreciendo o transfiriendo de esta forma una secuencia de polinucleótido heterólogo en el sujeto (por ejemplo, mamífero) o células del sujeto (por ejemplo, mamífero). En otra modalidad, un método o uso es para tratar a un sujeto (por ejemplo, mamífero) deficiente o en necesidad de la expresión o función de la proteína, o en necesidad de la reducción de expresión o función de una proteína endógena (por ejemplo, una proteína no deseada, aberrante o disfuncional), que incluye proporcionar una partícula viral (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionados tales como las partículas de las variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)), una pluralidad de dichas partículas virales (por ejemplo, AAV), o una composición farmacéutica de una partícula viral (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionados tales como las partículas de las variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)) o pluralidad de dichas partículas virales (por ejemplo, AAV); y administrar las partículas virales (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionada, como las partículas de variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)), una pluralidad de dichas partículas virales (por ejemplo, AAV), o una composición farmacéutica de partículas virales (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)) o una pluralidad de dichas partículas virales (por ejemplo, AAV) al sujeto (por ejemplo, mamífero), donde la secuencia de polinucleótido heterólogo se expresa en el mamífero, o donde la secuencia de polinucleótido heterólogo codifica una secuencia inhibidora o proteína que reduce la expresión o función de una proteína endógena (por ejemplo, una proteína no deseable, aberrante o disfuncional) en el sujeto (por ejemplo, mamífero).

[0030] Los métodos y usos para la administración o suministro incluyen cualquier modo compatible con un sujeto. En modalidades particulares, una partícula viral (AAV por ejemplo, AAV-Rh74 o relacionados, como una partícula de la variante de la cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1)) o una pluralidad de dichas partículas (por ejemplo, AAV) (por ejemplo, vectores AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados, tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo,

RHM4-1)) se administra por vía intravenosa, o interarterial, intramuscular, subcutánea, oral, vía intubación, a través de catéter, por vía dérmica, intra-craneal, vía inhalación, intra cavidad, o por vía mucosa.

[0031] Los sujetos incluyen mamíferos, tales como seres humanos y no humanos (por ejemplo, primates). En modalidades particulares, un sujeto se beneficiaría de tiene la necesidad de la expresión de una secuencia de polinucleótido heterólogo.

[0032] De acuerdo con la invención, se proporciona métodos de producción de plásmidos de vector recombinante (por ejemplo, AAV) y virus (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionados tales como partículas de las variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside como RHM4-1)) partículas que incluyen un vector recombinante (encapsidado, paquete) (por ejemplo, AAV). En una realización, un método para producir partículas virales recombinantes o de AAV incluye la introducción en una célula auxiliar de empaquetamiento un plásmido de vector recombinante (por ejemplo, AAV) para producir una infección viral productiva (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)); y el cultivo de las células auxiliares bajo condiciones para producir partículas virales recombinantes (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1)). En otra modalidad, un método para producir partículas virales recombinantes o de AAV con cantidades reducidas de partículas virales recombinantes (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionada, como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)) en las que el vector viral recombinante incluye ácido nucleico contaminante, incluye la introducción en una célula auxiliar de empaquetamiento un plásmido de vector recombinante (por ejemplo, AAV); y el cultivo de las células auxiliares bajo condiciones para producir partículas virales recombinantes (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionada, como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)), en el que las partículas virales (por ejemplo, AAV-Rh74 recombinante y AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)) producidas han reducido el número de partículas virales (por ejemplo, AAV-Rh74 y AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)) con genomas de vector recombinante que contienen ácido nucleico contaminante en comparación con los números de partículas virales (por ejemplo, AAV-Rh74 y relacionadas con AAV tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside como RHM4-1)) que contienen ácido nucleico contaminante producido bajo condiciones en las que la secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora está ausente del vector viral recombinante. En aspectos particulares, el ácido nucleico contaminante es el ácido nucleico bacteriano; o una secuencia distinta de la secuencia de polinucleótido heterólogo, o ITR, promotor, potenciador, origen de replicación, la secuencia de poli-adenina, o marcador seleccionable.

[0033] Las células auxiliares incluyen células de mamíferos. En modalidades particulares, una célula auxiliar proporciona funciones auxiliares (por ejemplo, AAV) para empaquetar la secuencia de polinucleótido heterólogo en una partícula viral (por ejemplo, partículas de AAV, tales como AAV-Rh74 y vectores AAV relacionados, tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside tales como RHM4-1)). En aspectos particulares, una célula auxiliar proporciona AAV Rep y / o proteínas Cap (por ejemplo, proteínas Rep78 o 7 y Rep68); una célula auxiliar es transfectada de forma estable o transitoriamente con polinucleótido(s) que codifica la(s) secuencia(s) de proteína Rep y / o Cap; una célula auxiliar es transfectada estable o transitoriamente con la(s) secuencia(s) que codifica el polinucleótido de proteína Rep78 y / o Rep68.

[0034] Los plásmidos del vector recombinante (por ejemplo, AAV) de la invención pueden basarse en cualquier cepa o serotipo, incluyendo híbridos o quimeras de diferentes serotipos. Las partículas virales recombinantes de la invención (por ejemplo, AAV) se basan típicamente en AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 y AAV tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1)), pero también incluyen los híbridos o quimeras con diferentes serotipos. Los serotipos de AAV representativos incluyen, sin limitación, los serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV 10, AAV 11, y RH10. En consecuencia, las partículas virales recombinantes (por ejemplo, AAV) de la invención que comprenden genomas de vector puede incluir una proteína de la cápside de un serotipo diferente, una mezcla de serotipos, o híbridos o quimeras de diferentes serotipos, tales como una proteína de la cápside de VP1, VP2 o VP3 de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV 10, AAV 11, RH10. Además, los vectores recombinantes de la invención (por ejemplo, AAV), las secuencias, los plásmidos, los genomas de vectores, pueden incluir elementos de un serotipo, una mezcla de serotipos, o híbridos o quimeras de diferentes serotipos. En diversas modalidades, un vector recombinante AAV incluye una secuencia Cap, Rep, y / o ITR derivada del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh74, o RH10, o una mezcla, híbrido o quimera de cualquiera de los serotipos de AAV precedentes.

Descripción de los Dibujos

[0035] La **Figura 1** muestra los niveles de plasma del factor humano IX (FIX) en ratones C57BL / 6 (n = 5 por grupo) inyectados vía la vena de la cola con vectores AAV que expresan el transgén FIX bajo el control de un promotor específico de hígado. Dosis del vecto 2.5^{10} genomas de vectores por ratón. Se midieron los niveles de plasma del producto transgénico FIX (proteína FIX) mediante ELISA en las semanas 1, 2, y 4 posterior a la transferencia de genes. AAV-Rh74 confirió los más altos niveles de expresión del transgén FIX.

[0036] La **Figura 2** muestra los niveles de plasma de FIX caninos en perros con hemofilia B después del suministro de 3^{12} genomas de vector por kilogramo (kg) de peso. Los vectores AAV fueron infundidos por vía intravenosa (IV), aunque los niveles de la vena safena y FIX se

controlaron mediante ELISA. La expresión del transgén terapéutico FIX fue impulsada por un promotor específico del hígado. Los vectores AAV8 y AAV-Rh74 se desempeñaron más o menos igual en perros con hemofilia B y ambos fueron superiores a AAV6.

[0037] La Figura 3 muestra secuencias de aminoácido AAV-Rh74 VP1, VP2, y VP3 y, para VP1, la secuencia de polinucleótido (ADN) (SEQ ID NOs:1-4).

[0038] La Figura 4 muestra la administración de AAV8 y vector AAVrh74 que expresa el Factor humano IX (FIX) (bajo el control de un promotor específico del hígado) para macacos rhesus, un primate no humano, y la expresión de FIX en los animales. Los animales que recibieron los vectores AAVrh74-FIX (las últimas dos barras hacia el margen derecho) expresaron el transgén FIX en niveles más altos en comparación con los otros grupos de animales inyectados con la misma dosis.

[0039] La Figura 5 muestra los niveles de expresión del factor humano de plasma IX en los animales administrados con el vector de expresión del factor humano IX encapsidado por el AAV indicado (variantes Rh74, tales como variante RHM4-1), en comparación con el vector de expresión del factor humano IX AAV con Rh74 y AAV8 encapsidado.

[0040] La Figura 6 muestra la administración de un vector RHM4-1 de variante AAV8 y AAV-Rh74 que expresa el Factor humano IX (bajo el control de un promotor específico del hígado) a macacos cynomolgus, un primate no humano, y la expresión de FIX en los animales.

Descripción Detallada

[0041] La invención se basa, al menos en parte, en los datos que indican que el virus adeno-asociado (AAV) serotipo AAV-Rh74 y las variantes relacionadas de AAV, tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6) tienen un alto tropismo para los hepatocitos, que son las células del hígado. Como un vector para la transferencia / suministro de polinucleótido (por ejemplo, genes, el ácido nucleico inhibidor, etc.) en las células, las variantes AAV-Rh74 y variantes de AAV relacionadas, tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6) se puede utilizar para proporcionar niveles terapéuticos de expresión en el hígado después de la administración intravenosa. Además, los vectores AAV-Rh74 y las variantes AAV relacionadas tales como AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6) que mediaron la transferencia / suministro de genes produjo niveles de expresión de proteínas que fueron significativamente más altos que varios otros serotipos (ver, por ejemplo, las Figuras 1, 2, 4, 5 y 6). En particular, los vectores AAV-Rh74 y las variantes de cápside AAV-Rh74 relacionadas (por ejemplo, RHM4-1) tienen como objetivo los genes para el suministro en el hígado con una eficiencia por lo menos comparable y por lo general superior al estándar de oro para la transducción de hígado, AAV8, en perros con hemofilia B y / o en ratones y / o macacos. De este modo, los vectores AAV-Rh74 y las variantes de AAV relacionadas, tales como las variantes de

cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1) se pueden usar para transferir y / o suministrar polinucleótidos heterólogos, tales como secuencias de codificación (genes) para las proteínas que proporcionan un beneficio deseable o terapéutico, así como ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, anti-sentido) que reduce o inhibe la expresión de un gen no deseado o defectuoso (por ejemplo, patológico), tratando de este modo una variedad de enfermedades. Por ejemplo, un genoma de vector recombinante (por ejemplo, AAV) puede ser empaquetado o encapsidado en un vector AAV-Rh74 o variantes AAV relacionadas tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6) con el fin de transferir y / o suministrar un polinucleótido heterólogo en una célula.

[0042] Como se expone en el presente documento, virus adeno-asociado (AAV) serotipo AAV-Rh74 y variantes AAV relacionadas tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6) proporcionan un medio para suministrar las secuencias de polinucleótidos en células *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*. Tales secuencias de polinucleótidos pueden codificar proteínas tales que las células en las que se suministra los polinucleótidos expresan las proteínas codificadas. Por ejemplo, un vector recombinante de AAV puede incluir polinucleótidos heterólogos que codifican una proteína deseada o péptido, o un polinucleótido heterólogo que cuando se transcribe comprende una secuencia inhibidora (por ejemplo, ARN), por ejemplo, una secuencia que tiene como objetivo un gen para la inhibición de la expresión. El suministro o administración de un vector a un sujeto (por ejemplo, mamífero) por lo tanto, no sólo proporciona polinucleótidos heterólogos que codifican las proteínas y los péptidos al sujeto, sino también ácidos nucleicos inhibidores que tienen como objetivo los genes para la inhibición de la expresión o función en el sujeto.

[0043] De este modo, de acuerdo con la invención se proporciona vectores AAV-Rh74 y las variantes de los vectores de AAV relacionados de la invención, tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6) que incluyen un genoma de vector (encapsidado o paquete) que incluye secuencias de polinucleótidos que codifican péptidos y proteínas, así como secuencias de polinucleótidos que, directamente o cuando se transcribe comprenden ácidos nucleicos inhibidores que tienen como objetivo los genes para la inhibición de la expresión o función.

[0044] Un "vector" recombinante o "vector AAV" se deriva de la genoma de tipo natural de un virus, tales como AAV mediante el uso de métodos moleculares para eliminar el genoma de tipo natural del virus (por ejemplo, AAV), y la sustitución con una ácido nucleico no nativo, tal como una secuencia de polinucleótido heterólogo (por ejemplo, un casete de expresión de gen terapéutico). Típicamente, para AAV una o ambas secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del genoma AAV de tipo natural se conservan en el vector AAV. Un vector viral recombinante (por ejemplo, AAV) se distingue de un genoma viral (por ejemplo, AAV), ya que la totalidad o una parte del

genoma viral se ha sustituido por una secuencia no nativa con respecto al ácido nucleico genómico viral (por ejemplo, AAV) tal como una secuencia de polinucleótido heterólogo. La incorporación de una secuencia no nativa tales como un polinucleótido heterólogo define por lo tanto el vector viral (por ejemplo, AAV) como un vector "recombinante", que en el caso de AAV se puede denominar como un "vector rAAV."

[0045] Una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, AAV) se puede empaquetar en un virus (también denominado aquí como un "partícula" o "virión") para la siguiente infección (transformación) de una célula, *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Cuando una secuencia del vector recombinante se encapsida o empaqueta en una partícula de AAV, la partícula puede ser referida como un "rAAV". Tales partículas o viriones incluirán típicamente proteínas que encapsidan o empaquetan el genoma del vector. Los ejemplos particulares incluyen proteínas de la envoltura viral, y en el caso de las proteínas de la cápside de AAV.

[0046] En modalidades particulares, un vector recombinante (por ejemplo, AAV) es un vector parvovirus. Los parvovirus son pequeños virus con un genoma de ADN monocatenario. Los "virus adeno-asociado (AAV)" están en la familia de parvovirus.

[0047] Los parvovirus que incluyen AAV son virus útiles como vectores de terapia génica, ya que pueden penetrar en las células e introducir ácido nucleico / material genético de modo que el ácido nucleico / material genético puede mantenerse de manera estable en las células. Además, estos virus pueden introducir ácido nucleico / material genético en sitios específicos, por ejemplo, tal como un sitio específico en el cromosoma 19. Debido a que AAV no están asociados con la enfermedad patógena en seres humanos, los vectores de AAV son capaces de suministrar secuencias de polinucleótido heterólogo (por ejemplo, proteínas y agentes terapéuticos) a pacientes humanos sin causar patogénesis AAV o enfermedad sustancial.

[0048] AAV-Rh74 y las variantes AAV relacionadas tales como AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, variantes de cápside como RHM4-1) serotipos (por ejemplo, secuencias VP1, VP2 y / o VP3) puede o no puede ser distinto del de otros serotipos de AAV, incluyendo, por ejemplo, AAV-1 AAV 11 o Rh10 (por ejemplo, distinta de las secuencias VP1, VP2, y / o VP3 de cualquiera de los serotipos AAV1 AAV-11, o RH10). Según se usa aquí, el término "serotipo" es una distinción usada para referirse a un AAV que tiene una cápside que es serológicamente distinta de otros serotipos de AAV. La distintividad serológica se determina sobre la base de la falta de reactividad cruzada entre los anticuerpos con un AAV en comparación con otro AAV. Tales diferencias de reactividad cruzada son por lo general debido a diferencias en las secuencias de proteínas de la cápside / determinantes antígenicos (por ejemplo, debido a las diferencias de secuencia VP1, VP2, y / o VP3 de los serotipos de AAV). A pesar de la posibilidad de que las variantes AAV-Rh74 que incluyen variantes de cápside pueden no ser serológicamente

distintas del Rh74 u otro AAV, difieren en al menos un residuo de nucleótido o aminoácido en comparación con Rh74 u otro AAV.

[0049] Bajo la definición tradicional, un serotipo significa que el virus de interés ha sido probado contra el suero específico para todos los serotipos existentes y caracterizados para una actividad neutralizante y no se han encontrado anticuerpos que neutralicen el virus de interés. Como los virus aislados que se presentan con más naturalidad se han descubierto y/o se han generado mutantes de la cápside, puede haber o no haber diferencias serológicas con cualquiera de los serotipos existentes en la actualidad. De este modo, en los casos en que el nuevo virus (por ejemplo, AAV) no tiene ninguna diferencia serológica, este nuevo virus (por ejemplo, AAV) sería un subgrupo o variante del serotipo correspondiente. En muchos casos, las pruebas de serología para actividad neutralizante todavía no se ha realizado en virus mutantes con modificaciones de la secuencia de la cápside para determinar si son de otro serotipo de acuerdo con la definición tradicional de serotipo. En consecuencia, en aras de la conveniencia y para evitar la repetición, el término "serotipo" se refiere en general a ambos virus serológicamente distintos (por ejemplo, AAV), así como los virus (por ejemplo, AAV) que no son serológicamente distintos que pueden estar dentro de un subgrupo o una variante de un serotipo dado.

[0050] Los plásmidos de vector recombinante (por ejemplo, AAV), así como los métodos y usos de los mismos, incluyen cualquier cepa viral o serotipo. Como un ejemplo no limitante, un plásmido de vector recombinante (por ejemplo, AAV) se puede basar en cualquier genoma de AAV, tales como AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -rh74, -rh10 o AAV-2i8, por ejemplo. Tales vectores se pueden basar en la misma cepa o serotipo de (o subgrupo o variante), o ser diferentes el uno del otro. Como un ejemplo no limitante, un plásmido de vector recombinante (por ejemplo, AAV) basado en un genoma de serotipo puede ser idéntico a una o más de las proteínas de la cápside que empaqueta el vector. Además, un plásmido de vector recombinante (por ejemplo, AAV) se puede basar en un genoma de serotipo AAV (por ejemplo, AAV2) distinto de una o más de las proteínas de la cápside que empaqueta el vector, en cuyo caso al menos una de las tres proteínas de la cápside podría ser una variante AAV-Rh74 o variante AAV relacionada tal como AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1, RHM 15-1, 15-2 RHM, RHM 15-3 / RHM 15-5, RHM15-4 y RHM15-6), por ejemplo.

[0051] AAV-Rh74 tiene secuencias de genes / proteínas idénticas a secuencias características para AAV-Rh74 (ver, por ejemplo, VP1, VP2, VP3 de la Figura 3). Según se usa aquí, un "vector AAV relacionado con AAV-Rh74" y variaciones gramaticales de los mismos se refiere a una o más proteínas de AAV (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2, y / o VP3) que tiene identidad de secuencia sustancial con una secuencias de polinucleótido o polipéptido que comprenden AAV-Rh74. Tales vectores AAV relacionados con AAV-Rh74 por lo tanto, pueden tener una o más secuencias distintas de AAV-Rh74, pero pueden exhibir una identidad de secuencia sustancial con

uno o más genes y / o tener una o más características funcionales de AAV-Rh74 (por ejemplo, tal como tropismo celular / tisular). Por ejemplo, la variante AAV-Rh74 variante de AAV relacionada RHM4-1 tiene una cápside con cuatro aminoácidos diferentes de la cápside Rh74. Las variantes ejemplares AAV-Rh74 y AAV relacionadas, tales como AAV-Rh74 o AAV relacionadas tales como las secuencias de las variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM 4.1, RHM 15-1, RHM 15-2, 15-3 RHM / RHM 15-5, RHM15-4 y RHM15-6) incluyen VP1, VP2 y / o VP3 se establecen aquí, por ejemplo, en la Figura 3. En una modalidad ejemplar no limitativa, un vector de AAV relacionado con AAV-Rh74 tiene un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia de la misma que incluye o consiste en una secuencia de al menos 80% o más (por ejemplo, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, etc.) idénticas a una o más secuencias de AAV-Rh74 VP1, VP2 y / o VP3 establecidas en la Figura 3.

[0052] De acuerdo con la invención, los métodos y los usos incluyen secuencias de AAV-Rh74 (polipéptidos y nucleótidos) y subsecuencias de las mismas que exhiben menos de 100% de identidad de secuencia con un gen de referencia AAV-Rh74 o secuencia de proteína (por ejemplo, secuencias de VP1, VP2, y / o VP3 establecidas en la Figura 3), pero son distintas de y no idénticas a los genes o proteínas de AAV conocidos, tales como AAV1-AAV11, AAV-Rh10, genes o proteínas, etc. En una modalidad, un polipéptido AAV-Rh74 o subsecuencia del mismo incluye o consiste en una secuencia de al menos 80% o más idénticos, por ejemplo, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, etc., es decir, hasta el 100% idéntico a cualquier secuencia de referencia AAV-Rh74 o subsecuencia de la misma (por ejemplo, las secuencias de VP1, VP2 y / o VP3 establecidas en la Figura 3). En aspectos particulares, una variante de AAV-Rh74 relacionada tiene uno, dos, tres o cuatro de las cuatro sustituciones de aminoácidos expuestos en AAV-Rh74 (por ejemplo, la variante de cápside RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6).

[0053] Los vectores recombinantes (por ejemplo, AAV), que incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV 6, AAV 7, AAV8, AAV9, AAV 10, AAV 11, Rh10, Rh74 o AAV 2i8 y la variante, relacionada, secuencias híbridas y quiméricas, pueden construirse usando técnicas recombinantes que son conocidas para el experto en la materia, para incluir una o más secuencias de polinucleótido heterólogo (transgenes) flanqueadas con una o más secuencias funcionales AAV ITR. Tales vectores pueden tener uno o más de los genes de AAV de tipo natural eliminados en su totalidad o en parte, por ejemplo, un gen rep y / o cap, pero retener al menos una secuencia flanqueante funcional ITR, según sea necesario para el rescate, replicación y el empaquetamiento del vector recombinante en una partícula del vector AAV. Por lo tanto, un genoma del vector AAV incluiría secuencias requeridas en cis para la replicación y empaquetado (por ejemplo, secuencias ITR funcionales).

[0054] Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se utilizan indistintamente en este documento para hacer referencia a todas las formas de ácido nucleico, oligonucleótidos, incluyendo ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los polinucleótidos incluyen ADN genómico, ADNc y ADN antisentido, y mRNA, rARN tARN empalmado o sin empalmar y el ADN inhibidor o ARN (ARNi, por ejemplo, horquilla pequeña o corta (sh)ARN, microARN (miARN), interferencia pequeña o corta (si)ARN, ARN trans-empalme, o ARN antisentido). Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos que se presentan naturalmente, sintéticos, e intencionadamente alterados o modificados, así como análogos y derivados. Los polinucleótidos pueden ser individuales, dobles, o triples, lineales o circulares, y pueden ser de cualquier longitud. Al discutir sobre los polinucleótidos, se puede describir aquí una secuencia o estructura de un polinucleótido particular, de acuerdo con la convención de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

[0055] Un polinucleótido "heterólogo" se refiere a un polinucleótido insertado en un vector (por ejemplo, AAV) para los propósitos de vector mediado por la transferencia / suministro del polinucleótido en una célula. Los polinucleótidos heterólogos son típicamente distinto del ácido nucleico de vector (por ejemplo, AAV), es decir, son no nativos con respecto al ácido nucleico viral (por ejemplo, AAV). Una vez transferida / suministrada en la célula, un polinucleótido heterólogo, contenido dentro del virión, se puede expresar (por ejemplo, transcribir, y traducir de ser apropiado). Alternativamente, un polinucleótido heterólogo transferido / suministrado en una célula, contenida dentro del virión, no necesita ser expresado. Aunque el término "heterólogo" no siempre se usa aquí en referencia a polinucleótidos, la referencia a un polinucleótido, incluso en ausencia del modificador "heterólogo" está destinada a incluir polinucleótidos heterólogos a pesar de la omisión.

[0056] Los "polipéptidos", "proteínas" y "péptidos" codificados por las "secuencias de polinucleótidos" incluyen secuencias nativas de longitud completa, como con proteínas de origen natural, así como subsecuencias funcionales, formas modificadas o variantes de secuencia siempre y cuando la subsecuencia, la forma modificada o la variante conserve cierto grado de funcionalidad de la proteína nativa de longitud completa. En los métodos y usos de la invención, dichos polipéptidos, proteínas y péptidos codificados por las secuencias de polinucleótidos pueden ser, pero no están obligados a ser idénticos a la proteína endógena que es defectuosa, o cuya expresión es insuficiente, o deficiente en el mamífero tratado.

[0057] El virus adeno-asociado de invención (AAV) serotipo AAV-Rh74 y las variantes de AAV relacionadas, tales como variantes AAV-Rh74 (por ejemplo, las variantes de cápside como RHM4-1, RHM4-1, RHM 15-1, RHM de 15-2, RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6), se puede usar para introducir / suministrar polinucleótidos de forma estable o transitoria en células y la progenie de las mismas. El término "transgén" se usa aquí para referirse convenientemente a un polinucleótido heterólogo tal que se ha introducido en una célula u organismo. Los transgenes incluyen cualquier

polinucleótido, tal como un gen que codifica un polipéptido o proteína, un polinucleótido que se transcribe en un polinucleótido inhibidor, o un polinucleótido que no se transcribe (por ejemplo, carece de un elemento de control de expresión, tal como un promotor que dirige la transcripción).

[0058] Por ejemplo, en una célula que tiene un transgén, el transgén se ha introducido / transferido a modo de vector, tal como AAV, "transformación" de la célula. Los términos "transformar" y "transfectar" se refieren a la introducción de una molécula tal como un polinucleótido en un organismo celular o anfitrión.

[0059] Una célula en la que se ha introducido el transgén se conoce como una "célula transformada" o "transformante". Por consiguiente, una célula "transformada" o "transfectada" (por ejemplo, en un mamífero, tal como una célula o tejido o célula de órgano), significa un cambio genético en una célula después de la incorporación de una molécula exógena, por ejemplo, un polinucleótido o proteína (por ejemplo, un transgén) en la célula. Así, una o célula "transfectada" o "transformada" es una célula en la que, o una progenie de la misma en la que una molécula exógena se ha introducido, por ejemplo. La(s) célula(s) se puede propagar y expresar la proteína introducida, o transcribir el ácido nucleico. Para los usos y métodos de la terapia de genes, una célula transformada puede estar en un sujeto.

[0060] El polinucleótido introducido puede o no estar integrado en el ácido nucleico de la célula receptora u organismo. Si un polinucleótido introducido se llega a integrar en el ácido nucleico (ADN genómico) de la célula receptora u organismo se puede mantener de forma estable en esa célula u organismo y se pasa más adelante o se hereda por células de la progenie o los organismos de la célula receptora u organismo. Finalmente, el ácido nucleico introducido puede existir en la célula receptora u organismo huésped sólo transitoriamente.

[0061] Las células que pueden transformarse incluyen una célula de cualquier tipo de tejido u órgano, de cualquier origen (por ejemplo, mesodermo, ectodermo o endodermo). Los ejemplos no limitativos de células incluyen el hígado (por ejemplo, hepatocitos, células endoteliales sinusoidales), páncreas (por ejemplo, células de los islotes beta), pulmón, sistema nervioso central o periférico, tales como el cerebro (por ejemplo, neuronal, glial o células ependimarias) o la columna vertebral, riñón, ojo (por ejemplo, la retina, los componentes celulares), bazo, piel, timo, testículos, pulmón, diafragma, corazón (cardíaco), musculares o psoas, o el intestino (por ejemplo, endocrino), el tejido adiposo (blanco, marrón o beige), músculo (por ejemplo, fibroblastos), sinoviocitos, condrocitos, osteoclastos, células epiteliales, células endoteliales, células de las glándulas salivares, células nerviosas del oído interno o hematopoyético (por ejemplo, células de sangre o linfa). Los ejemplos adicionales incluyen células madre, tales como células progenitoras pluripotentes o multipotentes que desarrollan o se diferencian en el hígado (por ejemplo, hepatocitos, células endoteliales sinusoidales), páncreas (por ejemplo, células de los islotes beta), pulmón, sistema nervioso central o periférico, tales como el cerebro (por ejemplo, células neuronal, glial o ependimaria) o la columna

vertebral, riñón, ojo (retina, componentes de la célula), bazo, piel, timo, testículos, pulmón, diafragma, corazón (cardíaco), músculo o psoas, o el intestino (por ejemplo, endocrino), el tejido adiposo (blanco, marrón o beige), músculo (por ejemplo, fibroblastos), sinoviocitos, condrocitos, osteoclastos, células epiteliales, células endoteliales, células de las glándulas salivares, células nerviosas del oído interno o células hematopoyéticas (por ejemplo, sangre o linfa).

[0062] Una "molécula terapéutica" en una modalidad es un péptido o proteína que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto de una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un péptido "terapéutico" o proteína codificada por un transgén es una que confiere un beneficio a un sujeto, por ejemplo, para corregir un defecto genético, para corregir una deficiencia del gen (de expresión o funcional), o un efecto anti-cáncer.

[0063] Los ejemplos particulares no limitantes de los polinucleótidos heterólogos que codifican productos génicos (por ejemplo, proteínas terapéuticas) que son útiles de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a: genes que comprenden o codifican CFTR (proteína reguladora de transmembrana de la fibrosis cística), un factor de coagulación de la sangre (coagulación) (Factor XIII, Factor IX, Factor X, Factor VIII, Factor VIIa, proteína C, etc.) incluyendo la ganancia de función de factores de coagulación de la sangre, un anticuerpo, proteína de 65 kDa específica epitelio pigmentario de la retina (RPE65), eritropoyetina, receptor LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metal (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en la enfermedad de almacenamiento lisosomal (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento (por ejemplo, factores de crecimiento similar a la insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento transformante α y β , etc.), una citoquina (por ejemplo, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, factor de estimulación de colonia de granulocitos-macrófago, linfoxina, etc.), un producto de gen suicida (por ejemplo, virus herpes simplex timidina quinasa, citosina desaminasa, toxina de la difteria, citocromo P450, desoxicitidina quinasa, factor de necrosis tumoral, etc.), una proteína de resistencia a los medicamentos (por ejemplo, que proporciona resistencia a un fármaco usado en la terapia del cáncer), una proteína supresora de tumores (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), poliposis adenomatosa coli (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un tolerógeno o péptido inmunogénico o proteína Tregitopes [de Groot et al, *Blood* 2008 Oct. 15; 112(8):. 3303], o hCDR1 [Sharabi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Junio 6; 103(23): 8810-5], la insulina, la glucoquinasa, guanilato ciclasa 2D (LCA-GUCY2D), proteína Rab escolta 1 (Choroideremia), LCA 5 (LCA-Lebercilin), aminotransferasa cetoácido ornitina (Gyrate

Atrophy), Retinoschisin 1 (Retinosquiosis ligado a X), USH1C (Síndrome de Usher 1C), retinitis pigmentosa ligada a X GTPase (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (conexina 26 sordera), ACHM 2, 3 y 4 (Acromatopsia), PKD-1 o PKD-2 (enfermedad renal poliquística), TPP1, CLN2, deficiencias del gen causante de enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, sulfatasas, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP, NPC1, VPC2, proteínas activadoras de esfingolípidos, etc.), una o más nucleasas de dedos de zinc para la edición de genoma, o de secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma.

[0064] Otros ejemplos no limitantes de polinucleótidos heterólogos que codifican productos génicos (por ejemplo, proteínas terapéuticas) que son útiles de acuerdo con la invención incluyen aquellos que se pueden utilizar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, incluyendo, pero no limitado a, fibrosis quística (y otras enfermedades del pulmón), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos sanguíneos, el SIDA, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (por ejemplo, Duchenne, Becker), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina deaminasa, enfermedades de almacenamiento de glucógeno y otros defectos metabólicos, enfermedades degenerativas de la retina (y otras enfermedades de los ojos), y enfermedades de órganos sólidos (por ejemplo, el cerebro, hígado, riñón, corazón).

[0065] Todas las formas de mamíferos y no mamíferos de polinucleótidos que codifican productos génicos, incluyendo los genes no limitativos y proteínas descritos aquí están expresamente incluidas, ya sea conocida o desconocida. De este modo, la invención incluye genes y proteínas de los no mamíferos, mamíferos distintos de los seres humanos, y los seres humanos, cuyos genes y proteínas funcionan de una manera sustancialmente similar a los genes humanos y las proteínas descritas aquí. Un ejemplo no limitativo de gen no mamífero es un dominio nucleasa Fok, que es de origen bacteriano. Ejemplos no limitantes de secuencias FIX no humanos de mamíferos se describen en Yoshitake et al, 1985, arriba; Kurachi et al, 1995, arriba; Jallat et al, 1990, arriba; Kurachi et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 6461-6464; Jaye et al., 1983, *Nucl. Acids Res.* 11:2325-2335; Anson et al, 1984, *EMBO J.* 3: 1053-1060; Wu et al, 1990, *Gene* 86: 275-278; Evans et al, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 86: 10095 (1989), *Blood* 74: 207-212; Pendurthi et al., 1992, *Thromb. Res.* 65: 177-186; Sakar et al, 1.990, *Genomics* 1990, 6:133-143; y, Katayama et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4990-4994.

[0066] Según se establece aquí, las secuencias de polinucleótidos heterólogos (transgenes) incluyen secuencias de ácidos nucleicos inhibidores y de antisentido. Inhibidor, antisentido, siARN (ARN de pequeña interferencia), miARN (micro ARN), shARN (pequeña horquilla de ARN), ARNi y oligonucleótidos antisentido pueden modular la expresión de un gen diana. Tales moléculas

incluyen aquellas capaces de inhibir la expresión de un gen diana implicado en la mediación de un proceso de la enfermedad, de este modo reduciendo, inhibiendo o aliviando uno o más síntomas de una enfermedad.

[0067] El antisentido incluye polinucleótidos individuales, de doble o triple hebras y ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) que unen el ARN transcrito o ADN (por ejemplo, ADN genómico). Los oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción de un gen diana, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 del sitio de inicio, son otro ejemplo particular. El antisentido que forma triplex se puede unir a un ADN de doble hebra inhibiendo de este modo la transcripción del gen. "ARNi" es el uso de secuencias de ARN monocatenario o bicatenario para inhibir la expresión génica (ver, por ejemplo, Kennerdell et al, *Cell* 95: 1017 (1998); and Fire et al., *Nature*, 391:806 (1998)). Las secuencias de ARN de doble hebra a partir de una región de codificación del gen diana se pueden por lo tanto usar para inhibir o prevenir la expresión / transcripción de genes de acuerdo con los métodos y usos de la invención. El antisentido y ARNi se pueden producir sobre la base de ácidos nucleicos que codifican secuencias de genes diana (por ejemplo, huntingtina, o HTT), tales como ácido nucleico que codifica HTT de mamífero y humano. Por ejemplo, un ácido nucleico de una hebra o doble hebra (por ejemplo, ARN) puede dirigir la transcripción HTT (por ejemplo, mARN).

[0068] Un "siARN" se refiere a una molécula terapéutica que participa en el proceso de la interferencia de ARN para un silenciamiento génico post-transcripcional de secuencia específica o knockdown de genes. siARNs tienen homología con la secuencia del ARNm cognado del gen diana. Los pequeños ARNs de interferencia (siRNAs) pueden ser sintetizados in vitro o generados por ecisión ribonucleasa III de dsARN más largo y son los mediadores de la degradación de ARNm específico de secuencia. siARN u otros ácidos nucleicos de la invención pueden sintetizarse químicamente usando fosforamiditas de ribonucleósido apropiadamente protegidas y un sintetizador convencional de ADN / ARN. El ARNsi se puede sintetizar como dos moléculas de ARN complementarias, separadas, o como una sola molécula de ARN con dos regiones complementarias. Los proveedores comerciales de moléculas de ARN sintético o reactivos de síntesis incluyen Applied Biosystems (Foster City, CA, U.S.A.), Prologo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, Colorado., U.S.A.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, III, U.S.A.), Glen Research (Sterling, Va., U.S.A.), ChemGenes (Ashland, Mass., U.S.A.) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido). Los constructos de siARN para la inhibición de ARNm de un gen diana pueden ser de entre 15-50 nucleótidos de longitud, y más típicamente alrededor de 20-30 nucleótidos de longitud. Tales moléculas de ácido nucleico se pueden incorporar fácilmente en los vectores virales descritos aquí usando métodos convencionales conocidos para un experto en la técnica.

[0069] Los ejemplos no limitantes particulares de genes (por ejemplo, ADN genómico) o transcripción de un gen patógeno (por ejemplo, ARN o ARNm) que pueden tenerse como objetivo

con secuencias de ácidos nucleicos inhibidor de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a: genes asociados con enfermedades de repetición polinucleótido como gen huntingtina (HTT), un gen asociado con la atrofia dentatorubropallidolusian (por ejemplo, atrofina 1, ATN1); receptor de andrógenos en el cromosoma X en la atrofia muscular espinobulbar, la Ataxina humana-1, -2, -3, y -7, $Ca_v2.1$ P / Q canal de calcio dependiente de la tensión está codificada por el (CACNA1A), proteína que une TATA, Ataxina 8 de hebra opuesta, también conocida como ATXN8OS, fosfatasa de proteína serina / treonina 2A 55 kDa subunidad reguladora B beta isoforma en la ataxia espinocerebelosa (tipo 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 17), *FMR1* (retraso mental frágil X 1) en el síndrome X frágil, *FMR1* (retraso mental frágil X 1) en el síndrome de temblor / ataxia X-asociado frágil, *FMR1* (retraso mental frágil X 2) o AF4 / *FMR2* miembro familiar en retraso mental frágil XE 2; Miotonina-proteína quinasa (MT-PK) en la distrofia miotónica; frataxina en la ataxia de Friedreich; un mutante del gen de superóxido dismutasa 1 (SOD1) en la esclerosis lateral amiotrófica; un gen implicado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y / o la enfermedad de Alzheimer; apolipoproteína B (APOB) y convertasa subtilisina proproteína / Kexin tipo 9 (PCSK9), hipercolesterolemia; VIH Tat, transactivador del virus de la inmunodeficiencia humana de la transcripción de genes, en la infección por el VIH; VIH TAR, VIH TAR, el gen del elemento de respuesta del transactivador del virus de inmunodeficiencia humana, en la infección por el VIH; C-C del receptor de quimiocinas (CCR5) en la infección por el VIH; Virus del sarcoma de Rous (RSV) proteína de la nucleocápside en la infección por VRS, microARN específico de hígado (miR-122) en la infección por el virus de la hepatitis C; p53, lesión renal aguda o función retardada del injerto trasplante de riñón o insuficiencia renal insuficiencia renal aguda; proteína quinasa N3 (PKN3) en malignidades recurrente adelantado o tumores malignos sólidos; LMP2, LMP2 también conocido como la subunidad proteasoma tipo beta 9 (PSMB 9), el melanoma metastásico; LMP7, también conocido como la subunidad del proteasoma de tipo beta 8 (PSMB 8), melanoma metastásico; MECL1 también conocido como la subunidad proteasoma tipo beta 10 (PSMB 10), el melanoma metastásico; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los tumores sólidos; proteína del husillo kinesina en tumores sólidos, supresor de la apoptosis de las células B de CLL / linfoma (BCL-2) en la leucemia mieloide crónica; ribonucleótido reductasa M2 (RRM2) en tumores sólidos; furina en los tumores sólidos; quinasa 1 similar a polo (Plk1) en tumores hepáticos, diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) en la infección por hepatitis C, beta-catenina en la poliposis adenomatosa familiar; receptor adrenérgico beta 2, glaucoma; RTP801 / Redd1 también conocida como proteína 4 de transcripción de daño inducible daños DAN, en el edema macular diabético (DME) o degeneración macular relacionada con la edad; receptor de factor de crecimiento vascular endotelial I (VEGFR1) en la degeneración macular relacionada con la edad o neivascularization coroidea, caspasa 2 en la neuropatía óptica isquémica no arterítica; queratina 6A N17K proteína mutante en paquioniquia congénita; genoma del virus de la gripe A / secuencias de genes en la infección por

influenza; síndrome respiratorio agudo severo (SARS) del genoma del coronavirus / secuencias de genes en la infección por SARS; genoma del virus sincicial respiratorio / secuencias genes en la infección por el virus sincicial respiratorio; genoma de ébola filovirus / secuencia de genes en la infección por ébola; genoma del virus de la hepatitis B y C / secuencias de genes en la infección por hepatitis B y C; genoma del virus del herpes simplex (HSV) / secuencias de genes en la infección por HSV, genoma del virus Coxsackie B3 / secuencias de genes en la infección por virus coxsackie B3; silenciamiento de un alelo patógeno de un gen (silenciamiento específico de alelo) como torsina A (TOR1A) en la distonía primaria, clase I y pan y HLA-alelo específico en el trasplante; o gen de la rodopsina mutante (RHO) en la retinitis pigmentosa autosómica dominantemente heredado (adRP).

[0070] Los polinucleótidos, polipéptidos y subsecuencias de los mismos incluyen formas variantes y modificadas. Según se usa aquí, los términos "modificar" o "variante" y las variaciones gramaticales de los mismos, significan que un polinucleótido, polipéptido o subsecuencia de los mismos se desvían de una secuencia de referencia. Las secuencias modificadas y variantes pueden por lo tanto tener sustancialmente la misma, mayor o menor actividad o función que una secuencia de referencia, pero al menos retener una actividad o función parcial de la secuencia de referencia.

[0071] Por consiguiente, la invención también incluye variantes que se presentan de forma natural y no natural. Dichas variantes incluyen variantes de AAV-Rh74 tales como variantes de cápside AAV-Rh74. Los ejemplos particulares de tales variantes de cápside AAV-Rh74 incluyen RHM 15-1 RHM de 15-2, RHM de 15-3, RHM de 15-4, RHM de 15-5, RHM de 15-6 y RHM4-1 (vere, por ejemplo, la figura 5).

[0072] Dichas variantes también incluyen ganancia y pérdida de las variantes de función. Por ejemplo, las secuencias de ADN FIX humano tipo natural, cuyas variantes de proteínas o mutantes retienen la actividad, o son terapéuticamente eficaces, o son comparativamente o incluso más terapéuticamente activas que el FIX humano invariante en los métodos y usos de la invención. En un ejemplo particular, el colágeno IV sirve para atrapar FIX, lo que significa que cuando se introduce en el tejido muscular de un mamífero algunos de los FIX no está disponible para la participación en la coagulación de la sangre, ya que se retiene en los espacios intersticiales en el tejido muscular. Una mutación en la secuencia de FIX que se traduce en una proteína con unión reducida al colágeno IV (por ejemplo, pérdida de la función) es un mutante útil en los métodos de la invención, por ejemplo, para el tratamiento de hemofilia. Un ejemplo de un gen mutante humano FIX codifica una proteína humana FIX con el aminoácido alanina en lugar de lisina en la quinta posición de aminoácido desde el principio de la proteína madura.

[0073] Los ejemplos no limitantes de modificaciones incluyen uno o más nucleótidos o sustituciones de aminoácido (por ejemplo, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20 20-25, 25-30, 30-40, 40-50 50-100, o más nucleótidos o residuos), tales como una arginina para un residuo de lisina (por ejemplo, una o más sustituciones de arginina de una lisina como se establece en cualquiera de RHM

4-1 RHM 15-1, RHM 15-2, 15-3 RHM / RHM 15-5, RHM15-4 y RHM15-6) adiciones (por ejemplo, inserciones o 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15- 20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, de 50-100, o más nucleótidos o residuos) y supresiones (por ejemplo, subsecuencias o fragmentos) de una secuencia de referencia. En modalidades particulares, una secuencia modificada o variante retiene al menos parte de una función o una actividad de la secuencia sin modificar. Tales formas y variantes modificadas pueden tener menor que, el mismo, o mayor, pero al menos una parte de, una función o actividad de una secuencia de referencia, por ejemplo, como se describe aquí.

[0074] Una variante puede tener una o más diferencias o modificaciones, o ambas, de secuencias de aminoácido no conservadora o conservadora. Una "sustitución conservadora" es la sustitución de un aminoácido por un residuo biológica, química o estructuralmente similar. Biológicamente similar significa que la sustitución no destruye una actividad biológica. Estructuralmente similar significa que los aminoácidos tienen cadenas laterales con una longitud similar, tales como alanina, glicina y serina, o un tamaño similar. La similitud química significa que los residuos tienen la misma carga o son tanto hidrófilos o hidrófobos. Los ejemplos particulares incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina o lisina (por ejemplo, RHM15-1, RHM15-2 , RHM15-3 / RHM15-5, RHM15-4 y RHM15-6), ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, serina por treonina, y similares. Los ejemplos particulares de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares. Por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Una "sustitución conservadora" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido.

[0075] Por consiguiente, la invención incluye genes y proteínas variantes (por ejemplo, de polinucleótidos que codifican las proteínas descritas aquí) que retienen una o más actividades biológicas (por ejemplo, función en la coagulación sanguínea, etc.). Tales variantes de las proteínas o polipéptidos incluyen proteínas o polipéptidos que han sido o pueden ser modificadas usando la tecnología del ADN recombinante de modo que la proteína o polipéptido que posee las propiedades alteradas o adicionales, por ejemplo, variantes que confiere una mayor estabilidad de las proteínas en el plasma o el incremento de la actividad de la proteína. Las variantes pueden diferir de una secuencia de referencia, tal como polinucleótidos, proteínas o péptidos de origen natural.

[0076] En el nivel de secuencia de nucleótidos, un gen variante que se presenta de manera natural y no natural será típicamente por lo menos aproximadamente 50% idéntico, más típicamente

aproximadamente 70% idéntico, aún más típicamente aproximadamente 80% idéntico (90% o más de identidad) al gen de referencia. En el nivel de secuencia de aminoácido, una proteína variante que se presenta de manera natural y no natural será típicamente por lo menos aproximadamente 70% idéntica, más típicamente aproximadamente 80% idéntica, aún más típicamente aproximadamente 90% o más de identidad con la proteína de referencia, aunque las regiones sustanciales de no identidad se permiten en las regiones no conservadas (por ejemplo, menos, del 70% idéntica, tal como menos de 60%, 50% o incluso 40%). En otras modalidades, las secuencias tienen al menos 60%, 70%, 75% o más de identidad (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad) con una secuencia de referencia. Los procedimientos para introducción de cambios de nucleótido y aminoácido en un polinucleótido, proteína o polipéptido son conocidos por el experto en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2007)).

[0077] El término "identidad", "homología" y variaciones gramaticales de los mismos, significan que dos o más entidades de referencia son los mismos, cuando son secuencias "alineadas". Por lo tanto, a modo de ejemplo, cuando dos secuencias de polipéptidos son idénticas, tienen la misma secuencia de aminoácidos, por lo menos dentro de la región o porción de referencia. Cuando dos secuencias de polinucleótidos son idénticas, tienen la misma secuencia de polinucleótido, por lo menos dentro de la región o porción de referencia. La identidad puede ser en un área definida (región o dominio) de la secuencia. Un "área" o "región" de identidad se refiere a una porción de dos o más entidades de referencia que son iguales. Así, cuando dos secuencias de proteína o ácido nucleico son idénticas sobre una o más áreas o regiones de secuencias estas comparten identidad dentro de esa región. Una secuencia "alineada" se refiere a secuencias de múltiples polinucleótido o proteína (aminoácido), que contienen a menudo correcciones para las bases faltantes o adicionales o aminoácidos (espacios) en comparación con una secuencia de referencia.

[0078] La identidad se puede extender sobre toda la longitud de la secuencia o una porción de la secuencia. En aspectos particulares, la longitud de la secuencia que comparte el porcentaje de identidad es 2, 3, 4, 5 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc. aminoácidos contiguos. En aspectos particulares adicionales, la longitud de la secuencia que comparte identidad es 20 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, etc. aminoácidos contiguos. En otros aspectos particulares, la longitud de la secuencia que comparte identidad es 35 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, etc., aminoácidos contiguos. En incluso otros aspectos particulares, la longitud de la secuencia que comparte identidad es 50 o más polinucleótidos o aminoácidos contiguos, por ejemplo, de 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-100, 100-110, etc. polinucleótidos o aminoácidos contiguos.

[0079] Los términos "homólogo" o "homología" significan que dos o más entidades referidas comparten al menos identidad parcial sobre una región o porción dada. "Áreas, regiones o dominios" de homología o identidad significan que una porción de dos o más entidades referenciadas comparten homología o son las mismas. Así, cuando dos secuencias son idénticas sobre una o más regiones de secuencias estas comparten identidad en estas regiones. "Homología sustancial" significa que una molécula es conservada estructuralmente o funcionalmente de modo que tenga o se predice que tenga por lo menos una estructura o función parcial de una o más de las estructuras o funciones (por ejemplo, una función o actividad biológica) de la molécula de referencia, o región o porción pertinente / correspondiente de la molécula de referencia con la que comparte homología.

[0080] El grado de identidad (homología) entre dos secuencias pueda determinarse utilizando un programa informático y algoritmo matemático. Tales algoritmos que calculan la identidad porcentual de la secuencia (homología) generalmente representan espacios de secuencia y desajustes en la región de comparación o área. Por ejemplo, un algoritmo de búsqueda BLAST (por ejemplo, BLAST 2.0) (ver, por ejemplo, Altschul et al, *J. Mol Biol.* 215:403 (1990), disponible públicamente a través de NCBI) tiene parámetros de búsqueda ejemplares como sigue: Mismatch - 2; espacio abierto 5; extensión de espacio 2. Para las comparaciones de secuencias de polipéptido, un algoritmo BLASTP se usa típicamente en combinación con una matriz de puntuación, como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 o BLOSUM 50. Los programas de comparación de secuencia FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH también se usan para cuantificar la extensión de la identidad (Pearson et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2.444 (1988); Pearson, *Methods Mol Biol.* 132:185 (2000); y Smith et al., *J. Mol. Biol.* 147:195 (1981)). Los programas para la cuantificación de la similitud estructural de la proteína que usan el mapeo topológico basado en Delaunay también se han desarrollado (Bostick et al., *Biochem Biophys Res Commun* 304:320 (2003)).

[0081] Los polinucleótidos incluyen adiciones e inserciones, por ejemplo, los dominios heterólogos. Una adición (por ejemplo, dominio heterólogo) puede ser un enlace covalente o no covalente de cualquier tipo de molécula con una composición. Normalmente las adiciones e inserciones (por ejemplo, un dominio heterólogo) confieren un complemento o una función o actividad distinta.

[0082] Las adiciones e inserciones incluyen secuencias quiméricas y de fusión, que es una secuencia de polinucleótido o proteína que tiene una o más moléculas que normalmente no están presentes en una secuencia nativa de referencia (tipo natural) covalentemente unida a la secuencia. Los términos "fusión" o "quimérico" y variaciones gramaticales de los mismos, cuando se usan en referencia a una molécula significan que una porción o parte de la molécula contiene una entidad diferente (heteróloga) distinta de la molécula, ya que por lo general no existen juntas en la naturaleza. Es decir, por ejemplo, una porción de la fusión o quimera, incluye o consiste en una porción que no existe juntos en la naturaleza, y es estructuralmente distinta.

[0083] El término "vector" se refiere a un plásmido, virus (por ejemplo, vector AAV), cósmido, o cualquier otro vehículo que puede ser manipulado por inserción o incorporación de un polinucleótido. Tales vectores pueden ser usados para la manipulación genética (es decir, "vectores de clonación"), para introducir / transferir polinucleótidos en las células, y para transcribir o traducir el polinucleótido insertado en las células. Una secuencia de ácido nucleico del vector contiene generalmente al menos un origen de replicación para la propagación en una célula y elementos opcionalmente adicionales, tales como una secuencia de polinucleótido heterólogo, el elemento de control de expresión (por ejemplo, un promotor, potenciador), marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos), secuencia de poli-adenina.

[0084] Según se usa aquí, el término "recombinante", como un modificador de vector viral, tales como vectores recombinantes AAV, así como un modificador de secuencias tales como polinucleótidos y polipéptidos recombinantes, significa que las composiciones (por ejemplo, AAV o secuencias) han sido manipuladas (es decir, diseñadas) de una manera que generalmente no ocurre en la naturaleza. Un ejemplo particular de un vector recombinante, tal como un vector AAV sería el caso en el que un polinucleótido que no está presente normalmente en la naturaleza genoma viral de tipo natural (por ejemplo, AAV) se inserta dentro del genoma viral. Por ejemplo, un ejemplo de un polinucleótido recombinante sería donde un polinucleótido heterólogo (por ejemplo, genes) que codifica una proteína se clona en un vector, con o sin regiones de intrón 5' y / o regiones de intrón 3' que el gen se asocia normalmente dentro del genoma viral (por ejemplo, AAV). Aunque el término "recombinante" no siempre se usa aquí en referencia a vectores virales, tales como vectores de AAV, así como secuencias tales como polinucleótidos y polipéptidos, las formas recombinantes de AAV, y secuencias que incluyen polinucleótidos y polipéptidos, se incluyen expresamente a pesar de dicha omisión.

[0085] Un "genoma" de vector recombinante (por ejemplo, un genoma de vector AAV) puede ser encapsidado o empaquetado en un virus (también denominado aquí como una "partícula" o "virión") para la infección subsiguiente (transducción o transformación) de una célula, *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Cuando un genoma de vector recombinante AAV es encapsidado o empaquetado en una partícula de AAV, la partícula puede ser referida como un "rAAV". Tales partículas o viriones incluirán típicamente proteínas que encapsidan o empaquetan el genoma del vector. Los ejemplos particulares incluyen proteínas de la cápside y la envoltura viral, y en el caso de AAV, proteínas de la cápside de AAV.

[0086] Para un plásmido recombinante, un "genoma" de vector se refiere a la porción de la secuencia del plásmido recombinante que es en última instancia, empaquetado o encapsidado para formar una partícula viral. En el caso de que se usen plásmidos recombinantes para construir o fabricar vectores recombinantes, el genoma del vector no incluye la porción del "plásmido" que no corresponde a la secuencia de genoma del vector del plásmido recombinante. Esta porción de

genoma no-vector del plásmido recombinante se denomina como el "esqueleto del plásmido", que es importante para la clonación y la amplificación del plásmido, un proceso que es necesario para la propagación y la producción del virus recombinante, pero no está en sí empaquetado o encapsidado en partículas virales (por ejemplo, AAV).

[0087] Por lo tanto, un "genoma" de vector se refiere a la porción del plásmido vector que se empaqueta o encapsida por el virus (por ejemplo, AAV), y que contiene una secuencia de polinucleótido heterólogo. La porción de genoma no-vector del plásmido recombinante incluye la columna vertebral que es importante para la clonación y la amplificación del plásmido, pero no es en sí empaquetados o encapsidado por el virus (por ejemplo, AAV).

[0088] Un vector viral se deriva de o se basa en uno o más elementos de ácido nucleico que comprenden un genoma viral. Los vectores virales particulares incluyen vectores de parvovirus, tales como vectores de virus adeno-asociados (AAV).

[0089] Las secuencias de vector recombinante son manipuladas por inserción o incorporación de un polinucleótido. Según se divulga aquí, un plásmido vector contiene generalmente al menos un origen de replicación para la propagación en una célula y uno o más elementos de control de expresión.

[0090] Las secuencias de vector que incluye vectores AAV pueden incluir uno o más "elementos de control de expresión". Típicamente, los elementos de control de expresión son secuencia(s) de ácido nucleico que influyen en la expresión de un polinucleótido operativamente enlazado. Los elementos de control, incluyendo los elementos de control de expresión tal como se establece aquí, tales como promotores y potenciadores, presentes dentro de un vector se incluyen para facilitar la correcta transcripción del polinucleótido heterólogo y de ser conveniente la traducción (por ejemplo, un promotor, potenciador, señales de empalme para intrones, mantenimiento del marco correcto de lectura del gen para permitir la traducción en marco de ARNm y, codones de parada, etc.). Tales elementos actúan típicamente en cis, pero también pueden actuar en trans.

[0091] El control de la expresión puede efectuarse a nivel de la transcripción, traducción, empalme, estabilidad de mensaje, etc. Típicamente, un elemento de control de expresión que modula la transcripción está yuxtapuesto cerca del extremo 5' del polinucleótido transcrito (es decir, "corriente arriba"). Los elementos de control de expresión también pueden estar situados en el extremo 3' de la secuencia transcrita (es decir, "corriente abajo") o dentro de la transcripción (por ejemplo, en un intrón). Los elementos de control de expresión pueden ser localizados a una distancia lejos de la secuencia transcrita (por ejemplo, 100 a 500, 500 a 1000, 2000 a 5000, 5000 a 10.000 o más nucleótidos del polinucleótido), incluso a distancias considerables. Sin embargo, debido a las limitaciones de longitud del polinucleótido, para vectores de AAV, tales elementos de control de expresión estarán típicamente dentro de 1 a 1.000 nucleótidos del polinucleótido.

[0092] Funcionalmente, la expresión del polinucleótido heterólogo operativamente enlazado es al menos en parte controlable por el elemento (por ejemplo, promotor) de tal manera que el elemento modula la transcripción del polinucleótido y, según sea el caso, la traducción de la transcripción. Un ejemplo específico de un elemento de control de expresión es un promotor, que normalmente se encuentra en 5' de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de un elemento de control de expresión es un potenciador, que puede estar localizado en 5', 3' de la secuencia transcrita, o dentro de la secuencia transcrita.

[0093] Un "promotor" según se usa aquí se puede referir a una secuencia de ADN que se encuentra adyacente a una secuencia de polinucleótidos que codifica un producto recombinante. Un promotor está normalmente enlazado operativamente a una secuencia adyacente, por ejemplo, polinucleótido heterólogo. Un promotor típicamente aumenta una cantidad expresada a partir de un polinucleótido heterólogo en comparación con una cantidad expresada cuando no existe ningún promotor.

[0094] Un "potenciador" según se usa aquí puede referirse a una secuencia que se encuentra adyacente al polinucleótido heterólogo. Los elementos potenciadores se encuentran normalmente corriente arriba de un elemento promotor, pero también funcionan y pueden estar situados corriente abajo de o dentro de una secuencia de ADN (por ejemplo, un polinucleótido heterólogo). Por lo tanto, un elemento potenciador puede estar localizado 100 pares de base, 200 pares de base, o 300 o pares de base más corriente arriba o corriente abajo de un polinucleótido heterólogo. Los elementos potenciadores aumentan típicamente la expresión de un polinucleótido heterólogo anterior sobre la expresión aumentada proporcionada por un elemento promotor.

[0095] Los elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotores) incluyen aquellos activos en un tejido particular o tipo celular, denominado aquí como "elementos / promotores del control de la expresión de tejido específico". Los elementos de control de expresión de tejido específico son típicamente activos en la célula o tejido específico (por ejemplo, hígado, cerebro, sistema nervioso central, la médula espinal, ojo, la retina, hueso, músculo, pulmón, páncreas, corazón, células de riñón, etc.). Los elementos de control de expresión son típicamente activos en estas células, tejidos u órganos debido a que son reconocidos por proteínas activadoras transcripcionales, u otros reguladores de la transcripción, que son únicos para una célula, tejido o tipo de órgano específico.

[0096] Por ejemplo, si se desea la expresión en el músculo esquelético, se puede usar un promotor activo en el músculo. Estos incluyen promotores de genes que codifican la α -actina esquelética, miosina 2A cadena ligera, distrofina, creatina quinasa muscular, así como promotores musculares sintéticos con actividades superiores que los promotores de origen natural (ver, por ejemplo, Li, et al., *Nat. Biotech.* 17:241-245 (1999)). Ejemplos de promotores que son específicos de tejido para el hígado son la albúmina, Miyatake, et al. *J. Virol.*, 71:5124-32 (1997); promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig, et al., *Gene Ther.* 3:1002-9 (1996); alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot, et

al., *Hum. Gene. Ther.*, 7:1503-1514 (1996)], el 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; receptor de células T de una cadena), promotor neuronal (enolasa neuronal específica (NSE), Andersen, et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993); gen de cadena ligera de neurofilamento, Piccioli, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:5611-5 (1991); el gen vgf específico de neuronas, Piccioli et al., *Neuron.*, 15:373-84 (1995)], entre otros.

[0097] Los elementos de control de expresión también incluyen promotores / potenciadores ubicuos o promiscuos que son capaces de dirigir la expresión de un polinucleótido en muchos tipos de células diferentes. Tales elementos incluyen, pero no se limitan a secuencias de promotor / potenciador inmediato temprano de citomegalovirus (CMV), secuencias de promotor / potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV) y otros promotores / potenciadores virales activos en una variedad de tipos de células de mamíferos, o elementos sintético que no están presentes en la naturaleza (ver, por ejemplo, Boshart et al., *Cell*, 41:521-530 (1985)), el promotor SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor β -actina citoplasmática y el promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK).

[0098] Los elementos de control de la expresión también pueden conferir expresión en una manera que es regulable, es decir, una señal o estímulos aumenta o disminuye la expresión del polinucleótido heterólogo operativamente enlazado. Un elemento regulable que aumenta la expresión del polinucleótido operativamente enlazado en respuesta a una señal o estímulos también se conoce como un "elemento inducible" (es decir, es inducido por una señal). Los ejemplos particulares incluyen, pero no se limitan a, un promotor inducible de hormona (por ejemplo, esteroides). Un elemento regulable que disminuye la expresión del polinucleótido operativamente enlazado en respuesta a una señal o estímulos se conoce como un "elemento reprimible" (es decir, la señal disminuye la expresión de tal manera que cuando la señal, se retira o está ausente, la expresión se incrementa). Típicamente, la cantidad de aumento o disminución conferida por tales elementos es proporcional a la cantidad de señal o estímulos presente; cuanto mayor es la cantidad de señal o estímulos, mayor es el aumento o disminución de la expresión. Los ejemplos particulares no limitantes incluyen el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc; el promotor del virus del tumor mamario (MMTV) inducible por hormona esteroide; el sistema promotor de polimerasa T7 (WO 98/10088); el sistema reprimible por tetraciclina (Gossen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5547-5551 (1992)); el sistema inducible por tetraciclina (Gossen, et al., *Science*. 268:1766-69 (1995); ver 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 elementos de control

regulable que pueden ser útiles en este contexto son los que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, la temperatura, la fase aguda.

[0099] Los elementos de control de la expresión incluyen también el(los) elemento(s) nativos(s) para el polinucleótido heterólogo. Un elemento de control nativo (por ejemplo, promotor) se puede usar cuando se desea que la expresión del polinucleótido heterólogo debe imitar la expresión nativa. El elemento nativo se puede usar cuando la expresión del polinucleótido heterólogo se va a regular temporalmente o con el desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. También se pueden usar otros elementos de control de expresión nativos, tales como intrones, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso Kozak.

[0100] Tal como se utiliza en la presente, el término “enlace operativo” u “operativamente enlazado” se refiere a una yuxtaposición física o funcional de los componentes descritos de tal manera para permitirles funcionar en su manera prevista. En el ejemplo de un elemento de control de la expresión en enlace operativo con un polinucleótido, la relación es tal que el elemento de control modula la expresión del ácido nucleico. Más específicamente, por ejemplo, dos secuencias de ADN unidas operativamente significa, que los dos ADN están dispuestos (cis o trans) en una relación tal, que al menos una de las secuencias de ADN es capaz de ejercer un efecto fisiológico sobre la otra secuencia.

[0101] Los vectores que incluyen vectores AAV pueden incluir todavía elementos de ácido nucleico adicionales. Estos elementos incluyen, sin limitación una o más copias de una secuencia de la ITR de AAV, un elemento promotor/potenciador, una señal de terminación de la transcripción, 5' ó 3' regiones no traducidas (por ejemplo, secuencias de poliadenilación) que flanquean una secuencia de polinucleótidos, o la totalidad o una porción de intrón I. Dichos elementos también incluyen opcionalmente una señal de terminación de la transcripción. Un particular ejemplo no limitante de una señal de terminación de la transcripción es la señal de terminación de la transcripción de SV40.

[0102] Como se describe en la presente, los vectores AAV normalmente aceptan insertos de ADN que tienen un intervalo de tamaño definido, que es generalmente de aproximadamente 4 kb a aproximadamente 5,2 kb, o un poco más. Por lo tanto, para las secuencias más cortas, la inclusión de una embutidora o relleno en el fragmento de inserción con el fin de ajustar la longitud cerca de o al tamaño normal de la secuencia genómica del virus aceptable para el empaquetado del vector AAV en partículas de virus. En diversas modalidades, una secuencia de ácido nucleico de relleno/embutidora es un segmento (de codificación no proteica) no traducida del ácido nucleico. En modalidades particulares de un vector AAV, una secuencia de polinucleótido heterólogo tiene una longitud de menos de 4,7 Kb y una secuencia de polinucleótidos de relleno o embutidora tiene una longitud que cuando se combina (por ejemplo, insertado en un vector) con la secuencia de polinucleótido heterólogo tiene una longitud total entre aproximadamente 3.0-5.5Kb, o entre aproximadamente 4.0-5.0Kb, o entre aproximadamente 4.3-4.8Kb.

[0103] Un intrón puede funcionar también como una secuencia de polinucleótido de relleno o embutidora con el fin de lograr una longitud para el empaquetado del vector AAV en una partícula de virus. Los intrones y fragmentos de intrón (por ejemplo, porción del intrón I de FIX) que funcionan como una secuencia de polinucleótidos de relleno o embutidora pueden también mejorar la expresión. Por ejemplo, la inclusión de un elemento intrón puede mejorar la expresión en comparación con la expresión en ausencia del elemento intrón (Kurachi et al., 1995, supra).

[0104] El uso de intrones no se limita a la inclusión de secuencias de intrón I FIX, sino que también incluye otros intrones, cuyos intrones pueden estar asociados con el mismo gen (por ejemplo, donde el polinucleótido heterólogo codifica FIX, el intrón se deriva a partir de un intrón presente en la secuencia genómica FIX) o asociados con un gen completamente diferente u otra secuencia de ADN. Por consiguiente, otras regiones (de codificación no proteica) no traducidas de ácido nucleico, tales como los intrones encontrados en las secuencias genómicas de genes afines (relacionados) (la secuencia de polinucleótido heterólogo codifica todas o una porción de la misma proteína codificada por la secuencia genómica) y los genes no afines (no relacionados) (la secuencia de polinucleótido heterólogo codifica una proteína que es distinta de la proteína codificada por la secuencia genómica) también pueden funcionar como secuencias de polinucleótidos de relleno o embutidora de acuerdo con la invención.

[0105] Una "porción de intrón I" tal como es utilizado en la presente, hace referencia a la región del intrón I que tiene una longitud de nucleótidos desde aproximadamente 0,1 kb a aproximadamente 1,7 kb, cuya región mejora la expresión de FIX, normalmente en alrededor de 1,5 veces o más en un plásmido o patrón de vector viral cuando se compara con la expresión de FIX en ausencia de una porción de intrón I. Una porción más específica es una porción 1,3 kb de intrón 1.

[0106] El término "oligonucleótido" tal como se utiliza en la presente, se refiere a las secuencias, cebadores y sondas, definidos como una molécula de ácido nucleico comprendida de dos o más ribo- ó desoxirribonucleótidos, normalmente más de tres. El tamaño exacto del oligonucleótido dependerá de diversos factores, y en el aplicación particular, así como el uso del oligonucleótido, pero normalmente un oligonucleótido tiene una longitud de entre aproximadamente 5-50 nucleótidos.

[0107] El término "cebador" tal como se utiliza en la presente, se refiere a un oligonucleótido de ADN, ya sea mono- o bicatenario, ya sea derivado de un sistema biológico, generado por la digestión de la enzima de restricción, o producido sintéticamente que, cuando se coloca en el ambiente adecuado, es capaz de actuar funcionalmente como un iniciador de la síntesis de ácido nucleico dependiente del patrón. Cuando se presenta con un patrón de ácido nucleico apropiado, los precursores nucleósidos trifosfato adecuados de ácidos nucleicos, una enzima polimerasa, cofactores y condiciones adecuadas, tales como una temperatura y pH adecuados, el cebador pueden ser extendido en su extremo 3' mediante la adición de nucleótidos por la acción de una polimerasa o actividad similar para producir un producto de extensión del cebador. El cebador puede variar en

longitud dependiendo de las condiciones y los requisitos particulares de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico, el cebador oligonucleotídico es normalmente de 15-30 o más nucleótidos de longitud. El cebador debe ser de complementariedad suficiente al patrón deseado para cebar la síntesis del producto de extensión deseado, es decir, para hibridarse con la cadena de patrón deseada de forma suficiente para proporcionar porciones de hidroxilo 3' del cebador en yuxtaposición adecuada para su uso en la iniciación de la síntesis por una polimerasa o una enzima similar. No es necesario que la secuencia del cebador represente un complemento exacto del patrón deseado. Por ejemplo, una secuencia de nucleótido no complementario, puede estar unido al extremo 5' de un cebador complementario de otro modo. Alternativamente, las bases no complementarias pueden ser intercaladas dentro de la secuencia del cebador de oligonucleótido, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena de patrón deseada para proporcionar funcionalmente un complejo cebador patrón para la síntesis del producto de extensión.

[0108] La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido descrito en las Patentes US N° 4,683,195, 4,800,195 y 4,965,188.

[0109] La frase “hibridar específicamente” se refiere a la asociación entre dos moléculas de ácido nucleico monocatenarias de secuencia suficientemente complementaria para permitir la hibridación bajo condiciones predeterminadas utilizadas generalmente en la técnica (a veces denominada “sustancialmente complementaria”). En particular, el término se refiere a la hibridación de dos secuencias de polinucleótidos con secuencias sustancialmente complementarias, a la exclusión sustancial de la hibridación con otras secuencias de ácidos nucleicos no complementarias monocatenarias.

[0110] Un “gen marcador seleccionable” se refiere a un gen que cuando se expresa confiere un fenotipo seleccionable, tal como la resistencia a los antibióticos (por ejemplo, kanamicina), en una célula transformada. Un gen “informador” es aquel que proporciona una señal detectable. Un ejemplo no limitante de un gen informador es el gen de la luciferasa.

[0111] Los polinucleótidos y polipéptidos, incluyendo las formas modificadas pueden ser hechas usando diversos clonación estándar, tecnología de ADN recombinante, a través de la expresión de células o en técnicas de síntesis de traducción y química in vitro. La pureza de los polinucleótidos puede determinarse mediante la secuenciación, la electroforesis en gel y similares. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden ser aislados utilizando la hibridación o técnicas de revisión de la base de datos basados en computadoras. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a: (1) la hibridación de bibliotecas de ADN o de ADNc genómicas con sondas para detectar secuencias de nucleótidos homólogas; (2) la revisión de los anticuerpos para detectar polipéptidos que tienen características estructurales compartidas, por ejemplo, usando una biblioteca de expresión; (3) la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ADN o ADNc genómico usando cebadores capaces de

hibridar la secuencia de ácido nucleico de interés; (4) búsquedas informáticas de bases de datos de secuencias para secuencias relacionadas; y (5) revisión diferencial de una biblioteca de ácido nucleico sustraída.

[0112] Los polinucleótidos y polipéptidos, que incluyen formas modificadas también pueden ser producidas mediante síntesis química utilizando métodos para el técnico experto, por ejemplo, un aparato de síntesis automatizada (véase, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City, CA). Los péptidos pueden ser sintetizados, en conjunto o en parte, utilizando métodos químicos (véase, por ejemplo, Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res Symp Ser* 215;.... Horn (1980); y Banga, AK, Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA). La síntesis de péptidos puede realizarse usando diversas técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Roberge *Science* 269:202 (1995); Merrifield, *Methods Enzymol.* 289:3(1997))) y la síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, utilizando el ABI 431A Péptido Synthesizer (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0113] El término “aislado”, cuando se usa como un modificador de una composición, significa que las composiciones son hechas por la mano del hombre o están separadas, por completo o por lo menos en parte, de su entorno de origen natural in vivo. Generalmente, las composiciones aisladas son sustancialmente libres de uno o más materiales con los que normalmente en la naturaleza se asocian a, por ejemplo, una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, membrana celular. El término “aislado” no excluye combinaciones producidas por la mano del hombre, por ejemplo, una secuencia vector recombinante (por ejemplo, AAV), o partículas de virus (por ejemplo, vector AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) que encapsida o empaqueta un genoma del vector y una formulación farmacéutica. El término “aislado” también no excluye formas físicas alternativas de la composición, tales como híbridos/quimeras, multímeros/oligómeros, modificaciones (por ejemplo, fosforilación, glicosilación, lipidación) o formas derivatizadas, o formas expresadas en células huésped producidas por la mano de hombre.

[0114] Los métodos y usos de la invención proporcionan un medio para suministrar (transducir) polinucleótidos heterólogos (transgenes) en una amplia gama de células huésped, incluyendo tanto la división y las células que no se dividen. Las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, AAV), plásmidos, genomas de vectores, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)), métodos, usos y formulaciones farmacéuticas de la invención son adicionalmente útiles en un método para administrar una proteína, péptido o ácido nucleico a un sujeto en necesidad del mismo, como un método de tratamiento. De esta manera, la proteína, péptido o ácido nucleico pueden así ser producidos in vivo en un sujeto. El sujeto puede beneficiarse o estar en necesidad de la proteína, péptido o ácido nucleico debido a que el sujeto tiene una deficiencia de la proteína,

péptido o ácido nucleico, o porque la producción de la proteína, péptido o ácido nucleico en el sujeto puede impartir algún efecto terapéutico, como un método de tratamiento o de otra manera. Alternativamente, puede ser deseable para inhibir o reducir la expresión o la producción de un gen objetivo involucrado en un proceso de la enfermedad, por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, cáncer o aterosclerosis, por ejemplo, para conseguir un efecto terapéutico.

[0115] En general, las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, AAV), plásmidos, genomas de vectores, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)), métodos y usos pueden ser utilizados para entregar cualquier polinucleótido heterólogo (transgén) con un efecto biológico para tratar o mejorar uno o más síntomas asociados con cualquier trastorno relacionado con la expresión génica insuficiente o indeseable. Las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, AAV), plásmidos, genomas de vectores, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) partículas, métodos y usos de mayo ser utilizados para proporcionar terapia a diversos estados de enfermedad.

[0116] Hay una serie de enfermedades hereditarias en las que se conocen los genes defectuosos y han sido clonados. En general, los estados de las enfermedades anteriores se dividen en dos clases: los estados de deficiencia, por lo general de enzimas, que generalmente se heredan de manera recesiva, y los estados de desequilibrio, que por lo menos a veces implican proteínas reguladoras o estructurales, que se heredan de una manera dominante. Para las enfermedades estado de deficiencia, la transferencia génica podría usarse para llevar un gen normal a los tejidos afectados para la terapia de sustitución, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando mutaciones antisentido. Para los estados de enfermedad desequilibradas, la transferencia génica podría usarse para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que luego podría utilizarse en esfuerzos para contrarrestar el estado de enfermedad. Por lo tanto, las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, AAV), plásmidos, genomas de vectores, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, vectores AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados, tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)), métodos y usos permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. Tal como se utiliza en la presente, un estado de enfermedad es tratado mediante la cura parcial o total de la deficiencia o desequilibrio que causa la enfermedad o la hace más grave. El uso de la integración específica de sitio de secuencias de ácidos nucleicos para causar mutaciones o para corregir defectos también es posible.

[0117] Los estados de enfermedad ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: fibrosis quística (y otras enfermedades del pulmón), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos de la coagulación de la sangre, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad

de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, la epilepsia y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (por ejemplo, Duchenne, Becker), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina desaminasa, enfermedades de almacenamiento de glucógeno y otros defectos metabólicos, enfermedad de Pompe, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades degenerativas retinianas (Choroideremia, amaurosis congénita de Leber, y otras enfermedades de los ojos), enfermedades de los órganos sólidos (por ejemplo, cerebro, hígado, riñón, corazón), y similares.

[0118] De acuerdo con la invención, se proporcionan métodos de tratamiento y usos que incluyen los vectores recombinantes de la invención (por ejemplo, AAV), genomas de vectores, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, vectores AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados, tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) y las partículas virales de la invención (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)), incluyendo genomas vectoriales. Los métodos y usos de la invención son ampliamente aplicables a las enfermedades susceptibles de tratamiento mediante la introducción de un gen que codifica una proteína, o el aumento o la estimulación de la expresión génica o la función, por ejemplo, la adición o sustitución de genes. Los métodos y usos de la invención también son ampliamente aplicables a las enfermedades susceptibles de tratamiento mediante la reducción o disminución de la expresión génica o la función, por ejemplo, la eliminación de genes o la reducción de la expresión génica (disminución génica).

[0119] Los ejemplos no limitantes particulares de enfermedades tratables de acuerdo con la invención incluyen aquellos que se exponen en el presente documento, así como una enfermedad pulmonar (por ejemplo, fibrosis quística), una coagulación de la sangre o trastorno de pérdida de sangre (por ejemplo, hemofilia A o hemofilia B con o sin inhibidores), talasemia, un trastorno de la sangre (por ejemplo, anemia), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), epilepsia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, trastornos de acumulación de cobre o de hierro (por ejemplo, la enfermedad de Menkes de Wilson) deficiencia de la lipasa ácida lisosómica, una enfermedad neurológica o neurodegenerativa, el cáncer, la diabetes tipo 1 o tipo 2 o, la enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina desaminasa, un defecto metabólico (por ejemplo, enfermedades de almacenamiento de glucógeno), una enfermedad degenerativa de la retina (tales como la deficiencia de RPE65 o malformación, coroideremia, y otras enfermedades del ojo), así como una enfermedad de un órgano sólido (por ejemplo, cerebro, hígado, riñón, corazón).

[0120] Además, los vectores recombinantes de la invención (por ejemplo, AAV), genomas de vectores, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, vectores AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)), métodos y usos pueden ser empleados para suministrar ácidos nucleicos que codifican

anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos para proporcionar efectos biológicos beneficiosos para tratar o mejorar los síntomas asociados con el cáncer, enfermedades infecciosas, y enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide.

[0121] En una modalidad, un método o uso de la invención incluye: (a) proporcionar una partícula viral (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1)) que comprende un genoma de vector, el genoma vector que comprende una secuencia de polinucleótido heterólogo (y, opcionalmente, una secuencia de polinucleótidos de relleno/embutidora), en el que la secuencia de polinucleótido heterólogo está unida operativamente a un elemento de control de la expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia de polinucleótido; y (b) administrar una cantidad de la partícula viral al mamífero de manera que dicho polinucleótido heterólogo se exprese en el mamífero.

[0122] En otra modalidad, un método o uso de la invención incluye la entrega o transferencia de una secuencia de polinucleótido heterólogo a un mamífero o a una célula de un mamífero, mediante la administración de una partícula de (por ejemplo, AAV) virus (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) o pluralidad de partículas de (por ejemplo, AAV) virus (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) que comprende un genoma de vector, el genoma del vector que comprende la secuencia de polinucleótidos heterólogo (y, opcionalmente, una secuencia de polinucleótidos de relleno/embutidora) a un mamífero o a una célula de un mamífero, suministrando o transfiriendo de este modo la secuencia de polinucleótido heterólogo al mamífero o célula de el mamífero.

[0123] En una modalidad adicional, un método o uso de la invención para el tratamiento de un mamífero deficiente en necesidad de expresión o función de la proteína incluye proporcionar una partícula (por ejemplo, AAV) viral (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) o pluralidad de partículas virales (por ejemplo, AAV) (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) que comprende una genoma del vector, el genoma del vector que comprende una secuencia de polinucleótido heterólogo (y, opcionalmente, una secuencia de polinucleótidos de relleno/embutidora); y la administración de la partícula viral o una pluralidad de partículas virales al mamífero, donde la secuencia de polinucleótido heterólogo codifica una proteína expresada en el mamífero, o donde la secuencia de polinucleótido heterólogo codifica una secuencia inhibidora o proteína que reduce la expresión de una proteína endógena en el mamífero.

[0124] En aspectos particulares de los métodos de la invención y usos divulgados en el presente documento, la expresión del polinucleótido heterólogo codifica una proteína o ácido nucleico inhibidor que proporciona un beneficio terapéutico al mamífero (por ejemplo, humano). En otros

aspectos particulares, una secuencia de polinucleótidos de relleno/embutidora está incluida en la secuencia del vector de tal manera que la longitud combinada con la secuencia de polinucleótido heterólogo tiene una longitud total de entre aproximadamente 3.0-5.5Kb, o entre aproximadamente 4.0-5.0Kb, o entre aproximadamente 4.3-4.8Kb.

[0125] Los métodos y usos de la invención incluyen métodos de tratamiento, que dan como resultado algún efecto terapéutico o beneficioso. En diversos métodos y usos de la invención, incluyendo algunos otros, existen la inhibición, disminución o reducción de uno o más síntomas (por ejemplo, físicos), trastornos, enfermedades o complicaciones adversos causadas o asociadas con la enfermedad, tales como la reducción del tiempo de coagulación de la sangre, la administración reducida de dosis de proteína del factor de coagulación suplementario.

[0126] Por lo tanto, un efecto terapéutico o beneficioso del tratamiento es alguna mejora o beneficio medible o detectable objetivo o subjetivo proporcionado a un sujeto en particular. Un efecto terapéutico o beneficioso puede pero no tiene por qué ser la ablación completa de todos o cualquier particular síntoma, desorden, enfermedad o complicación adversa de una enfermedad. Por lo tanto, un criterio de valoración clínico satisfactorio se logra cuando hay una mejora incremental o una reducción parcial de un síntoma, trastorno, enfermedad o complicación adversa causada o asociada con una enfermedad, o una inhibición, disminución, reducción, supresión, prevención, limitación o control del empeoramiento o progresión de una o más síntomas, trastornos, enfermedades o complicaciones adversas causadas o asociadas con la enfermedad, a través de una corta o larga duración (horas, días, semanas, meses, etc.).

[0127] Las composiciones, tales como los genomas de vectores, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, vectores AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados, tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)), incluyendo los genomas de vectores, y métodos y usos de la invención, pueden ser administradas en una cantidad suficiente o eficaz a un sujeto en necesidad de los mismos. Una “cantidad eficaz” o “cantidad suficiente” se refiere a una cantidad que proporciona, en dosis únicas o múltiples, solas o en combinación, con una o más composiciones (agentes terapéuticos tales como un fármaco), tratamientos, protocolos, o agentes de regímenes terapéuticos, una respuesta detectable de cualquier duración de tiempo (corto o largo plazo), un resultado esperado o deseado o un beneficio a un sujeto de cualquier grado medible o detectable o por cualquier período de tiempo (por ejemplo, para minutos, horas, días, meses, años, o curados).

[0128] La dosis de genoma del vector o partícula o virus (por ejemplo, AAV, tales como el vector AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) para conseguir un efecto terapéutico, por ejemplo, la dosis en los genomas de vector/por kilogramo de peso corporal (vg/kg), variará en función de varios factores, incluyendo, pero no limitado a: la vía de administración, el nivel de expresión polinucleótido

heterólogo requerido para lograr un efecto terapéutico, la enfermedad específica tratada, cualquier respuesta inmune del huésped al vector viral, una respuesta inmune del huésped al polinucleótido heterólogo o producto de expresión (proteína), y la estabilidad de la proteína expresada. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un intervalo de dosis del virión para tratar un paciente que tiene una enfermedad o trastorno en particular basada en los factores antes mencionados, así como otros factores. Generalmente, las dosis variarán desde al menos 1×10^8 , o más, por ejemplo, 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} o 1×10^{14} o más, genomas de vector por kilogramo (vg/kg) del peso del sujeto, para lograr un efecto terapéutico.

[0129] En términos generales, se cree que, el uso de hemofilia, como un ejemplo, para lograr un efecto terapéutico, es necesaria una concentración de factor de coagulación de la sangre que sea mayor al 1% de la concentración del factor encontrado en un individuo normal para cambiar un fenotipo de la enfermedad grave a una moderada. Un fenotipo severo se caracteriza por el daño articular y las hemorragias potencialmente mortales. Se cree que para convertir un fenotipo de la enfermedad moderada en uno leve, es necesaria una concentración de factor de coagulación de la sangre mayor al 5% de lo normal. Con respecto al tratamiento de por ejemplo un sujeto hemofílico, una dosis típica es de por lo menos genomas de vector de 1×10^{10} (vg) por kilogramo (vg/kg) del peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{10} a 1×10^{11} vg/kg del peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{11} a 1×10^{12} vg / kg del peso del sujeto, o entre aproximadamente 1×10^{12} a 1×10^{13} vg/kg del peso del sujeto, para lograr un efecto terapéutico deseado.

[0130] Las dosis de una “cantidad eficaz” o “cantidad suficiente” para el tratamiento (por ejemplo, para mejorar o para proporcionar un beneficio o mejora terapéutica) normalmente son eficaces para dar respuesta a uno, varios o todos los síntomas, consecuencias o complicaciones adversas de la enfermedad, uno o más síntomas, trastornos, enfermedades, patologías o complicaciones adversas, por ejemplo, causados por o asociados con la enfermedad, en un grado medible, aunque el decrecimiento, reducción, inhibición, supresión, limitación o control de la progresión o empeoramiento de la enfermedad sea un resultado satisfactorio.

[0131] Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente pueden, pero no necesitan ser proporcionadas en una sola administración, pueden requerir múltiples administraciones, y, pueden pero no necesitan ser administradas solas o en combinación con otra composición (por ejemplo, agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico. Por ejemplo, la cantidad puede aumentarse proporcionalmente tal como se indica, por la necesidad del sujeto, el tipo, el estado y la gravedad de la enfermedad tratada o de los efectos secundarios (si los hubiera) del tratamiento. Además, una cantidad eficaz o una cantidad suficiente no necesita ser eficaz o suficiente si se administra en dosis únicas o múltiples sin una segunda composición (por ejemplo, otro fármaco o agente), tratamiento, protocolo o régimen terapéutico, ya que las dosis, cantidades o duración adicionales más allá de tales dosis o composiciones adicionales (por ejemplo, fármacos o agentes), tratamientos, protocolos o regímenes

terapéuticos pueden ser incluidos con el fin de ser considerados eficaces o suficientes en un sujeto determinado. Las cantidades consideradas eficaces también incluyen cantidades que resultan en una reducción del uso de otro tratamiento, régimen o protocolo terapéutico, tales como la administración de la proteína de factor de coagulación recombinante para el tratamiento de un trastorno de coagulación (por ejemplo, hemofilia A o B).

[0132] Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente no necesitan ser eficaces en todo y cada sujeto tratado, ni la mayoría de sujetos tratados en un grupo o población dado. Una cantidad eficaz o una cantidad suficiente se refiere a la efectividad o la eficiencia en un sujeto en particular, no un grupo o la población en general. Como es típico en tales métodos, algunos sujetos exhibirán una respuesta mayor, menor o ninguna respuesta a un método de tratamiento o uso dado. Por lo tanto, las cantidades apropiadas dependerán de la condición tratada, el efecto terapéutico deseado, así como el sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad dentro del sujeto, género, edad, etc.).

[0133] El término “mejorar” se refiere a una mejora detectable o medible en la enfermedad de un sujeto o síntoma de la misma, o una respuesta celular subyacente. Una mejora detectable o medible incluye una disminución subjetiva u objetiva, la reducción, inhibición, supresión, limitación o control en la ocurrencia, frecuencia, severidad, progresión, o la duración de la enfermedad, o complicación causada por o asociada con la enfermedad, o una mejora en un síntoma o una causa subyacente o una consecuencia de la enfermedad, o un retorno de la enfermedad.

[0134] Por lo tanto, un resultado exitoso del tratamiento puede conducir a un “efecto terapéutico” o “beneficio” de disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación, control o prevención de la ocurrencia, frecuencia, severidad, progresión, o duración de una enfermedad, o uno o más síntomas adversos o causas subyacentes o consecuencias de la enfermedad en un sujeto. Por lo tanto, los métodos de tratamiento y usos que afectan a una o más causas subyacentes de la enfermedad o síntomas adversos se consideran beneficiosos. Una disminución o reducción en el empeoramiento, tales como la estabilización de la enfermedad, o un síntoma adverso de la misma, es también un resultado de tratamiento exitoso.

[0135] Por lo tanto, un beneficio o mejora terapéutica, no necesita ser ablación completa de la enfermedad, o cualquiera otra de la mayoría o todos los síntomas, complicaciones, consecuencias adversas o causas subyacentes asociadas con la enfermedad. De este modo se consigue un resultado satisfactorio cuando hay una mejora incremental en la enfermedad de un sujeto, o una disminución, reducción, inhibición, supresión, limitación, control o prevención parcial de la aparición, frecuencia, severidad, progresión, o duración, o la inhibición o reversión, de la enfermedad (por ejemplo, la estabilización de uno o más síntomas o complicaciones), durante un período corto o largo de tiempo (horas, días, semanas, meses, etc.). La eficacia de un método o uso, tales como un tratamiento que proporciona un beneficio terapéutico potencial o mejora de una enfermedad, puede determinarse por varios métodos.

[0136] Los métodos y usos de la invención pueden ser combinados con cualquier compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen o protocolo terapéutico que tiene una actividad o efecto terapéutico deseado, beneficioso, aditivo, sinérgico o complementario. Las composiciones y tratamientos de combinación de ejemplos incluyen segundos activos, como por ejemplo, productos biológicos (proteínas), agentes y fármacos. Tales productos biológicos (proteínas), agentes, fármacos, tratamientos y terapias pueden ser administradas o realizadas antes de, sustancialmente simultáneo con, o después de cualquier otro método o uso de la invención, por ejemplo, un método terapéutico de tratamiento a un sujeto para una enfermedad de coagulación de la sangre.

[0137] El compuesto, agente, fármaco, tratamiento u otro régimen o protocolo terapéutico puede ser administrado como una composición de combinación, o administrada por separado, tales como al mismo tiempo o en serie o secuencialmente (antes o después) del suministro o administración de un genoma del vector o virus (por ejemplo, vector AAV-Rh74 o vector AAV relacionados, tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona combinaciones en las que un método o uso de la invención está en una combinación con cualquier compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso, remedio o composición, descritos en el presente documento o conocidos por un experto en la materia. El compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso, remedio o composición puede ser administrado o realizado antes de, sustancialmente simultáneo con o después de la administración de un genoma de vector o virus (por ejemplo, vector AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados, como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) de la invención, a un sujeto. Los ejemplos específicos no limitantes de modalidades de combinación incluyen, por tanto, los anteriores y los otros compuestos, agentes, fármacos, regímenes terapéuticos, protocolos de tratamiento, procesos, remedios o composición.

[0138] Los métodos y usos de la invención también incluyen, entre otras cosas, los métodos y usos que se traducen en una reducción de la necesidad o el uso de otro compuesto, agente, fármaco, régimen terapéutico, protocolo de tratamiento, proceso o remedio. Por ejemplo, para una enfermedad de coagulación de la sangre, un método o uso de la invención tiene un beneficio terapéutico si en un sujeto dado tenga una dosis menos frecuente o reducida, o la eliminación de la administración de una proteína de factor de coagulación recombinante para complementar el factor de coagulación endógena deficiente o defectuoso (anormal o mutante) en el sujeto. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se proporcionan métodos y usos de la necesidad o uso de reducción de otros tratamientos o terapias.

[0139] La invención es útil en animales, incluyendo aplicaciones médicas veterinarias. Por lo tanto, los sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos, así como mamíferos no humanos. El término “sujeto” se refiere a un animal, generalmente un mamífero, tal como los seres

humanos, primates no humanos (monos, gibones, gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (aves de corral tales como pollos y patos, caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos) y animales de experimentación (ratón, rata, conejo, cuyes). Los sujetos humanos incluyen sujetos fetales, neonatales, infantiles, juveniles y adultos. Los sujetos incluyen modelos de enfermedades animales, por ejemplo, ratones y otros modelos de animales de enfermedades de coagulación de la sangre y otros conocidos por los expertos en la técnica.

[0140] Tal como se expone en el presente documento, las partículas de virus y vectores (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) que comprenden dichos vectores pueden ser utilizados para proporcionar una proteína a un sujeto, donde hay una cantidad insuficiente de la proteína o una deficiencia en un (proteína) producto génico funcional, o para proporcionar un ácido nucleico inhibidor o proteína a un sujeto que produce un producto génico aberrante, parcialmente funcional o no funcional (proteína) que puede conducir a la enfermedad. De acuerdo con ello, los sujetos apropiados para el tratamiento incluyen aquellos que tienen o corren el riesgo de producir una cantidad insuficiente o que tienen una deficiencia en un producto génico funcional (proteína), o producen un producto génico aberrante, parcialmente funcional o no funcional (proteína), que puede conducir a la enfermedad. Los sujetos apropiados para el tratamiento de acuerdo con la invención también incluyen aquellos que tienen o corren el riesgo de producir un producto génico (proteína) aberrante, o defectuoso (mutante) que conduce a una enfermedad tales que la reducción de las cantidades, la expresión o función del producto génico (proteína) aberrante, o defectuoso (mutante) conduciría a un tratamiento de la enfermedad, o reduciría uno o más síntomas o mejoraría la enfermedad. Por lo tanto, los sujetos meta incluyen sujetos que tienen tales defectos independientemente del tipo de enfermedad, el tiempo o el grado de aparición, progresión, gravedad, frecuencia, o el tipo o duración de los síntomas.

[0141] La “profilaxis” y las variaciones gramaticales de la misma se refieren un método en el que el contacto, la administración o suministro in vivo a un sujeto es anterior a la enfermedad. La administración o suministro in vivo a un sujeto puede realizarse antes del desarrollo de un síntoma, condición, complicación adversa, etc. causada por o asociado con la enfermedad. Por ejemplo, una pantalla (por ejemplo, genética) se puede utilizar para identificar tales sujetos como los candidatos para los métodos y usos de la invención, pero el sujeto puede no manifestar la enfermedad. Por tanto, tales sujetos incluyen aquellos seleccionados como positivo para una cantidad insuficiente o una deficiencia en un producto génico funcional (proteína), o que produzcan un producto génico (proteína) aberrante, parcialmente funcional o no funcional, que puede conducir a la enfermedad; y los sujetos que son seleccionados como positivo para un producto génico (proteína) aberrante, o defectuoso (mutante) que conduce a la enfermedad, a pesar de que tales sujetos no manifiestan síntomas de la enfermedad.

[0142] Los métodos y usos de la invención incluyen el suministro y administración sistémica, regional o local, o por cualquier vía, por ejemplo, por inyección, infusión, vía oral (por ejemplo, ingestión o inhalación), o por vía tópica (por ejemplo, por vía transdérmica). Tales tipos de suministro y administración incluyen la intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intracavitaria, intracraneal, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo, transmucosa o rectal. Las rutas de suministro y administración ejemplares incluyen la intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intraarterial, intramuscular, parenteral, subcutánea, intra-pleural, tópica, dérmica, intradérmica, transdérmica, parenteral, por ejemplo, transmucosal, intracraneal, intravertebral, oral (alimenticio), mucosal, por respiración, intranasal, por intubación, intrapulmonar, por instilación intrapulmonar, bucal, sublingual, intravascular, intratecal, intracavitaria, iontoforética, intraocular, oftálmica, óptica, intraglandular, intraorgánica, intralinfática.

[0143] Las dosis puede variar y dependerán de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico, el tipo, el inicio, la progresión, la gravedad, la frecuencia, la duración, o la probabilidad de la enfermedad a la que el tratamiento se dirige, el resultado clínico deseado, los tratamientos previos o simultáneos, la salud general, la edad, el género, la raza o la competencia inmunológica del sujeto y otros factores que será apreciado por el experto en la materia. La cantidad de dosis, número, frecuencia o duración pueden aumentar o disminuir proporcionalmente, según lo indiquen los efectos secundarios, complicaciones u otros factores de riesgo adversos del tratamiento o terapia y el estado del sujeto. El experto apreciará los factores que pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para proporcionar una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico o profiláctico.

[0144] Los métodos y usos de la invención tal como se divulga en la presente puede ser practicado dentro de 1-2, 2-4, 4-12 12-24 ó 24-72 horas después de que un sujeto haya sido identificado como portador de la enfermedad específica para el tratamiento, tenga uno o más síntomas de la enfermedad, o haya sido señalado e identificado como positivo tal como se establece en el presente documento, a pesar de que el sujeto no tenga uno o más síntomas de la enfermedad. Por supuesto, los métodos y usos de la invención pueden ser practicados 1-7, 7-14, 14-21, 21-48 o más días, meses o años después de que un sujeto haya sido identificado como portador de la enfermedad específica para el tratamiento, tenga una o más síntomas de la enfermedad, o haya sido señalado e identificado como positivo tal como se establece en el presente documento.

[0145] El vector recombinante (por ejemplo, AAV, tales como el vector AAV-Rh74 o el vector AAV relacionado tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)), las secuencias, plásmidos, genomas de vectores, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, AAV, tales como vectores AAV-Rh74 o vectores AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) y otras composiciones, agentes, fármacos, productos biológicos (proteínas) pueden ser incorporados en las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales

composiciones farmacéuticas son útiles para, entre otras cosas, la administración y el suministro a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

[0146] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” y “fisiológicamente aceptable” significa una formulación biológicamente aceptable, gaseosa, líquida o sólida, o una mezcla de los mismos, que es adecuada para una o más vías de administración, contacto o suministro *in vivo*. Una composición “farmacéuticamente aceptable” o “fisiológicamente aceptable” es un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, por ejemplo, el material puede ser administrado a un sujeto sin causar efectos biológicos indeseables sustanciales. Por lo tanto, una composición farmacéutica de este tipo puede ser utilizada, por ejemplo, en la administración de un vector viral o partícula viral (por ejemplo, AAV-Rh74 o AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) o célula transformada a un sujeto.

[0147] Tales composiciones incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), soluciones (acuosas o no acuosas), emulsiones (por ejemplo, aceite-en-agua o agua-en-aceite), suspensiones, jarabes, elixires, medios de dispersión y suspensión, revestimientos, agentes de retraso o fomentación a la absorción e isotónica, compatibles con la administración farmacéutica o el contacto o suministro *in vivo*. Los disolventes, soluciones y suspensiones acuosos y no acuosos, pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Tales vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen tabletas (recubiertas o sin recubrir), cápsulas (duras o blandas), microperlas, polvos, gránulos y cristales. Los compuestos activos suplementarios (por ejemplo, los agentes preservantes, antibacterianos, antivirales y antifúngicos) también pueden ser incorporados en las composiciones.

[0148] Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas para ser compatibles con una vía particular de administración o suministro, tal como se establece en el presente documento o conocido para un experto en la técnica. De este modo, las composiciones farmacéuticas incluyen vehículos, diluyentes, o excipientes adecuados para la administración por varias vías.

[0149] Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas y no acuosas del compuesto activo, en las que las preparaciones son normalmente estériles y puede ser isotónica con la sangre del receptor previsto. Los ejemplos ilustrativos, no limitantes incluyen agua, salina, dextrosa, fructosa, etanol, aceite animal, vegetal o sintético.

[0150] Para la administración transmucosa o transdérmica (por ejemplo, contacto tópico), los penetrantes pueden ser incluidos en la composición farmacéutica. Los penetrantes son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Para la administración transdérmica, el ingrediente activo puede ser formulado en aerosoles, sprays, ungüentos, pomadas, geles, o cremas tal como se conoce generalmente en la técnica. Para el contacto con la piel, las composiciones farmacéuticas

normalmente incluyen pomadas, cremas, lociones, pastas, geles, sprays, aerosoles o aceites. Los vehículos que pueden usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos, y combinaciones de los mismos.

[0151] Los co-disolventes y adyuvantes pueden ser añadidos a la formulación. Los ejemplos no limitantes de co-disolventes contienen grupos hidroxilos u otros grupos polares, por ejemplo, alcoholes, tales como alcohol isopropílico; glicoles, tales como propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, éter de glicol; glicerol; alcoholes de polioxietileno y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno. Los adyuvantes incluyen, por ejemplo, tensioactivos tales como, lecitina de soja y ácido oleico; ésteres de sorbitán tales como trioleato de sorbitán; y polivinilpirrolidona.

[0152] Las composiciones farmacéuticas y sistemas de suministro adecuados para los genomas de vectores, partículas de virus (por ejemplo, vector AAV-Rh74 o vector AAV relacionados, tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) y los métodos y usos de la invención, son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; and Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315).

[0153] Una "forma de dosificación unitaria" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada opcionalmente en asociación con un vehículo farmacéutico (excipiente, diluyente, vehículo o agente de relleno) que, cuando se administra en una o más dosis, se calcula para producir un efecto deseado (por ejemplo, efecto profiláctico o terapéutico). Las formas de dosificación unitaria pueden estar dentro de, por ejemplo, ampollas y viales, que pueden incluir una composición líquida, o una composición en un estado seco por congelación o liofilizado; un vehículo líquido estéril, por ejemplo, puede ser añadido antes de la administración o suministro in vivo. Las formas de dosificación unitaria individuales pueden ser incluidas en los kits o contenedores de dosis múltiples. Las secuencias de vector recombinante (por ejemplo, AAV), plásmidos, genomas de vector, partículas de virus recombinantes (por ejemplo, vector AAV-Rh74 o vector AAV relacionados tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1)), y las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden ser embaladas en forma de dosificación unitaria o múltiple para la facilidad del suministro y uniformidad de dosificación.

[0154] La invención proporciona kits con material de embalaje y uno o más componentes en el mismo. Un kit incluye normalmente una etiqueta o insertos de embalaje que incluye una descripción

de los componentes o instrucciones para el uso *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, de los componentes en los mismos. Un kit puede contener una colección de tales componentes, por ejemplo, un genoma de vector (por ejemplo, AAV) o partículas de virus (por ejemplo, vector AAV-Rh74 o vector AAV relacionados tales como variantes AAV-Rh74 tales como variantes de cápside (por ejemplo, RHM4-1)) y opcionalmente un segundo, tales como otro compuesto, agente, fármaco o composición activo.

[0155] Un kit se refiere a una estructura física que alberga uno o más componentes del kit. El material de embalaje puede mantener los componentes de forma estéril, y pueden ser hechos de un material comúnmente utilizado para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, viales, tubos, etc.).

[0156] Las etiquetas o insertos pueden incluir información de la identificación de uno o más componentes de los mismos, cantidades de dosis, farmacología clínica del ingrediente(s) activo, incluyendo el mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinámica. Las etiquetas o insertos pueden incluir información que identifican al fabricante, números de lote, lugar y fecha de fabricación, fechas de caducidad. Las etiquetas o insertos pueden incluir información que identifica la información del fabricante, números de lote, lugar y fecha del fabricante. Las etiquetas o insertos pueden incluir información sobre una enfermedad para la que se puede utilizar un componente del kit. Las etiquetas o insertos pueden incluir instrucciones para el médico clínico o sujeto para el uso de uno o más de los componentes del kit en un método, uso, o protocolo de tratamiento o régimen terapéutico. Las instrucciones pueden incluir cantidades de dosis, frecuencia o duración, y las instrucciones para la práctica de cualquiera de los métodos, usos, protocolos de tratamiento o régimen profiláctico o terapéutico que se describen en el presente documento.

[0157] Las etiquetas o insertos pueden incluir información sobre cualquier beneficio que puede proporcionar un componente, tales como un beneficio profiláctico o terapéutico. Las etiquetas o insertos pueden incluir información sobre los efectos potenciales adversos secundarios, complicaciones o reacciones, tales como las advertencias para el sujeto o el médico con respecto a las situaciones en las que no sería apropiado utilizar una composición particular. Los efectos secundarios adversos o complicaciones también pueden ocurrir cuando el sujeto tiene, tomará o actualmente está tomando uno o más medicamentos que pueden ser incompatibles con la composición, o el sujeto tiene, estará o actualmente está pasando por otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico que sería incompatible con la composición y, por lo tanto, las instrucciones podrían incluir información con respecto a estas incompatibilidades.

[0158] Las etiquetas o insertos incluyen “materiales impresos”, por ejemplo, papel o cartón, separada o colocada en un componente, un kit o material de embalaje (por ejemplo, una caja), o unido a una ampolla, tubo o frasco que contiene un componente del kit. Las etiquetas o insertos pueden incluir adicionalmente un medio legible por ordenador, tales como una etiqueta impresa con código de barras, un disco, un disco óptico tal como CD- o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, cinta

magnética, o un medio de almacenamiento eléctrico tales como RAM y ROM o híbridos de los mismos tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos, medios flash o tarjetas de tipo memoria.

[0159] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento, tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que esta invención pertenece. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden ser utilizados en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados son descritos en el presente documento.

[0160] Todas las solicitudes, publicaciones, patentes y otras referencias, citas de GenBank y citas de ATCC mencionadas en la presente, se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá.

[0161] Todas las características divulgadas en el presente documento pueden ser combinadas en cualquier combinación. Cada característica divulgada en la memoria descriptiva puede sustituirse por una característica alternativa que sirve para un mismo propósito, equivalente, o similar. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, las características divulgadas (por ejemplo, una secuencia de vector recombinante (por ejemplo, AAV), el plásmido, genoma del vector, o virus recombinante de partícula (por ejemplo, vector AAV-Rh74 o vector AAV relacionado tales como variantes de cápside AAV-Rh74 (por ejemplo, RHM4-1)) son un ejemplo de un género de características equivalentes o similares.

[0162] Tal como se utiliza en el presente documento, las formas singulares “un”, “y”, y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un polinucleótido” incluye una pluralidad de tales polinucleótidos, la referencia a “un vector” incluye una pluralidad de tales vectores, y la referencia a “un virus” o “partícula” incluye una pluralidad de tales viriones/partículas.

[0163] Tal como se utiliza en el presente documento, todos los valores numéricos o rangos numéricos incluyen los números enteros dentro de dichos rangos y fracciones de los valores o los números enteros dentro de los rangos a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, para ilustrar, la referencia a al menos 80% de identidad, incluye 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, etc., así como 81.1%, 81.2%, 81.3%, 81.4%, 81.5%, etc., 82.1%, 82.2%, 82.3%, 82.4%, 82.5%, etc., y así sucesivamente.

[0164] La referencia a un número entero con más (mayor) o menos que incluya cualquier número mayor o menor que el número de referencia, respectivamente. Así, por ejemplo, una referencia a menos de 1000, incluye 999, 998, 997, etc. todo el conteo hasta el número uno (1); y menos de 100, incluye 99, 98, 97, etc., todo el conteo hasta el número uno (1).

[0165] Tal como se utiliza en el presente documento, todos los valores numéricos o rangos incluyen fracciones de los valores y números enteros dentro de dichos rangos y fracciones de los números

enteros dentro de tales rangos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, para ilustrar, la referencia a un intervalo numérico, tal como un rango de porcentaje, tales como, 1-10 incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, así como 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, etc., y así sucesivamente. La referencia a un intervalo de 1-50, por tanto, incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc., hasta e incluyendo 50, así como 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, etc., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, etc., y así sucesivamente.

[0166] La referencia a una serie de rangos incluye rangos que combinan los valores de los límites de diferentes rangos dentro de las series. Por lo tanto, para ilustrar la referencia a una serie de rangos de 11-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1,000, 1,000-1,500, 1,500-2,000, 2,000-2,500, 2,500-3,000, 3,000-3,500, 3,500-4,000, 4,000-4,500, 4,500-5,000, 5,500-6,000, 6,000-7,000, 7,000-8,000, ó 8,000-9,000, incluyen rangos de 10-50, 50-100, 100-1,000, 1,000-3,000, 2,000-4,000, etc.

[0167] Generalmente, se divulga la invención en el presente documento usando un lenguaje afirmativo para describir las numerosas modalidades y aspectos. La invención también incluye específicamente modalidades en las que se excluye determinados asuntos, en su totalidad o en parte, tales como sustancias o materiales, pasos de procedimiento y condiciones, protocolos o procesos. Por ejemplo, en ciertas modalidades o aspectos de la invención, los materiales y/o etapas del método son excluidos. Por lo tanto, a pesar de que la invención no fue expresada generalmente en este documento con términos de lo que la invención no incluye, los aspectos que no están excluidos expresamente en la invención son, sin embargo, divulgados en el presente documento.

[0168] Un número de modalidad de la invención ha sido descrito. Sin embargo, un experto en la técnica, sin apartarse del espíritu y alcance de la invención, puede hacer diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por consiguiente, los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar pero no limitar el alcance de la invención reivindicada.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo incluye una descripción de diversos materiales y métodos.

[0169] Ratones: Ratones de 8-10 semanas de edad machos C57BL/6J (WT), n=5 por grupo experimental. El perro es un perro HB de la Universidad de Carolina del Norte de la colonia Chapel Hill que lleva una mutación sin sentido en el gen FIX (Evans et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10095 (1989)).

[0170] Constructos del Vector AAV: Los estudios in vivo en ratones fueron realizados utilizando un constructo que expresa FIX humano bajo el control del promotor específico de hígado ApoE-hAAT. El estudio en perros utilizó un promotor casi idéntico y el transgén FIX canino.

[0171] Metodología de Transferencia de Genes: Todos los vectores fueron suministrados por vía intravenosa. En los ratones a través de la vena de la cola (se administró un volumen de 200 microlitros por ratón, el vector fue diluido en PBS). En los perros el vector fue suministrado a través de la vena safena.

[0172] Determinación de la Expresión FIX: se utilizó ELISA para medir los niveles de FIX. En ratones, el par de anticuerpos FIX ELISA humano (captura y secundarios) es de Affinity Biologicals. En los perros, se utilizó un par de anticuerpos también de Affinity Biologicals tal como se describe en Haurigot et al. (Mol Ther 18: 1318 (2010)).

[0173] Análisis estadístico: El análisis estadístico fue realizado con el test de dos dimensiones impar, los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

[0174] Medidas de anticuerpos AAV: Se utilizó un ensayo in vitro de neutralización descrita en Manno et al, (*Nat Med* 12:342 (2006)) and Mingozzi et al. (*Nat Med* 13:419 (2007)) para la medición de anticuerpos. En resumen, se utilizaron dos constructos de vectores AAV en el ensayo, un vector de cadena sencilla que expresa β -galactosidasa bajo el control del promotor CMV (ssAAV-LacZ), o un vector auto-complementario que expresa el gen informador de Renilla, AAV-Rh74 -CBA-Renilla, bajo el control del promotor de pollo- β -actina (CBA). Para incrementar la eficiencia de la transducción de vectores AAV *in vitro*, se utilizaron células 2V6.11 (ATCC), que expresan el gen E4 adenoviral bajo el control de un promotor inducible. Las células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1.25×10^4 células/pocillos y se añadió una dilución de 1:1.000 de ponasterona A (Invitrogen) al medio para inducir la expresión E4. En el día del ensayo, las diluciones semilogarítmicas en serie de suero de ensayo inactivado por calor fueron mezclados con medios que contienen virus. Para el vector ssAAV-LacZ, la concentración de virus usado en el ensayo fue de $\sim 1 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV2 y $\sim 5.5 \times 10^{10}$ vg/ml para AAV5, 6, u 8. Para el vector VAAac-Luc, la concentración de virus en el ensayo fue de entre ~ 50 y 150 veces menor. La actividad residual del transgén informante fue medida usando un ensayo colorimétrico (ssAAV-LacZ) o un luminómetro (VAAac-Luc).

[0175] El IgG total de cápside Anti-AAV o subclases Ig fueron medidas con un ensayo de captura; las placas ELISA fueron recubiertas con partículas cápside 5×10^{10} /ml de cápsides de AAV vacías. Las placas fueron bloqueadas con 2% de BSA, 0,05% de Tween 20 en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y las diluciones seriadas de las muestras fueron cargadas en los pocillos e incubados durante la noche a 4°C. Los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, o IgM (Sigma) anti-humanos conjugados con biotina fueron utilizados como anticuerpos de detección; la estreptavidina-HRP fue añadida para la detección del sustrato. La concentración de Ig fue determinada frente a las curvas estándar realizadas con dilución en serie de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, or IgM (Sigma) humana purificada.

[0176] Producción de AAV: El proceso para la producción de vectores se describe en detalle en Ayuso et al. (*Gene Ther* 17:503 (2010)).

Ejemplo 2

Este ejemplo incluye una descripción de los estudios en animales (ratones) para la transferencia de genes FIX humano y la expresión FIX después de la transferencia de genes.

[0177] Los ratones C57BL/6 (n =5 por grupo) fueron inyectados a través de la vena de la cola con vectores AAV que llevan el gen del Factor IX (FIX) (genomas de vector 2.5^{10} por ratón) bajo el control de un promotor específico de hígado. Los niveles de plasma (proteína) del producto transgén FIX humano en los ratones fueron determinados por ELISA en la semana 1, 2, y 4 después de la transferencia de genes, y son ilustrados en la **Figura 1**. El AAV-Rh74 mostró el mayor nivel de expresión transgén en los animales.

Ejemplo 3

Este ejemplo incluye una descripción de los estudios en animales y datos que demuestran el suministro efectivo mediado de AAV-Rh74 de FIX a niveles terapéuticos en perros con hemofilia.

[0178] En resumen, los perros con hemofilia B fueron infundidos por vía intravenosa (IV), a través de la vena safena con genomas de vector 3×10^{12} por kg de peso. La expresión del transgén terapéutico FIX fue impulsado por un promotor específico de hígado. Los vectores y los niveles de FIX fueron monitoreados por ELISA. Los niveles plasmáticos FIX caninos se muestran en la **Figura 2**. Se realizaron AAV-Rh74 y AAV8 más o menos de manera equitativa en perros con hemofilia B, y ambos fueron superiores a AAV6.

Ejemplo 4

Este ejemplo incluye una descripción de estudios que muestran la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-AAV (NAb) en los seres humanos.

[0179] Los datos de la Tabla 1 muestran anticuerpos neutralizantes anti-AAV (NAb) medidos en los seres humanos con un ensayo in vitro. Los sujetos con un título NAb de menos de o igual a 1:1 se definen como naïve o de bajo título para anticuerpos anti-AAV, y son aptos para la transferencia de genes para ese serotipo AAV (resaltados en gris). Los pacientes con títulos de entre 1:1 y 1:3 se consideran AAV-permisivos, siempre que se utilicen cápsides vacías como señuelos. Las muestras con concentraciones superiores a 1:3 son consideradas no permisivas para la transducción de AAV después de la inyección sistémica y son rellenadas de color gris claro. AAV-Rh74 exhibió la menor prevalencia de anti-AAV Nab comparada con AAV-2 y AAV-8.

Tabla 1

	AAV2	AAV8	RHM4-1	RHM15-5
GenImm 005	<1:3.16	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 015	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 040	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 058	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	1:1-1:3.16
GenImm 070	1:10-1:31.6	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 080	1:10-1:31.6	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 082	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 083	Neat	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 087	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 095	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	1:1-1:3.16
GenImm 099	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 102	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 105	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 100	<1:1	<1:1	<1:1	ND
GenImm 124	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 125	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	1:1-1:3.16
GenImm 130	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 131	1:1-1:3.1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 133	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 150	ND	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 151	ND	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 154	ND	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 155	ND	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 143	1:1-1:3.1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 145	1:1-1:3.1	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 140	ND	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 141	ND	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 011	ND	<1:1	<1:1	<1:1
GenImm 049	<1:1	<1:1	<1:1	1:1-1:3.1
GenImm 146	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1	<1:1	ND
GenImm 147	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1	<1:1	ND
GenImm 007	1:100-1:316	1:3.16-1:10	ND	ND
GenImm 084	1:3.1-1:10	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1
GenImm 127	1:100-1:316	1:3.1-1:10	1:3.1-1:10	1:3.16-1:10
GenImm 137	1:100-1:316	1:3.1-1:10	1:3.1-1:10	1:1-1:3.16
GenImm 153	ND	1:3.1-1:10	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6
GenImm 001	1:100-1:316	1:10-1:31.6	ND	ND
GenImm 006	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6
GenImm 110	1:316-1:1000	1:10-1:31.6	1:31.6-1:100	>1:31.6
GenImm 128	1:1000-1:3160	1:10-1:31.6	1:31.6-1:100	>1:31.6
GenImm 129	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	1:3.1-1:10	1:3.16-1:10
GenImm 148	ND	1:10-1:31.6	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 157	ND	1:10-1:31.6	1:3.1-1:10	1:10-1:31.6
GenImm 158	ND	1:10-1:31.6	1:3.1-1:10	ND

GenImm 028	1:3.1-1:10	1:10-1:31.6	<1:1	1:1-1:3.16
GenImm 016	1:10-1:31.6	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	ND
GenImm 075	1:316-1:1000	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6
GenImm 126	>1:3160	1:31.6-1:100	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 139	ND	1:31.6-1:100	1:31.6-1:100	>1:31.6
GenImm 149	ND	1:31.6-1:100	1:31.6-1:100	ND
GenImm 068	1:3160	1:316-1:1000	1:31.6-1:100	>1:31.6
GenImm 088	>1:3160	1:316-1:1000	1:316-1:1000	>1:31.6
GenImm 138	ND	1:316-1:1000	1:316-1:1000	>1:31.6
GenImm 004	1:316-1:1000	1:100-1:316	ND	ND
GenImm 035	>1:3160	1:100-1:316	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 074	1:3160	1:100-1:316	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 142	ND	1:100-1:316	1:1000-1:3160	>1:31.6
GenImm 152	ND	1:100-1:316	1:31.6-1:100	>1:31.6
GenImm 156	ND	1:100-1:316	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 072	1:3.1-1:10	1:100-1:316	<1:1	<1:1
GenImm 144	>1:3160	1:316-1:1000	1:316-1:1000	>1:31.6
GenImm 060	>1:3160	1:1000-1:3160	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 069	>1:3160	>1:3160	1:1000-1:3160	>1:31.6
GenImm 017	>1:3160	>3160	1:316-1:1000	>1:31.6
GenImm 002	<1:2	ND	ND	ND
GenImm 003	<1:2	ND	<1:1	<1:1

	AAV2	AAV8	RHM4-1	RHM15-5
<1:1	13	29	35	27
Total	66	66	66	66
% de <1:1	19.7	43.9	53.0	40.9

Ejemplo 5

Este ejemplo incluye una descripción de datos que muestran las cantidades de producción de diferentes serotipos AAV que incluyen AAV-Rh74.

[0180] Los datos en la Tabla 2 muestran el rendimiento de producción de los diferentes serotipos de AAV. Se reporta el tamaño del lote de virus en frascos rotativos, el rendimiento del vector total y el rendimiento por frasco. Todos los serotipos fueron empaquetados con el mismo casete de expresión. AAV-Rh74 tiene un rendimiento comparable con o superior a los otros serotipos evaluados, a saber, AAV-8, AAV-dj, y AAV-2.

Tabla 2

Serotipo	Tamaño del lote (número de frascos giratorios)	Rendimiento total del vector (genomas de vector)	Rendimiento por frasco giratorio (genomas de vector)
AAV-Rh74	80	1.21E+15	1.51E+13
AAV-Rh74	10	1.23E+14	1.23E+13
AAV-8	30	2.54E+14	8.47E+12
AAV-dj	20	1.79E+14	8.95E+12
AAV-2	30	1.38E+14	4.60E+12

Ejemplo 6

Este ejemplo incluye una descripción de los datos que muestran que el Factor humano IX (FIX) que expresa el vector AAVrh74 bajo el control de un promotor específico de hígado administrado a macacos rhesus conlleva a cantidades de producción de FIX en animales, y a niveles superiores que el vector AAV8 administrado en la misma cantidad.

[0181] En resumen, a los animales se les administró AAV8 o AAVrh74 a una dosis de genomas de vector 2×10^{12} (vg)/kg de peso. Los vectores fueron formulados en salina o en una mezcla de vector cápside de AAV vacía (denotada EC).

[0182] La **Figura 4** es un gráfico de histograma del erro promedio (semana 2 a 8) y error estándar o la media del FIX humano medido por ELISA que detecta específicamente el FIX humano en el plasma del macaco rhesus. Los animales que recibieron el vector AAVrh74-FIX se muestran en las últimas dos barras hacia el margen derecho. Los datos muestran que los animales que recibieron los vectores AAVrh74 (últimos dos bares hacia el margen derecho) expresaron el transgén FIX en niveles más altos en comparación con los otros grupos de animales inyectados con la misma dosis (barras negras y grises). Los niveles promedios se compararon mediante una prueba t de student de dos colas, desapareado.

[0183] Uno de los animales que recibieron AAV-RHM4-1-FIX desarrolló un inhibidor contra el producto transgén del factor IX humano, que es un fenómeno bien documentado que se produce en aproximadamente el 20% de los macacos tratados con un vector de FIX humano. El segundo animal tratado con RHM4-1 expresó niveles FIX de alrededor de 2 veces mayor en comparación con los macacos tratados con AAV8.

Ejemplo 7

Este ejemplo incluye una descripción de varias variantes de cápside Rh74.

[0184] En resumen, se introdujeron varias sustituciones en la secuencia de cápside en la secuencia de cápside Rh74 para producir variantes de cápside Rh74. Las diferentes variantes de cápside Rh74 y los aminoácidos sustituidos, fueron los siguientes:

Tabla 3: Variantes Sustituciones de Aminoácido y Posiciones Indicadas en la Cápside VP1

RHM4_1	G195A-L199V- S201P-G202N
RHM15_1	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/169/547)R
RHM15_2	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R
RHM15_3	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R
RHM15_4	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R
RHM15_5	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R
RHM15_6	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R

[0185] La variante RHM4-1 tenía una alanina, una leucina, una prolina, y una sustitución de asparagina en las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 y 202, respectivamente, de la cápside Rh74 VP1. La secuencia de aminoácido de la cápside VP1 variante RHM4-1, con residuos sustituidos **a**, **v**, **p** y **n**, subrayado y en negrita, es como sigue (SEQ ID NO: 5):

```

1  maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgapkpkankqqkdnggrglvlpgykylgpfngld
61  kgepvnaadaaaalehdkaydqqlqagdnpylrynhadaefqerlqedtsfggnlgravfq
121 akkrvleplglvespvktapgkkpvepspqrspdsstgigkkgqqpakkrlnfgqtdgs
181 esvpdpqpigepaapsgvpntmaagggapmadnnegadgvgsssgnwhcdstwlgrdv
241 ittstrtwalptynnhlykqisngtsggstndntyfgystpwygfdnrfhchfsprdwq
301 rlinnnwgfprkrlnfklfnivkevtqnegtktiannltstiqvftdseyqlpyvlgsa
361 hqgclppfpadvfmipqygyltlnngsqav grssfycleyfpsqmlrtggnfefsnyfed
421 vpfhssyahsqslrdlmlnplidqlyllylrsrtqstggtagtqqlfsgagpnnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvtstlsqnnnsnfawtgatkyhlngrdslvnpgvamathkddeerffpss
541 gvlmfgkqgagkdnvdyssvmltseeekttnpvateqygvvadnlqqnaapivgavns
601 qgalpgmvwqnrdivylqgpiwakiphtdgnfhpsplmggfglkhpppqilikntpvpadp
661 pttfnqaklasfitqystgqvsveiewelqkenskrwnpeiqtysnyykstnvdfavnte
721 gtyseprpigtryltnl

```

[0186] La secuencia de ácido nucleico de cápside VP1 variante RHM4-1, con codones que codifican **a**, **v**, **p** y **n**, subrayado y en negritas, es como sigue (SEQ ID NO:11):

```

1  atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgc
61  gagtgggtgggacctgaaacctggagccccgaaacccaaagccaaccagcaaaagcaggac
121 aacggccggggtctggtgcttcttggtctacaagtacctcggaccttcaacggactcgac
181 aagggggagcccgtaacgcggcgagcgcagcgccctcgagcacgacaaggcctacgac
241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataatcacgccgacgccgagttt
301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgcgagctcttccag
361 gccaaaaagcgggttctcgaacctctgggcctggttgaatcgccggttaagacggctcct
421 ggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgctctccagactcctctacgggcatc
481 ggcaagaaaggccagcagcccgcaaaaaagagactcaattttgggcagactggcgactca
541 gagtcagtccccgacctcaaccaatcggagaaccaccagcagcccctctggtgtggga
601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgctccaatggcagacaataacgaaggcgccgac

```

```

661 ggagtgggtagttcctcaggaaattggcatttgcgattccacatggctgggacagagtc
721 atcaccaccagcaccgcacctgggcccctgccacctacaacaaccacctctacaagcaa
781 atctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaacacctacttcggctacagcacc
841 ccctgggggtatTTTTgacttcaacagattccactgccactTTTtaccacgtgactggcag
901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggctcaacttcaagctcttcaac
961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccaagaccatcgccaataaccttacc
1021 agcacgattcaggtctttacggactcggaataaccagctcccgtacgtgctcggctcggcg
1081 caccagggtgcctgcctccgttcccgccggacgtcttcatgattcctcagtacgggtac
1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtgggcccgtcgtccttctactgcctggagtac
1201 tttccttctcaaagtgtgagaacgggcaacaactttgaattcagctacaacttcgaggac
1261 gtgcccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaaccctctc
1321 atcgaccagtacttgtactacctgtcccggactcaaagcacgggcggtactgcaggaact
1381 cagcagttgctatTTTTctcaggccgggcccataacaacatgtcggctcaggccaagaactgg
1441 ctaccgggtccctgctaccggcgagcaacgcgtctccacgacactgtcgcagaacaacaac
1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctgaatggcagagactctctggtg
1561 aatcctggcgttgccatggctaccacaaggacgacgaagagcgatTTTTtccatccagc
1621 ggagtcttaatgtttgggaaacagggagctggaaaagacaacgtggactatagcagcgtg
1681 atgctaaccagcgaggaagaaataaagaccaccaaccagtgccacagaacagtacggc
1741 gtggtggccgataacctgcaacagcaaaacgccgctcctattgtaggggcccgtcaatagt
1801 caaggagccttacctggcatggtgtggcagaaccgggacgtgtacctgcagggtcccac
1861 tgggccaagattcctcatacggacggcaactttcatccctcgccgctgatgggaggcttt
1921 ggactgaagcatccgcctcctcagatcctgattaaaaacacacctgttcccgcggatcct
1981 ccgaccaccttcaatcaggccaagctggcttctttcatcacgcagtacagtaccggccag
2041 gtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggagaaacagcaaacgctggaaccagag
2101 attcagtacacttccaactactacaaatctacaaatgtggactttgctgtcaatactgag
2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggttacctcaccgtaatctg

```

[0187] Las variantes RHM 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 1-5 y 15-6 también tenían una alanina, leucina, prolina, y una sustitución de asparagina en las posiciones de aminoácidos 195, 199, 201 y 202, respectivamente, de la cápside Rh74 VP1. Además, estas variantes tenían múltiples sustituciones de arginina de lisina en varias posiciones.

[0188] La secuencia de aminoácido de cápside VP1 variante RHM15-1 es como sigue (SEQ ID NO:6):

```

1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgapkpkankqrrqdngrglvlpgyrylgpfngld
61 kgepvnaadaaaalehdaydqqllqagdnpylrynhadaefqerlqedtsfggnlgravfq
121 akkrvleplglvespvrtapgkkrpvepspqrspdsstgigkkgqqparkrlnfgqtgds
181 esvpdpqpigepaapsvgvpntmaagggapmadnnegadvgvsssgnwhcdstwlgdrv
241 ittstrtwalptynnhlyrqisngtsggstndntyfgystpwgyfdfnrhfchfsprdwq
301 rlinnnwgrfrpkrlnfklfnivkevtqnegtrtiannltstiqvftdseyqlpyvlgsa
361 hqgclppfpadvfmipqygyltlngsqavgrssfycleyfpsqmlrtgnnfefsynfed
421 vpfhssyahsqslldrlmnp lidqlyllylsrtqstggtagtqqlfsqagpnnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvtstlsqnnnsnfawtgatkyhlngrdslvnpgvamathrddeerffpss
541 gvlmfgrrqgagrndvdyssvmltseeirttnpvateqygvvadnlqqn aapivgavn
601 qgalpgmvwqnrdivylqgpiwakiphtdgnfhpsplmggfglkhpppqilikntpvpadp
661 pttfnqaklasfitqystgqvsveiewelqkenskrwnpei qytsnyykstnvd favnte
721 gtyseprpigrtryltnrl

```

[0189] La secuencia de ácido nucleico de cápside VP1 variante RHM15-1 es como sigue (SEQ ID NO:12):

```

1 atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgc

```

61 gagtgggtgggacctgaaacctggagccccgaaacccaaagccaaccagcaaaggcaggac
 121 aacggccgggggtctggtgcttcctggctacaggtacctcggaaccttcaacggactcgac
 181 aagggggagcccggtcaacgcggcgagcgcggccctcgagcacgacagggcctacgac
 241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataatcacgccgacgccgagttt
 301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacctcgggcgcgcagctctccag
 361 gccaaaaagcgggttctcgaacctctgggcctggttgaatcgccggttaggacgggtcct
 421 ggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgtctccagactcctctacgggcatc
 481 ggcaagaaaggccagcagcccgcaagaaagagactcaattttgggcagactggcgactca
 541 gagtcagtccccgacctcaaccaatcggaagaaccaccagcagccccctctggtgtggga
 601 cctaatacaatggctgcaggcgggtggcgctccaatggcagacaataacgaaggcgccgac
 661 ggagtgggtagttcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctgggcgacagagtc
 721 atcaccaccagcaccgcacctgggccctgccacctacaacaaccacctctacaggcaa
 781 atctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaacacctacttcggctacagcacc
 841 ccctgggggtattttgacttcaacagattccactgccacttttcaccacgtgactggcag
 901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggctcaacttcaagctcttcaac
 961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc
 1021 agcacgattcaggtctttacggactcggaataaccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg
 1081 caccagggtgcctgcctccgttcccggcgagctcttca tgattcctca gtacgggtac
 1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtgggcgggtcgt ccttctactg cctggagtac
 1201 tttccttctcaaatgctgagaacgggcaacaactttgaat tcagctacaa cttcgaggac
 1261 gtgcccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctgg accggtgat gaacctctc
 1321 atcgaccagtacttgactacctgtcccggactcaaagca cgggcgggtac tgcaggaact
 1381 cagcagttgctattttctcaggccgggcctaacaacatgt cggctcaggc caagaactgg
 1441 ctaccgggtccctgctaccggcagcaacgcgtctccacga cactgtcgca gaacaacaac
 1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctga atggcagaga ctctctggtg
 1561 aatcctggcgttgccatggctaccacagggacgacgaag agcgattttt tccatccagc
 1621 ggagtcttaatgtttgggagacagggagctggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg
 1681 atgctaaccagcgaggaagaaataaggaccaccaaccagc tggccacaga acagtacggc
 1741 gtggtggccgataacctgcaacagcaaaacgccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt
 1801 caaggagccttacctggcatggtgtggcagaaccgggacg tgtacctgca gggccccatc
 1861 tgggccaagattcctcatagcgacggcaactttcatccct cgccgctgat gggaggcttt
 1921 ggactgaagcatccgcctcctcagatcctgattaaaaaca cacctgttcc cgcgatcct
 1981 ccgaccaccttcaatcaggccaagctggcttctttcatca cgcagtacag taccggccag
 2041 gtcagcgtggagatcgagtgaggagctgcagaaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag
 2101 attcagtacacttccaactactacaaatctacaaatgtgg actttgctgt caatactgag
 2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggttacc tcaccgtaa tctgtaa

[0190] La secuencia de aminoácido de cápside VP1 variante RHM15-2 es como sigue (SEQ ID NO:7):

1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgapkpkankqrqd ngrglvlpgy rylgpfngld
 61 kgepvnaadaaalehdaydqqllqagdnpylrynhadaef qerlqedtsf ggnlgravfq
 121 akkrvleplglvespvrtapgkkrpvepspqrspdsstgi gkrqgqpark rlnfggtgds
 181 esvpdpqpigepaapsvgvpntmaagggapmadnnegad gvgsssgnwh cdstwlgdrv
 241 ittstrtwalptynnhlyrqisngtsggstndntyfgyst pwgyfdfnrf hchfsprdwq
 301 rlinnnwgrfrpkrlnfklfnivkevtqnegtrtiannlt stiqvftdse yqlpyvlgsa
 361 hqgclppfpadvfmipqygyltlnngsqavgrssfycley fpsqmlrtgn nfefsynfed
 421 vpfhssyahsqslldrlmnp lidqlyllylrsrtqstggtagt qqlfslsqagp nnmsaqaknw
 481 lpgpcyrqqrsvsttllsqnnnsnfawtgatkyhlngrdslv npgvamathr ddeerffps
 541 gvlmfgkqgagrndvdyssvmltseeirttnpvateqyg vvadnlqqqn aapivgavns
 601 qgalpgmvwqnrdivlylqgpiwakiphtdgnfhpsplmggf glkhpppqil ikntpvpadp
 661 pttfnqaklasfitqystgqvsveiewelqkenskrwnpe iqytsnyyks tnvdfavnte
 721 gtyseprpigrtryltnl

[0191] La secuencia de ácido nucleico de cápside VP1 variante RHM15-2 es como sigue (SEQ ID NO:13):

```

1 atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggaca acctctctga gggcattcgc
61 gagtgggtgggacctgaaacctggagccccgaaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac
121 aacggccggggtctggtgcttcttggttacaggtacctcg gacccttcaa cggactcgac
181 aagggggagcccgtaacgcggcgagcgagcgccctcg agcacgacag ggcctacgac
241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggtata atcacgccga cgccgagttt
301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacc tcgggcgcgc agtcttccag
361 gccaaaaagcgggttctcgaacctctgggcctggttgaat cgccggttag gacggctcct
421 ggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgctctc cagactcctc tacgggcatc
481 ggcaagagaggccagcagcccgcaagaaagagactcaatt ttgggcagac tggcgactca
541 gagtcagtccccgacctcaaccaatcggagaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga
601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgctccaatggcag acaataacga aggcgcccag
661 ggagtgggtagttcctcaggaaattggcattgcatcca catggctggg cgacagagtc
721 atcaccaccagcacccgcacctgggcctgcccacctaca acaaccacct ctacaggcaa
781 atctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc
841 ccctgggggtatcttgacttcaacagattccactgccact tttcaccacg tgactggcag
901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggc tcaacttcaa gctcttcaac
961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc
1021 agcacgattcaggtctttacggactcgggaataaccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg
1081 caccagggtgcctgcctccgttcccggcgagctcttca tgattcctca gtacgggtac
1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtggccgggtcgt ccttctactg cctggagtac
1201 tttccttctcaaagtgtgagaacgggcaacaactttgaat tcagctacaa cttcgaggac
1261 gtgcccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctgg accggtgat gaacctctc
1321 atcgaccagtacttgtactacctgtcccggactcaaagca cgggcgggtac tgcaggaact
1381 cagcagttgctatcttctcaggccgggcctaacaacatgt cggctcaggc caagaactgg
1441 ctacccgggtccctgctaccggcagcaacgcgtctccacga cactgtcgca gaacaacaac
1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctga atggcagaga ctctctggtg
1561 aatcctggcgttgccatggctacccacaggagcagcgaag agcgattttt tccatccagc
1621 ggagtcttaatgtttgggaaacaggagagctggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg
1681 atgctaaccagcagaggaagaaataaggaccaccaaccag tggccacaga acagtacggc
1741 gtggtggccgataacctgcaacagcaaaacgccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt
1801 caaggagccttacctggcatggtgtggcagaaccgggacg tgtacctgca gggccccatc
1861 tgggccaagattcctcatagcgacggcaactttcatccct cgccgctgat gggaggcttt
1921 ggactgaagcatccgcctcctcagatcctgattaaaaaca cacctgttcc cgcggatcct
1981 ccgaccaccttcaatcaggccaagctggcttctttcatca cgcagtacag taccggccag
2041 gtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggagaaca gcaaacgtg gaaccagag
2101 attcagtacacttccaactactacaaatctacaaatgtgg actttgctgt caatactgag
2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggttacc tcaccgtaa tctgtaa

```

[0192] La secuencia de aminoácido de cápside VP1 variante RHM15-3/RHM15-5 es como sigue (SEQ ID NO:8):

```

1 maadgylpdwlednlsegir ewwdlkpgapkpkankqrqd ngrglvlpgy rylgpfngld
61 kgepvnaadaaaalehdaydqqlqagdnpylrynhaaeef qerlqedtsf ggnlgravfq
121 akkrvleplglvespvrtaapgkkrpvepspqrspdsstgi gkrqqpakk rlnfggtgds
181 esvpdpqpigepaapsvgvpntmaagggapmadnnegad gvgsssgnwh cdstwlgdrv
241 ittstrtwalptynnhlyrqisngtsggstndntyfgyst pwgyfdfnrf hchfsprdwq
301 rlinnnwgrfprkrlnfklfniqvkevtqnegtrtiannlt stiqvftdse yqlpyvlgsa
361 hqgclppfpadvfmipqygyltlnngsqavgrssfycley fpsqmlrtgn nfefsynfed
421 vpfhssyahsqsldrlmnp lidqlylylsrtqstggtagt qqlfqsqagp nnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvtstlsqnnsnfawtgatkyhlngrdslv npgvamathr ddeerffps
541 gvlmfrqgagrdnvdyssvmltseeirttnpvateqyg vvadnlqqqn aapivgavns

```

601 qgalpgmvwqnrdivylqgpiwakiphtdgnfhpsplmggf glkhpppqil ikntpvpadp
 661 pttfnqaklasfitqystgqvsveiewelqkenskrwnpe iqytsnyyks tnvdfavnte
 721 gtyseprpigrtryltnl

[0193] La secuencia de ácido nucleico de cápside VP1 variante RHM15-3/RHM15-5 es como sigue (SEQ ID NO:14):

1 atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggaca acctctctga gggcattcgc
 61 gagtgggtgggacctgaaacctggagccccgaaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac
 121 aacggccggggtctgggtgcttcctggctacaggtacctcg gacccttcaa cggactcgac
 181 aagggggagcccgtaacgcggcgagcgcgcggccctcg agcacgacag ggcctacgac
 241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggtata atcacgccga cgccgagttt
 301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacc tcgggcgcgc agtcttccag
 361 gccaaaaagcgggttctcgaacctctgggcctggttgaat cgccggttag gacggctcct
 421 ggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgctctc cagactcctc tacgggcatc
 481 ggcaagagaggccagcagcccgcaaaaaagagactcaatt ttgggcagac tggcgactca
 541 gagtcagtccccgacctcaaccaatcggaagaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga
 601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgctccaatggcag acaataacga aggcgccgac
 661 ggagtgggtagtctcctcaggaaattggcattgcatcca catggctggg cgacagagtc
 721 atcaccaccagcaccgcacctgggcctgccacctaca acaaccacct ctacaggcaa
 781 atctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc
 841 ccttgggggtatcttgcactcaacagattccactgccact tttcaccacg tgactggcag
 901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggc tcaacttcaa gctcttcaac
 961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc
 1021 agcacgattcaggtctttacggactcggaataaccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg
 1081 caccagggtgcctgcctccgttcccggcggacgtcttca tgattcctca gtacgggtac
 1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtgggcccgtcgt ccttctactg cctggagtac
 1201 tttccttctcaaagtgtgagaacgggcaacaactttgaat tcagctacaa cttcgaggac
 1261 gtgcccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctgg accggctgat gaacctctc
 1321 atcgaccagtacttgtactacctgtcccggactcaaagca cgggcgggtac tgcaggaact
 1381 cagcagttgctatcttctcaggccgggacctaaacatgt cggctcaggc caagaactgg
 1441 ctaccgggtccctgctaccggcagcaacgcgtctccacga cactgtcgca gaacaacaac
 1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctga atggcagaga ctctctggtg
 1561 aatcctggcggttgccatggctaccacagggacgacgaag agcgattttt tccatccagc
 1621 ggagtcttaagtgttgggagacagggagctggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg
 1681 atgctaaccagcgaggaagaataaggaccaccaaccag tggccacaga acagtacggc
 1741 gtgggtggccgataacctgcaacagcaaaacgcgcctccta ttgtaggggc cgtcaatagt
 1801 caaggagccttacctggcatggtgtggcagaaccgggacg tgtacctgca gggctccatc
 1861 tgggccaagattcctcatacggacggcaactttcatccct cgccgctgat gggaggcttt
 1921 ggactgaagcatccgcctcctcagatcctgattaaaaaca cacctgttcc cgcggatcct
 1981 ccgaccaccttcaatcaggccaagctggcttctttcatca cgcagtacag taccggccag
 2041 gtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag
 2101 attcagtacacttccaactactacaaatctacaaatgtgg actttgctgt caatactgag
 2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggttacc tcaccgtaa tctgtaa

[0194] La secuencia de aminoácido de cápside VP1 variante RHM15-4 es como sigue (SEQ ID NO:9):

1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgap kpanqqrqd ngrglvlpgy rylgpfngld
 61 kgepvnaadaaalehdraydqqlqagdnp lrynhadaef qerlqedtsf ggnlgravfq
 121 akkrvleplglvespvrtapgkkrpvepsp qrspdsstgi gkrgqqpakk rlnfggtgds
 181 esvpdpqpigepaapsvgvpntmaaggga pmadnnegad gvgsssgnwh cdstwlgdrv
 241 ittstrtwalptynnhlyrqisngtsggst ndntyfgyst pwgyfdfnrf hchfsprdwq
 301 rlinnnwgrfrpkrlnfklfnlqvkevtqne gtrtiannlt stiqvftdse yqlpyvlgsa

```

361 hqgclppfpadvfmipqygyltlnngsqav grssfycley fpsqmlrtgn nfefsynfed
421 vpfhssyahsqslldrlmnp lidqlyylsr tqstggtagt qqlfqsqagp nnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvtstlsqnnnsnfawtgatk yhlngdrslv npgvamathr ddeerffpss
541 gvlmfqkqgagrndvdyssvmltseeiirt tnpvateqyg vvadnlqqqn aapivgavns
601 qgalpgmvwqnrdivlqgpiwakiphtdgn fhpsplmggff glkhpppqil ikntpvpadp
661 pttfnqarlasfitqystgqvsveiewelq kenskrwnpe iqytsnyyys tnvdfavnte
721 gtyseprpigrtryltnl

```

[0195] La secuencia de ácido nucleico de cápside VP1 variante RHM15-4 es como sigue (SEQ ID NO:15):

```

1 atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggaca acctctctga gggcattcgc
61 gagtgggtgggacctgaaacctggagccccgaaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac
121 aacggccggggtctggtgcttcctggctacaggtacctcg gacccttcaa cggactcgac
181 aagggggagcccgtaacgcggcgagcgcagcgccctcg agcacgacag ggcctacgac
241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggtata atcacgccga cgccgagttt
301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacc tcgggcgcgc agtcttccag
361 gccaaaaagcgggttctcgaacctctgggcctggttgaat cgccggttag gacggctcct
421 ggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgtctc cagactcctc tacgggcatc
481 ggcaagagaggccagcagcccgcaaaaaagagactcaatt ttgggcagac tggcgactca
541 gagtcagtccccgacctcaaccaatcggaagaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga
601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgctccaatggcag acaataacga aggcgcgcag
661 ggagtgggtagtctcctcaggaaattggcattgcatctca catggctggg cgacagagtc
721 atcaccaccagcaccgcacctgggcccctgccacctaca acaaccacct ctacaggcaa
781 atctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc
841 ccctgggggtatcttctgacttcaacagattccactgccact tttcaccacg tgactggcag
901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggc tcaacttcaa gctcttcaac
961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc
1021 agcacgattcaggtctttacggactcggaataaccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg
1081 caccagggctgcctgcctccgttcccgcgagcgtcttca tgattcctca gtacgggtac
1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtgggcccgtcgt ccttctactg cctggagtac
1201 tttccttctcaaagtctgagaacgggcaacaactttgaat tcagctacaa cttcgaggac
1261 gtgcccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctgg accggtgat gaacctctc
1321 atcgaccagtacttgactacctgtcccggactcaaagca cgggcgggtac tgcaggaact
1381 cagcagttgctatcttctcaggccgggacctaaacatgt cggctcaggc caagaactgg
1441 ctaccgggtccctgctaccggcagcaacgcgtctccacga cactgtcgca gaacaacaac
1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctga atggcagaga ctctctggtg
1561 aatcctggcgttgccatggctaccacagggagcagcgaag agcgattttt tccatccagc
1621 ggagtcttaattgtttgggaaacagggagctggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg
1681 atgctaaccagcgaggaagaataaggaccaccaaccag tggccacaga acagtacggc
1741 gtggtggccgataacctgcaacagcaaacgcgcctccta ttgtaggggc cgtcaatagt
1801 caaggagccttacctggcatggtgtggcagaaccgggacg tgtacctgca gggccccatc
1861 tgggccaagattcctcatacggacggcaactttcatccct cgccgctgat gggaggcttt
1921 ggactgaagcatccgcctcctcagatcctgattaaaaaca cacctgttcc cgcggatcct
1981 ccgaccaccttcaatcaggccaggctggcttctttcatca cgcagtacag taccggccag
2041 gtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag
2101 attcagtaacttccaactactacaaatctacaaatgtgg actttgctgt caatactgag
2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggttacc tcaccgtaa tctgtaa

```

[0196] La secuencia de aminoácido de cápside VP1 variante RHM15-6 es como sigue (SEQ ID NO:10):

```

1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgapkpkanqqrqdnrglvpky rylgpfngld
61 kgepvnaadaaaalehdaydqqlqagdnpylrynhadaefqerlqedtsf ggnlgravfq

```

```

121 akkrvleplglivespvrtaapgkkrpvepspqrspdsstgigkkgqqpakk rlnfgqtgds
181 esvpdpqpigepaapsvgvpntmaagggapmadnnegadvgvgsssgnwh cdstwlgdrv
241 ittstrtwalptynnhlyrqisngtsggstndntyfgystpwgyfdfnrf hchfsprdwq
301 rlinnnwgfrpkrlnfklfnlqvkevtqnegtrtiannltstiqvftdse yqlpyvlgsa
361 hqgclppfpadvfmipqygyltlnngsqavgrssfycleyfpsqmlrtgn nfefsynfed
421 vpfhssyahsqslldrlmnpolidqlylrsrtqstggtagtqqlfsgagp nnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvtstlsqnnnsnfawtgatkyhlngrdslvnpvgvamatr ddeerffpss
541 gvlmfgrrqgagrndvdyssvmltseeeirrttnpvateqygvvadnlqqn aapivgavns
601 qgalpgmvwqnrdivylqgpiwakiphtdgnfhpsplmggfglkhpppqil ikntpvpadp
661 pttfnqarlasfitqystgqvsveiewelqkenskrwnpeiqtysnyyks tnvdfavnte
721 gtyseprpigtryltnrl

```

[0197] La secuencia de ácido nucleico de cápside VP1 variante RHM15-6 es como sigue (SEQ ID NO:16):

```

1 atggctgccgatgggttatcttccagattggctcgaggaca acctctctga gggcattcgc
61 gagtgggtgggacctgaaacctggagccccgaaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac
121 aacggccggggtctggtgcttcttggtctacaggtacctcg gacccttcaa cggactcgac
181 aagggggagcccgtaacgcggcgagcgcagcgccctcg agcacgacag ggcctacgac
241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggtata atcacgccga cgccgagttt
301 caggagcgtctgcaagaagatacgtcttttgggggcaacc tcgggcgcgc agtcttccag
361 gccaaaaagcgggttctcgaacctctgggcctggttgaat cgccggttag gacggctcct
421 ggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgtctc cagactcctc tacgggcac
481 ggcaagaaaggccagcagcccgcaaaaaagagactcaatt ttgggcagac tggcgactca
541 gagtcagtccccgacctcaaccaatcggaagaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga
601 cctaatacaatggctgcaggcgggtggcgctccaatggcag acaataacga aggcgcgcag
661 ggagtgggtagtctctcaggaaattggcatttgcgattcca catggctggg cgacagagtc
721 atcaccaccagcaccgcacctgggcccctgccacctaca acaaccacct ctacaggcaa
781 atctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc
841 ccctgggggtattttgacttcaacagattccactgccact tttcaccag tgactggcag
901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggc tcaacttcaa gctcttcaac
961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc
1021 agcacgattcaggtctttacggactcggaataccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg
1081 caccagggctgcctgcctccgttcccggcggagctcttca tgattcctca gtacgggtac
1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtgggcccgtcgt cttctactg cctggagtac
1201 tttccttctcaaatgctgagaacgggcaacaactttgaat tcagctaaa cttcaggagc
1261 gtgcccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctgg accgctgat gaacctctc
1321 atcgaccagtacttgtactacctgtcccggactcaaagca cgggcggtac tgcaggaact
1381 cagcagttgctattttctcaggccgggcctaacaacatgt cggctcaggc caagaactgg
1441 ctaccgggtccctgctaccggcagcaacgcgtctccacga cactgtcgca gaacaacaac
1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctga atggcagaga ctctctggtg
1561 aatcctggcgttgccatggctaccacagggagcagcgaag agcgattttt tccatccagc
1621 ggagtcttaatgtttgggagacagggagctggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg
1681 atgctaaccagcgaggaagaataaggaccaccaaccagc tggccacaga acagtacggc
1741 gtggtggccgataacctgcaacagcaaacgcgcgtccta ttgtaggggc cgtcaatagt
1801 caaggagccttacctggcatggtgtggcagaaccgggacg tgtacctgca gggccccatc
1861 tgggccaagattcctcatagcggcgaactttcatccct cgccgctgat gggaggcttt
1921 ggactgaagcatccgcctcctcagatcctgattaaaaaca cacctgttcc cgcgatcct
1981 ccgaccaccttcaatcaggccaggtggtctctttcatca cgcagtacag taccggccag
2041 gtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag
2101 attcagtacacttccaactactacaaatctacaaatgtgg actttgctgt caatactgag
2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggttacc tcaccgtaa tctgtaa

```

Ejemplo 8

Este ejemplo incluye una descripción de estudios de expresión del factor humano IX usando las variantes de cápside Rh74 en comparación con Rh74 y AAV8.

[0198] En resumen, se utilizaron variantes de cápside Rh74 para empaquetar un vector de expresión AAV de factor humano IX, las partículas de AAV se usaron para infectar ratones, y los niveles de expresión del factor IX se determinaron en los animales (plasma). Las variantes de cápside tenían las siguientes sustituciones de aminoácidos en las posiciones indicadas:

Tabla 4

RHM4_1	G195A-L199V- S201P-G202N
RHM15_1	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/169/547)R
RHM15_2	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R
RHM15_3	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R
RHM15_4	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R
RHM15_5	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R
RHM15_6	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R

[0199] La **Figura 5** muestra los niveles de expresión del factor IX humano de plasma en los animales tratados después de 2 semanas. Como se ilustra, el vector de expresión AAV del factor humano IX encapsidado por la variante de cápside RHM4-1 proporcionó el nivel más alto de expresión, y fue sustancialmente mayor que la expresión producida por el vector de expresión AAV del factor humano IX encapsidado por Rh74, y el vector de expresión AAV del factor humano IX encapsidado por AAV8.

Ejemplo 9

Este ejemplo incluye una descripción de datos que muestran que el vector RHM4-1 variante AAVrh74 que expresa el factor humano IX (FIX) bajo el control de un promotor específico de hígado administrado a macacos cynomolgus conlleva a cantidades de producción de FIX en animales, y a niveles superiores que el vector AAV8 administrado en la misma cantidad.

[0200] Los monos cynomolgus fueron previamente evaluados para neutralizar los anticuerpos de AAV, y animales con títulos de tratamiento previo de <1:1 fueron seleccionados para asegurar que la transducción se realizó correctamente. Los monos fueron infundidos con cualquiera de los vectores RHM4-1 variante AAV8 o AAV-Rh74 que expresan un transgén del factor IX humano a una dosis de 3×10^{12} vg / kg. Los niveles de plasma del producto transgénico FIX humano (proteína) en los primates no humanos se determinaron mediante ELISA semanalmente durante toda la duración del estudio y se ilustran en la **Figura 6**.

[0201] Uno de los animales que recibieron AAV-RHM4-1-FIX desarrolló un inhibidor contra el producto transgénico del factor IX humano, que es un fenómeno bien documentado que se produce

en aproximadamente el 20% de los macacos tratados con un vector de FIX humano debido a pequeñas diferencias de aminoácidos entre las proteínas humanas y de macacos. La pérdida de la expresión en un animal tratado con RHM4-1 se debió al desarrollo de una respuesta de anticuerpos contra el transgén humano. El segundo animal tratado con RHM4-1 expresó niveles FIX de alrededor de 2 veces mayor en comparación con los macacos tratados con AAV8.

REIVINDICACIONES:

1. Una secuencia de cápside AAV, donde la secuencia tiene una sustitución de aminoácido en cualquiera de las posiciones de aminoácido 195, 199, 201 o 202, de la secuencia de cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO:1), o una sustitución de aminoácido de una arginina para una lisina en la secuencia de cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO:1).
2. La secuencia de cápside AAV de la reivindicación 1, donde los residuos corresponden con un aminoácido A, V, P o N en cualquiera de las posiciones de aminoácido 195, 199, 201 o 202 de la secuencia de cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO:1).
3. La secuencia de cápside AAV de la reivindicación 1, donde la secuencia tiene un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO:1).
4. La secuencia de cápside AAV de la reivindicación 1, donde la secuencia tiene dos de un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V, en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición del aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de cápside VP1 RH74 (SEQ ID NO: 1).
5. La secuencia de cápside AAV de la reivindicación 1, donde la secuencia tiene cualquiera de tres de un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202 de la secuencia de cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO:1).
6. La secuencia de cápside AAV de la reivindicación 1, donde la secuencia tiene un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, y un residuo N en la posición de aminoácido position 202 de la secuencia de cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO:1).
7. Una partícula recombinante de AAV, la cual comprende la secuencia de cápside AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) o RHM15-6 (SEQ ID NO:10).
8. Una partícula recombinante de AAV la cual comprende la secuencia de cápside AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) o RHM15-6 (SEQ ID NO:10), donde la partícula encapsida un genoma de vector.

9. Una partícula recombinante de AAV la cual comprende la secuencia de cápside AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) o RHM15-6 (SEQ ID NO:10), donde la partícula encapsida un genoma de vector AAV.
10. La partícula recombinante de AAV de las reivindicaciones 8 o 9, donde el genoma de vector AAV comprende una secuencia de polinucleótido heterólogo.
11. Un método para suministrar o transferir una secuencia de polinucleótido heterólogo en un mamífero o una célula de un mamífero, el cual comprende administrar una partícula recombinante de AAV la cual comprende un genoma de vector recombinante que comprende una secuencia de polinucleótido heterólogo a dicho mamífero o a una célula de dicho mamífero, suministrando o transfiriendo de este modo la secuencia de polinucleótido heterólogo en el mamífero o la célula del mamífero.
12. El método de la reivindicación 11, donde la partícula recombinante de AAV comprende una secuencia de cápside AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) o RHM15-6 (SEQ ID NO:10), o una partícula recombinante AAV de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
13. El método de las reivindicaciones 11 o 12, donde la secuencia de polinucleótido heterólogo está operativamente enlazada con un elemento de control de expresión que confiere transcripción de dicha secuencia de polinucleótido heterólogo.
14. Un método de tratamiento de un mamífero deficiente en la expresión o función de la proteína, que comprende: (a) proporcionar una partícula recombinante de AAV que comprende un genoma de vector recombinante que comprende una secuencia de polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que puede corregir para la expresión o función de la proteína deficiente, donde la secuencia de polinucleótido heterólogo está operativamente enlazada con un elemento de control de expresión que confiere la transcripción de dicha secuencia de polinucleótido heterólogo; y (b) administrar una cantidad de la partícula recombinante de AAV al mamífero donde dicho polipéptido se expresa en el mamífero.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende una secuencia VP1 que tiene 90% o más de identidad de secuencia:
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNNGRGLVLPGYKYLGPFNGL
DKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAV

FQAKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDS
 ESVPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
 LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPPHSS
 SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPC
 YRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL VNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMF
 GKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALP
 GMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQ
 AKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRP
 IGRYLTRNL, o 1-50 sustituciones de aminoácido, supresiones o adiciones a los mismos;
 una secuencia VP2 que tiene 90% o más de identidad de secuencia con:
 TAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDS
 ESVPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
 LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPPHSS
 SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPC
 YRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL VNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMF
 GKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALP
 GMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQ
 AKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRP
 IGRYLTRNL, o 1-50 sustituciones de aminoácido, supresiones o adiciones a los mismos;
 y/o una secuencia VP3 que tiene 90% o más de identidad de secuencia con:
 MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
 LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPPHSS
 SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPC
 YRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL VNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMF
 GKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALP
 GMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQ
 AKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRP
 IGRYLTRNL, o 1-50 sustituciones de aminoácido, supresiones o adiciones a los mismos.

16. El método de la reivindicación 15, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende una sustitución de aminoácido en cualquiera de las posiciones de aminoácido 195, 199, 201 o 202,

de la secuencia de cápside VP1 (SEQ ID NO: 1), o una sustitución de aminoácido de una arginina por una lisina en la secuencia de cápside RH74 VP1 (SEQ ID NO: 1).

17. El método de la reivindicación 16, donde los residuos corresponden con un aminoácido A, V, P o N en cualquiera de las posiciones de aminoácido 195, 199, 201 o 202 de la secuencia de cápside VP1.

18. El método de la reivindicación 15, donde la secuencia de cápside VP1 tiene un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en las posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202.

19. El método de la reivindicación 15, donde la secuencia de cápside VP1 tiene cualquiera de dos de un residuo A en posición de aminoácido 195; un residuo V en posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en posición de aminoácido 202.

20. El método de la reivindicación 15, donde la secuencia de cápside VP1 tiene cualquiera de tres de un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, o un residuo N en la posición de aminoácido 202.

21. El método de la reivindicación 15, donde la secuencia de cápside VP1 tiene un residuo A en la posición de aminoácido 195; un residuo V en posiciones de aminoácido 199, un residuo P en la posición de aminoácido 201, y un residuo N en la posición de aminoácido 202.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende un AAV con una secuencia VP1, VP2, o VP3 que tiene 95% o más de identidad con una o más secuencias VP1, VP2, o VP3 establecidas en la Figura 3.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende una secuencia VP1, VP2, o VP3 que tiene 96% o más de identidad con una o más secuencias VP1, VP2, o VP3 establecidas en la Figura 3.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende una secuencia VP1, VP2, o VP3 que tiene 97% o más de identidad con una o más secuencias VP1, VP2, o VP3 establecidas en la Figura 3.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende una secuencia VP1, VP2, o VP3 que tiene 98% o más de identidad con una o más secuencias VP1, VP2, o VP3 establecidas en la Figura 3.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende una secuencia VP1, VP2, o VP3 que tiene 99% o más de identidad con una o más secuencias VP1, VP2, o VP3 establecidas en la Figura 3.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende una secuencia VP1, VP2, o VP3 que tiene 99.5% o más de identidad con una o más secuencias VP1, VP2, o VP3 establecidas en la Figura 3.
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha partícula recombinante de AAV comprende una secuencia VP1, VP2, o VP3 de AAV-Rh74 establecida en la Figura 3, un vector AAV relacionado con AAV-Rh74 o AAV-Rh74, o RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) o RHM15-6 (SEQ ID NO:10).
29. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha secuencia de polinucleótido heterólogo, o dicha proteína, se expresa a niveles que tienen un efecto terapéutico en el mamífero.
30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicho vector de virus adeno-asociado (AAV) ha aumentado el tropismo para los hepatocitos en comparación con los serotipos Rh74, AAV2 o AAV8.
31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde dicha secuencia de polinucleótido heterólogo o dicha proteína se expresa en una célula, tejido u órgano de dicho mamífero.
32. El método de la reivindicación 31, donde la célula comprende una célula secretora.
33. El método de la reivindicación 31, donde la célula comprende una célula endocrina.
34. El método de la reivindicación 31, donde la célula comprende un hepatocito, una célula neural, una célula glial, una célula de retina, una célula epitelial, una célula de pulmón o una célula madre totipotente, pluripotente o multipotente.
35. El método de la reivindicación 31, donde el tejido u órgano de dicho mamífero comprende hígado, cerebro, sistema nervioso central, médula espinal, ojo, retina o pulmón.
36. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde el mamífero produce una cantidad insuficiente de una proteína, o una proteína defectuosa o aberrante.

37. El método de la reivindicación 36, donde la proteína comprende CFTR (proteína reguladora de la transmembrana de la fibrosis quística), un factor de coagulación de la sangre (coagulación) Factor (Factor XIII, Factor IX, Factor X, Factor VIII, Factor VIIa, la proteína C, etc.) una ganancia del factor función de coagulación de la sangre, un anticuerpo, una proteína 65 kDa específica de epitelio del pigmento de la retina (RPE65), la eritropoyetina, el receptor de LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metal (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en la enfermedad de almacenamiento lisosomal (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, una factor de crecimiento, factor de crecimiento similar a insulina 1 o 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento derivado de la glía, factor α y β del de crecimiento de transformación, una citoquina, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago, linfoquina, un producto de gen suicida, timidina quinasa del virus del herpes simplex, citosina desaminasa, toxina de la difteria, citocromo P450, desoxicitidina quinasa, factor de necrosis tumoral, una proteína de resistencia a los medicamentos, una proteína supresora de tumores (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), poliposis adenomatosa coli (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un péptido tolerogénico o inmunógeno o proteína Tregitope o hCDR1, insulina, glucoquinasa, guanilato ciclasa 2D (LCA-GUCY2D), proteína Rab escolta 1 (Choroideremia), LCA 5 (LCA-Lebercilin), aminotransferasa cetoácido ornitina (Girarte Atrophy), Retinoschisin 1 (Retinoschisis ligado a X), USH1C (Síndrome de Usher 1C), GTPase retinitis pigmentosa ligada a X (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (conexina 26 sordera), ACHM 2, 3 y 4 (Acromatopsia), PKD-1 o PKD-2 (enfermedad renal poliquística), TPP1, CLN2, un producto génico implicado en enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, sulfatasas, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP, NPC1, VPC2, una proteína activadora de esfingolípidos, o una o más nucleasas de dedos de zinc para la edición de genoma, o secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma.

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde la secuencia de polinucleótido heterólogo comprende un gen que codifica un polipéptido, un péptido o una proteína.

39. El método de la reivindicación 38, donde el gen comprende o codifica CFTR (proteína reguladora de transmembrana de la fibrosis quística), un factor de coagulación de la sangre (coagulación) (Factor XIII, Factor IX, Factor X, Factor VIII, Factor VIIa, proteína C, etc.) incluyendo la ganancia de función de factores de coagulación de la sangre, un anticuerpo, proteína

de 65 kDa específica epitelio pigmentario de la retina (RPE65), eritropoyetina, receptor LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa (ADA), un transportador de metal (ATP7A o ATP7), sulfamidasa, una enzima implicada en la enfermedad de almacenamiento lisosomal (ARSA), hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, β -25 glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina 1 o 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico -3 y -4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento transformante α y β , una citoquina, α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, factor de estimulación de colonia de granulocitos-macrófago, linfotóxina, un producto de gen suicida, virus herpes simplex timidina quinasa, citosina desaminasa, toxina de la difteria, citocromo P450, desoxicitidina quinasa, factor de necrosis tumoral, una proteína de resistencia a los medicamentos, una proteína supresora de tumores (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), poliposis adenomatosa coli (APC)), un péptido con propiedades inmunomoduladoras, un tolerógeno o péptido inmunogénico o proteína Tregitope o hCDR1, insulina, glucoquinasa, guanilato ciclasa 2D (LCA-GUCY2D), proteína Rab escolta 1 (Choroideremia), LCA 5 (LCA-Lebercilin), aminotransferasa cetoácido ornitina (Gyrate Atrophy), Retinoschisin 1 (Retinosquiasis ligado a X), USH1C (Síndrome de Usher 1C), retinitis pigmentosa ligada a X GTPase (XLRP), MERTK (formas AR de RP: retinitis pigmentosa), DFNB1 (conexina 26 sordera), ACHM 2, 3 y 4 (Acromatopsia), PKD-1 o PKD-2 (enfermedad renal poliquística), TPP1, CLN2, producto del gen implicado en enfermedades de almacenamiento lisosomal (por ejemplo, sulfatasas, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, catepsina A, GM2-AP, NPC1, VPC2, proteínas activadoras de esfingolípidos, o una o más nucleasas de dedos de zinc para la edición de genoma, o de secuencias donantes usadas como plantillas de reparación para la edición del genoma.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde la secuencia de polinucleótido heterólogo comprende un ácido nucleico inhibidor.

41. El método de la reivindicación 40, donde el ácido nucleico inhibidor comprende micro-ARN (miARN), siARN, shARN, ARN trans-empalme, ARN antisentido o ARN formador de triplex.

42. El método de la reivindicación 40, donde el ácido nucleico inhibidor se une con un gen patogénico, una transcripción de un gen patogénico, o una transcripción de genes asociada con una enfermedad de repetición de nucleótido, gen huntingtina (HTT), un gen asociado con la atrofia dentatorubropallidoluysian (atrofina 1, ATN1), receptor de andrógenos en el cromosoma X en la atrofia muscular espinobulbar, la Ataxina humana-1, -2, -3, y -7, $Ca_v2.1$ P / Q canal de calcio

dependiente de la tensión está codificada por el (CACNA1A), proteína que une TATA, Ataxina 8 de hebra opuesta, también conocida como ATXN8OS, fosfatasa de proteína serina / treonina 2A 55 kDa subunidad reguladora B beta isoforma en la ataxia espinocerebelosa (tipo 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 17), *FMR1* (retraso mental frágil X 1) en el síndrome X frágil, *FMR1* (retraso mental frágil X 1) en el síndrome de temblor / ataxia X-asociado frágil, *FMR1* (retraso mental frágil X 2) o AF4 / FMR2 miembro familiar en retraso mental frágil XE 2; Miotonina-proteína quinasa (MT-PK) en la distrofia miotónica; frataxina en la ataxia de Friedreich; un mutante del gen de superóxido dismutasa 1 (SOD1) en la esclerosis lateral amiotrófica; un gen implicado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y / o la enfermedad de Alzheimer; apolipoproteína B (APOB) y convertasa subtilisina proproteína / Kexin tipo 9 (PCSK9), hipercolesterolemia; VIH Tat, transactivador del virus de la inmunodeficiencia humana de la transcripción de genes, en la infección por el VIH; VIH TAR, VIH TAR, el gen del elemento de respuesta del transactivador del virus de inmunodeficiencia humana, en la infección por el VIH; C-C del receptor de quimiocinas (CCR5) en la infección por el VIH; Virus del sarcoma de Rous (RSV) proteína de la nucleocápside en la infección por VRS, microARN específico de hígado (miR-122) en la infección por el virus de la hepatitis C; p53, lesión renal aguda o función retardada del injerto trasplante de riñón o insuficiencia renal insuficiencia renal aguda; proteína quinasa N3 (PKN3) en malignidades recurrente adelantado o tumores malignos sólidos; LMP2, LMP2 también conocido como la subunidad proteasoma tipo beta 9 (PSMB 9), el melanoma metastásico; LMP7, también conocido como la subunidad del proteasoma de tipo beta 8 (PSMB 8), melanoma metastásico; MECL1 también conocido como la subunidad proteasoma tipo beta 10 (PSMB 10), el melanoma metastásico; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los tumores sólidos; proteína del husillo kinesina en tumores sólidos, supresor de la apoptosis de las células B de CLL / linfoma (BCL-2) en la leucemia mieloide crónica; ribonucleótido reductasa M2 (RRM2) en tumores sólidos; furina en los tumores sólidos; quinasa 1 similar a polo (PLK1) en tumores hepáticos, diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) en la infección por hepatitis C, beta-catenina en la poliposis adenomatosa familiar; receptor adrenérgico beta 2, glaucoma; RTP801 / Redd1 también conocida como proteína 4 de transcripción de daño inducible DAN, en el edema macular diabético (DME) o degeneración macular relacionada con la edad; receptor de factor de crecimiento vascular endotelial I (VEGFR1) en la degeneración macular relacionada con la edad o neivascularization coroidea, caspasa 2 en la neuropatía óptica isquémica no arterítica; queratina 6A N17K proteína mutante en paquioniquia congénita; genoma del virus de la gripe A / secuencias de genes en la infección por influenza; síndrome respiratorio agudo severo (SARS) del genoma del coronavirus / secuencias de genes en la infección por SARS; genoma del virus sincicial respiratorio / secuencias genes en la infección por el virus sincicial respiratorio; genoma de ébola filovirus / secuencia de genes en la infección por ébola; genoma del virus de la hepatitis B y C / secuencias de genes en la infección por hepatitis B y C; genoma del virus del herpes simplex (HSV) / secuencias

de genes en la infección por HSV, genoma del virus Coxsackie B3 / secuencias de genes en la infección por virus coxsackie B3; silenciamiento de un alelo patógeno de un gen (silenciamiento específico de alelo) como torsina A (TOR1A) en la distonía primaria, clase I y pan y HLA-alelo específico en el trasplante; o gen de la rodopsina mutante (RHO) en la retinitis pigmentosa autosómica dominantemente heredado (adRP).

43. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde el mamífero tiene una enfermedad pulmonar (por ejemplo, fibrosis cística), un trastorno de coagulación (por ejemplo, hemofilia A or hemofilia B con o sin inhibidores), talasemia, un trastorno de la sangre (por ejemplo, anemia), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), epilepsia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, trastornos acumulación de cobre o de hierro (por ejemplo, enfermedad de Wilson o Menkes) deficiencia de lipasa ácida lisosomal, un trastorno neurológico o neurodegenerativo, cáncer, diabetes tipo 1 o tipo 2, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina deaminasa, un defecto metabólico (por ejemplo, enfermedades de almacenamiento de glucógeno), una enfermedad degenerativa de la retina (como RPE65 deficiente, coroideremia, y otras enfermedades del ojo), una enfermedad de órganos sólidos (por ejemplo, cerebro, hígado, riñón, corazón), o un virus infeccioso (por ejemplo, hepatitis B y C, VIH, etc.), enfermedad bacteriana o fúngica.

44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde el elemento de control de expresión comprende un elemento de control constitutivo o regulable.

45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde el elemento de control de expresión comprende un elemento o promotor de control de la expresión específica de tejido.

46. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde el vector AAV se suministra de manera intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, oral, mediante incubación, vía catéter, dérmica, intra-craneal, vía inhalación, intra-cavidad, o mucosa.

47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde el mamífero es humano.

48. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde el mamífero es seropositivo para un serotipo AAV diferente de AAV-Rh74.

49. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 143, donde el mamífero es seropositivo para un serotipo AAV AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 o AAV11.

50. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde el mamífero es seronegativo o seropositivo para AAV-Rh74.
51. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, el cual comprende además administrar una cápside vacía AAV.
52. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, el cual comprende además administrar cápside vacía AAV-Rh74 o cápside vacía que comprende una secuencia de cápside AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) o RHM15-6 (SEQ ID NO:10).
53. El método de la reivindicación 52, donde la secuencia VP1, VP2 o VP3 tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, sustituciones de aminoácido conservadoras, no conservadoras, o conservadoras y no conservadoras.
54. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 14, donde la partícula de AAV comprende una composición farmacéutica.
55. El método de la reivindicación 54, donde la composición farmacéutica comprende una cápside vacía AAV.
56. El método de la reivindicación 54, donde la composición farmacéutica comprende una cápside vacía AAV-Rh74 o una cápside vacía que comprende una secuencia de cápside AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) o RHM15-6 (SEQ ID NO:10).

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
BEDGOOD, Robert M. Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP P.O. Box 10500 McLean, Virginia 22101 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing (day/month/year) 15 January 2016 (15.01.2016)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 74659-433285	
International application No. PCT/US2014/047670	International filing date (day/month/year) 22 July 2014 (22.07.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:			
☐ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent	☐ the common representative
Name and Address HIGH, Katherine 201 Greenway Lane Merion, Pennsylvania 19066 United States of America		State of Nationality	State of Residence
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:			
☐ the person	☒ the name	☒ the address	☐ the nationality ☐ the residence
Name and Address HIGH, Katherine A. 201 Greenway Lane Merion Station, Pennsylvania 19066 United States of America		State of Nationality	State of Residence
		Telephone No.	
		Facsimile No.	
		E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:			
4. A copy of this notification has been sent to:			
☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority		
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned		
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned		
	☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Hidalgo Roberto
Facsimile No. +41 22 338 71 30	e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BEDGOOD, Robert M.
Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
P.O. Box 10500
McLean, Virginia 22101
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing (day/month/year) 15 January 2016 (15.01.2016)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 74659-433285	
International application No. PCT/US2014/047670	International filing date (day/month/year) 22 July 2014 (22.07.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address YAZICIOGLU, Mustafa 34th Street & Civic Center, Boulevard Philadelphia, Pennsylvania 19104 United States of America	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address YAZICIOGLU, Mustafa N. Akse Mahallesi, Guzeltepe Konutlari, 450. Sok. A-3 blok D:7, Cayirova/Kocaeli Turkey	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Hidalgo Roberto
Facsimile No. +41 22 338 71 30	e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
BEDGOOD, Robert M. Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP P.O. Box 10500 McLean, Virginia 22101 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing (day/month/year) 15 January 2016 (15.01.2016)
--

Applicant's or agent's file reference 74659-433285

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No. PCT/US2014/047670
--

International filing date (day/month/year) 22 July 2014 (22.07.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:				
☐ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent	☐ the common representative	
Name and Address ANGUELA, Xavier 34th Street & Civic Center, Boulevard Philadelphia, Pennsylvania 19104 United States of America		State of Nationality	State of Residence	
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		E-mail address		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:				
☐ the person	☐ the name	☒ the address	☐ the nationality	☐ the residence
Name and Address ANGUELA, Xavier 1806 Montrose St., Philadelphia, PA 19146 United States of America		State of Nationality	State of Residence	
		Telephone No.		
		Facsimile No.		
		E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized		
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to:				
☒ the receiving Office	☒ the International Preliminary Examining Authority			
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned			
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned			
	☐ other:			

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Hidalgo Roberto e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
Facsimile No. +41 22 338 71 30	

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Children's Hospital of Philadelphia

YAZICIOGLU, MUSTAFA

HIGH, KATHERINE

ANGUELA, XAVIER

<120> Variante AAV y Composiciones, Métodos y Usos para Transferencia de Gen
a Células, Órganos y Tejidos

<130> 074659-0433285

<150> 61/857161

<151> 2013-07-22

<150> 61/985365

<151> 2014-04-28

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 738

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<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 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

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
625 630 635 640

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 2

<211> 2217

<212> ADN

<213> Virus adeno-asociado

<400> 2

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60

gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac 120

aacggccggg gtctgggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cgactcgac 180

aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgaaa ggcctacgac 240
cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgcgc agtcttcag 360
gccaaaaagc gggttctcga acctctgggc ctggttgaat cgccgggtaa gacggctcct 420
ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgtctc cagactctc tacgggcatc 480
ggcaagaaag gccagcagcc cgcaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca 540
gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag caggcccctc tggctcggga 600
tctggtacaa tggctgcagg cgggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggcgccgac 660
ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720
atcaccacca gcacccgcac ctgggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa 780
atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctactcgg ctacagcacc 840
ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact ttaccacg tgactggcag 900
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaactcaa gctctcaac 960
atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgcaa taaccttacc 1020
agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg 1080
caccagggtc gcctgcctcc gttcccgcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac 1140
ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctcgt cttctactg cctggagtac 1200
tttctctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat tcagctaaa cttcaggac 1260
gtgcccttc acagcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgat gaaccctctc 1320
atcgaccagt actgtacta cctgtcccg actcaaagca cgggcggtac tgcaggaact 1380
cagcagttgc tttttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg 1440
ctaccgggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac 1500
agcaacttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg 1560

aatcctggcg ttgcatggc tacccacaag gacgacgaag agcgatttt tccatccagc 1620
ggagtcttaa tgtttgggaa acagggagct ggaaaagaca acgtggacta tagcagcgtg 1680
atgctaacca gcgaggaaga aataaagacc accaaccagc tggccacaga acagtacggc 1740
gtggtggccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt 1800
caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca ggggccatc 1860
tgggccaaga ttctcatac ggacggcaac ttcatccct cgccgctgat gggaggcttt 1920
ggactgaagc atccgctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgcgatcct 1980
ccgaccacct tcaatcaggc caagctggct tcttcatca cgcagtacag taccggccag 2040
gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag 2100
attcagtaca cttccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag 2160
ggtacttatt ccgagcctcg ccccatggc acccgttacc tcaccgtaa tctgtaa 2217

<210> 3
<211> 601
<212> PRT
<213> Virus adeno-asociado

<400> 3

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser
1 5 10 15

Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys
20 25 30

Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp
35 40 45

Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser
50 55 60

Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu
 65 70 75 80

Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser
 85 90 95

Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala
 100 105 110

Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr
 115 120 125

Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro
 130 135 140

Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg
 145 150 155 160

Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg
 165 170 175

Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn
 180 185 190

Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val
 195 200 205

Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His
 210 215 220

Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln
 225 230 235 240

Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser
 245 250 255

Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly
260 265 270

Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser
275 280 285

Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile
290 295 300

Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr
305 310 315 320

Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met
325 330 335

Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln
340 345 350

Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp
355 360 365

Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn
370 375 380

Pro Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe
385 390 395 400

Pro Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp
405 410 415

Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys
420 425 430

Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn
 435 440 445

Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln
 450 455 460

Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln
 465 470 475 480

Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro
 485 490 495

Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile
 500 505 510

Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn
 515 520 525

Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val
 530 535 540

Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp
 545 550 555 560

Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val
 565 570 575

Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile
 580 585 590

Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 595 600

<210> 4

<211> 535

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 4

Met Ala Ala Gly Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala
1 5 10 15

Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
20 25 30

Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro
35 40 45

Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly
50 55 60

Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly
65 70 75 80

Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp
85 90 95

Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn
100 105 110

Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly
115 120 125

Thr Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr
130 135 140

Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly
145 150 155 160

Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly

165

170

175

Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe

180

185

190

Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn

195

200

205

Phe Glu Phe Ser Tyr Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr

210

215

220

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln

225

230

235

240

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly

245

250

255

Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala

260

265

270

Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val

275

280

285

Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly

290

295

300

Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly

305

310

315

320

Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser

325

330

335

Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val

340

345

350

Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr
355 360 365

Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln
370 375 380

Gln Gln Asn Ala Ala Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala
385 390 395 400

Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro
405 410 415

Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro
420 425 430

Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile
435 440 445

Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala
450 455 460

Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val
465 470 475 480

Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro
485 490 495

Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe
500 505 510

Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr
515 520 525

Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

530 535

<210> 5
<211> 738
<212> PRT
<213> Virus adeno-asociado

<400> 5

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

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp 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

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

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

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

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

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly 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
625 630 635 640

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 6

<211> 738

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 6

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

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

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

Gly Tyr Arg 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 Arg Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

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

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Arg 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 Arg 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 Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 7

<211> 738

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 7

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

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

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

Gly Tyr Arg 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 Arg Ala Tyr Asp
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Arg 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 Arg 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 Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 8

<211> 738

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 8

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

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

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

Gly Tyr Arg 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 Arg Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

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

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

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

Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg 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 Arg 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 Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly

195 200 205

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

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

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

Leu Tyr Arg 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 Arg 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 Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540

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

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr

565

570

575

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 9
<211> 738
<212> PRT
<213> Virus adeno-asociado

<400> 9

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

Gly Tyr Arg 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 Arg Ala Tyr Asp
65 70 75 80

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

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

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

Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg 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 Arg 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 Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

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

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

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

Leu Tyr Arg 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 Arg 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 Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 10

<211> 738

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 10

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

Gly Tyr Arg 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 Arg Ala Tyr Asp
65 70 75 80

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

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

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

Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg 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 Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205

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

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

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

Leu Tyr Arg 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 Arg 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 Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Arg Leu Ala Ser Phe

660

665

670

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 11

<211> 2214

<212> ADN

<213> Virus adeno-asociado

<400> 11

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60

gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac 120

aacggccggg gtctgggtgct tcttggtac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180

aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300

caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgcgc agtcttcag 360

gccaaaaagc gggttctcga acctctgggc ctggttgaat cgccggttaa gacggctcct 420

ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgtctc cagactctc tacgggcatc 480

ggcaagaaag gccagcagcc cgcaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca 540

gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga	600
cctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggcgccgac	660
ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc	720
atcaccacca gcacccgcac ctgggcccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa	780
atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc	840
ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact ttaccacg tgactggcag	900
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaactcaa gctcttcaac	960
atccaagtca aggagggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgccaa taaccttacc	1020
agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg	1080
caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac	1140
ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctgt ctttctactg cctggagtac	1200
tttcttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat tcagctaca cttcgaggac	1260
gtgcccttcc acagcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgat gaacctctc	1320
atcgaccagt acttgacta cctgtcccgg actcaaagca cgggcgggtac tgcaggaact	1380
cagcagttgc tattttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg	1440
ctacccgggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac	1500
agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg	1560
aatcctggcg ttgcatggc taccacaag gacgacgaag agcgatttt tccatccagc	1620
ggagtcttaa tgtttgggaa acagggagct ggaaaagaca acgtggacta tagcagcgtg	1680
atgctaacca gcgaggaaga aataaagacc accaaccag tggccacaga acagtacggc	1740
gtggtggccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt	1800
caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca ggggtccatc	1860
tgggccaaaga ttctcatac ggacggcaac ttcatccct cgccgctgat gggaggcttt	1920

ggactgaagc atccgcctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgcggatcct 1980

ccgaccacct tcaatcaggc caagctggct tctttcatca cgcagtacag taccggccag 2040

gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag 2100

attcagtaca ctccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag 2160

ggtacttatt ccgagcctcg cccattggc acccgttacc tcaccgtaa tctg 2214

<210> 12

<211> 2217

<212> ADN

<213> Virus adeno-asociado

<400> 12

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60

gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac 120

aacggccggg gtctgggtgct tcttggtac aggtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180

aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac 240

cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300

caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgcgc agtcttcag 360

gccaaaaagc gggttctcga acctctgggc ctggttgaat cgccggttag gacggctcct 420

ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgtctc cagactctc tacgggcatc 480

ggcaagaaag gccagcagcc cgcaagaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca 540

gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga 600

cctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgt ccaatggcag acaataacga aggcgccgac 660

ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720

atcaccacca gcacccgcac ctgggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaggcaa 780

atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc 840

ccctgggggt attttgactt caacagattc cactgccact ttaccacg tgactggcag 900

cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaactcaa gctcttcaac 960

atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc 1020

agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg 1080

caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac 1140

ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctgt ccttctactg cctggagtac 1200

tttcttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat tcagctaaa cttcgaggac 1260

gtgcccttcc acagcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgat gaacctctc 1320

atcgaccagt acttgacta cctgtcccg actcaaagca cgggcgggtac tgcaggaact 1380

cagcagttgc ttttttca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg 1440

ctaccgggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac 1500

agcaacttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg 1560

aatcctggcg ttgcatggc taccacagg gacgacgaag agcgatttt tccatccagc 1620

ggagtcttaa tgttgggag acagggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg 1680

atgctaacca gcgaggaaga aataaggacc accaaccag tggccacaga acgtacggc 1740

gtggtggccg ataactgca acagcaaac gccgctcta ttgtaggggc cgtcaatagt 1800

caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca gggctccatc 1860

tgggccaaga ttctcatac ggacggcaac ttcatccct cgccgctgat gggaggcttt 1920

ggactgaagc atccgctcc tcagatcctg attaaaaa cacctgttcc cgcggatcct 1980

ccgaccacct tcaatcaggc caagctggct tcttcatca cgcagtacag taccggccag 2040

gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag 2100

attcagtaca ctccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag 2160

ggtacttatt ccgagcctcg cccattggc acccgttacc tcaccgtaa tctgtaa 2217

<210> 13
 <211> 2217
 <212> ADN
 <213> Virus adeno-asociado

<400> 13
 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60
 gagtggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac 120
 aacggccggg gtctggtgct tcctggctac aggtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180
 aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac 240
 cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgcgc agtcttcag 360
 gccaaaaagc gggttctcga acctctgggc ctggttgaat cgccggtag gacggctcct 420
 ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgtctc cagactcctc tacgggcatc 480
 ggcaagagag gccagcagcc cgcaagaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca 540
 gagtcagtcc ccgacctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga 600
 cctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggcgccgac 660
 ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720
 atcaccacca gcacccgcac ctgggcccctg cccacctaca acaaccacct ctacaggcaa 780
 atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc 840
 ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact tttaccacg tgactggcag 900
 cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaactcaa gctcttcaac 960
 atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc 1020
 agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg 1080
 caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac 1140
 ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctcgt ccttctactg cctggagtac 1200

tttccttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat tcagctacaa cttcgaggac 1260

gtgcccttcc acagcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgat gaaccctctc 1320

atcgaccagt acttgacta cctgtcccgg actcaaagca cgggcggtac tgcaggaact 1380

cagcagttgc tattttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg 1440

ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac 1500

agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg 1560

aatcctggcg ttgcatggc tacccacagg gacgacgaag agcgattttt tccatccagc 1620

ggagtcttaa tgtttgggaa acagggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg 1680

atgctaacca gcgaggaaga aataaggacc accaaccagc tggccacaga acagtacggc 1740

gtggtggccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt 1800

caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca ggggtccatc 1860

tgggccaaga ttctcatac ggacggcaac ttctatccct cgccgctgat gggaggcttt 1920

ggactgaagc atccgcctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgcggatcct 1980

ccgaccacct tcaatcaggc caagctggct tctttcatca cgcagtacag taccggccag 2040

gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag 2100

attcagtaca ctccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag 2160

ggtacttatt ccgagcctcg ccccatggc acccgttacc tcaccgtaa tctgtaa 2217

<210> 14

<211> 2217

<212> ADN

<213> Virus adeno-asociado

<400> 14

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60

gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac 120

aacggccggg gtctggtgct tcctggctac aggtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180
 aagggggagc ccgtcaacgc ggcggaacgca gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac 240
 cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgcgc agtcttcag 360
 gccaaaaagc gggttctcga acctctgggc ctggttgaat cgccggttag gacggctcct 420
 ggaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgtctc cagactcctc tacgggcatc 480
 ggcaagagag gccagcagcc cgcaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca 540
 gagtcagtcc ccgacctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtggga 600
 cctaatacaa tggctgcagg cggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggcgccgac 660
 ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720
 atcaccacca gcacccgcac ctggggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaggcaa 780
 atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc 840
 ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact ttaccacg tgactggcag 900
 cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaactcaa gctcttcaac 960
 atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc 1020
 agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg 1080
 caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac 1140
 ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctcg ctttctactg cctggagtac 1200
 tttccttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat tcagctacaa cttcgaggac 1260
 gtgcccttc acagcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgat gaacctctc 1320
 atcgaccagt acttgacta cctgtcccg actcaaagca cgggcgggtac tgcaggaact 1380
 cagcagttgc tattttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg 1440
 ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac 1500

agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg 1560
 aatcctggcg ttgcatggc tacccacagg gacgacgaag agcgattttt tccatccagc 1620
 ggagtcttaa tgtttgggag acagggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg 1680
 atgctaacca gcgaggaaga aataaggacc accaaccagc tggccacaga acagtacggc 1740
 gtggtggccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt 1800
 caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca ggggtccatc 1860
 tgggccaaaga ttctcatac ggacggcaac ttatccct cgccgctgat gggaggcttt 1920
 ggactgaagc atccgcctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgcggatcct 1980
 ccgaccacct tcaatcaggc caagctggct tctttcatca cgcagtacag taccggccag 2040
 gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag 2100
 attcagtaca cttccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag 2160
 ggtacttatt ccgagcctcg cccattggc acccgttacc tcaccgtaa tctgtaa 2217

<210> 15

<211> 2217

<212> ADN

<213> Virus adeno-asociado

<400> 15

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60
 gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac 120
 aacggccggg gtctggtgct tcctggctac aggtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180
 aaggggggagc ccgtcaacgc ggccggacgca gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac 240
 cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgcgc agtcttccag 360
 gccaaaaagc gggttctcga acctctgggc ctggttgaat cgccggtag gacggctcct 420
 ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgtctc cagactctc tacgggcatc 480

ggcaagagag gccagcagcc cgcaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca 540
 gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga 600
 cctaatacaa tggctgcagg cggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggcgccgac 660
 ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720
 atcaccacca gcacccgcac ctgggcccctg cccacctaca acaaccacct ctacaggcaa 780
 atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc 840
 ccctgggggt attttgactt caacagattc cactgccact tttcaccacg tgactggcag 900
 cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaactcaa gctcttcaac 960
 atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc 1020
 agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg 1080
 caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac 1140
 ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctgt ccttctactg cctggagtac 1200
 tttccttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat tcagctacaa cttcgaggac 1260
 gtgcccttcc acagcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgat gaaccctctc 1320
 atcgaccagt acttgacta cctgtcccgg actcaaagca cgggcggtac tgcaggaact 1380
 cagcagttgc tatttttca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg 1440
 ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac 1500
 agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg 1560
 aatcttggcg ttgcatggc tacccacagg gacgacgaag agcgattttt tccatccagc 1620
 ggagtcttaa tgtttgggaa acagggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg 1680
 atgctaacca gcgaggaaga aataaggacc accaaccagc tggccacaga acagtacggc 1740
 gtggtggccg ataacctgca acagcaaac gccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt 1800
 caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca ggggtccatc 1860

tgggccaaga ttctcatac ggacggcaac tttcatccct cgccgctgat gggaggcttt 1920
 ggactgaagc atccgcctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgcgatcct 1980
 ccgaccacct tcaatcaggc caggctggct tctttcatca cgagtagacag taccggccag 2040
 gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag 2100
 attcagtaca cttccaacta ctacaaatct acaaagtgg actttgctgt caatactgag 2160
 ggtacttatt ccgagcctcg cccattggc accgttacc tcaccgtaa tctgtaa 2217

 <210> 16
 <211> 2217
 <212> ADN
 <213> Virus adeno-asociado

 <400> 16
 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctgaggaca acctctctga gggcattcgc 60
 gagtggtagg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac 120
 aacggccggg gtctggtgct tctggctac aggtacctcg gaccctcaa cggactcgac 180
 aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac 240
 cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgcgc agtcttcag 360
 gccaaaaagc gggttctcga acctctgggc ctggttgaat cgccggttag gacggctcct 420
 ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgtctc cagactctc tacgggcatc 480
 ggcaagaaag gccagcagcc cgcaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca 540
 gagtcagtcc ccgacctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtggga 600
 cctaatacaa tggctgcagg cggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggcgccgac 660
 ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720
 atcaccacca gcaccgcac ctgggcccctg cccacctaca acaaccacct ctacaggcaa 780

atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc 840

ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact ttaccacg tgactggcag 900

cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaactcaa gctcttcaac 960

atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc 1020

agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcggcg 1080

caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac 1140

ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctcg cttctactg cctggagtac 1200

tttcttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat tcagctaaa cttcgaggac 1260

gtgcccttcc acagcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgat gaaccctctc 1320

atcgaccagt acttgacta cctgtcccg actcaaagca cgggcggtac tgcaggaact 1380

cagcagttgc tattttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg 1440

ctaccgggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac 1500

agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg 1560

aatcctggcg ttgcatggc taccacagg gacgacgaag agcgatttt tccatccagc 1620

ggagtcttaa tgtttgggag acaggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg 1680

atgctaacca gcgaggaaga aataaggacc accaaccag tggccacaga acagtacggc 1740

gtggtggccg ataacctgca acagcaaac gccgctccta ttgtaggggc cgtcaatagt 1800

caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca ggggtccatc 1860

tgggccaaga ttctcatal ggacggcaac ttctatccct cgccgctgat gggaggcttt 1920

ggactgaagc atccgcctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgcggatcct 1980

ccgaccacct tcaatcaggc caggctggct tctttcatca cgcagtacag taccggccag 2040

gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag 2100

attcagtaca cttccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag 2160

ggtacttatt ccgagcctcg ccccatgggc acccgttacc tcacccgtaa tctgtaa 2217

**VARIANTE AAV Y COMPOSICIONES, MÉTODOS Y USOS PARA TRANSFERENCIA
DE GEN A CÉLULAS, ÓRGANOS Y TEJIDOS**

RESUMEN

[0202] La invención se refiere a un virus adeno-asociado (AAV) serotipo AAV-Rh74 y vectores relacionados AAV, un vector AAV-Rh74 y AAV relacionado mediado por métodos de transferencia de genes y usos. En particular, AAV-Rh74 y vectores AAV relacionados dirigen a polinucleótidos diana a las células, tejidos u órganos para la expresión (transcripción) de los genes que codifican proteínas terapéuticas y péptidos, y polinucleótidos que funcionan como o se transcriben en secuencias de ácidos nucleicos inhibidores.

Figura 6

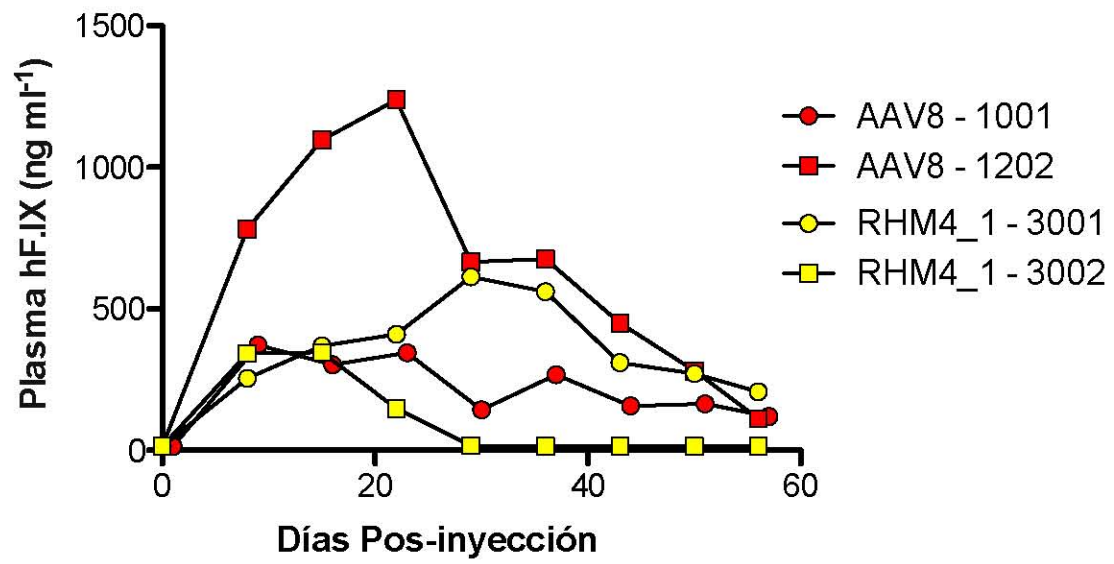
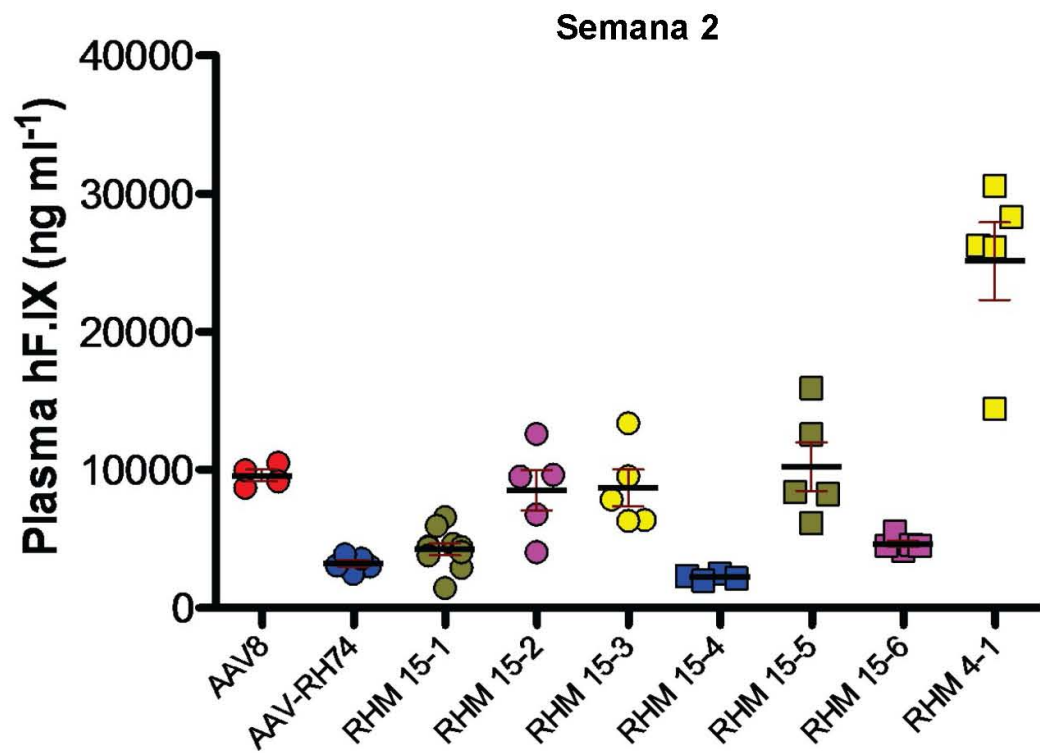
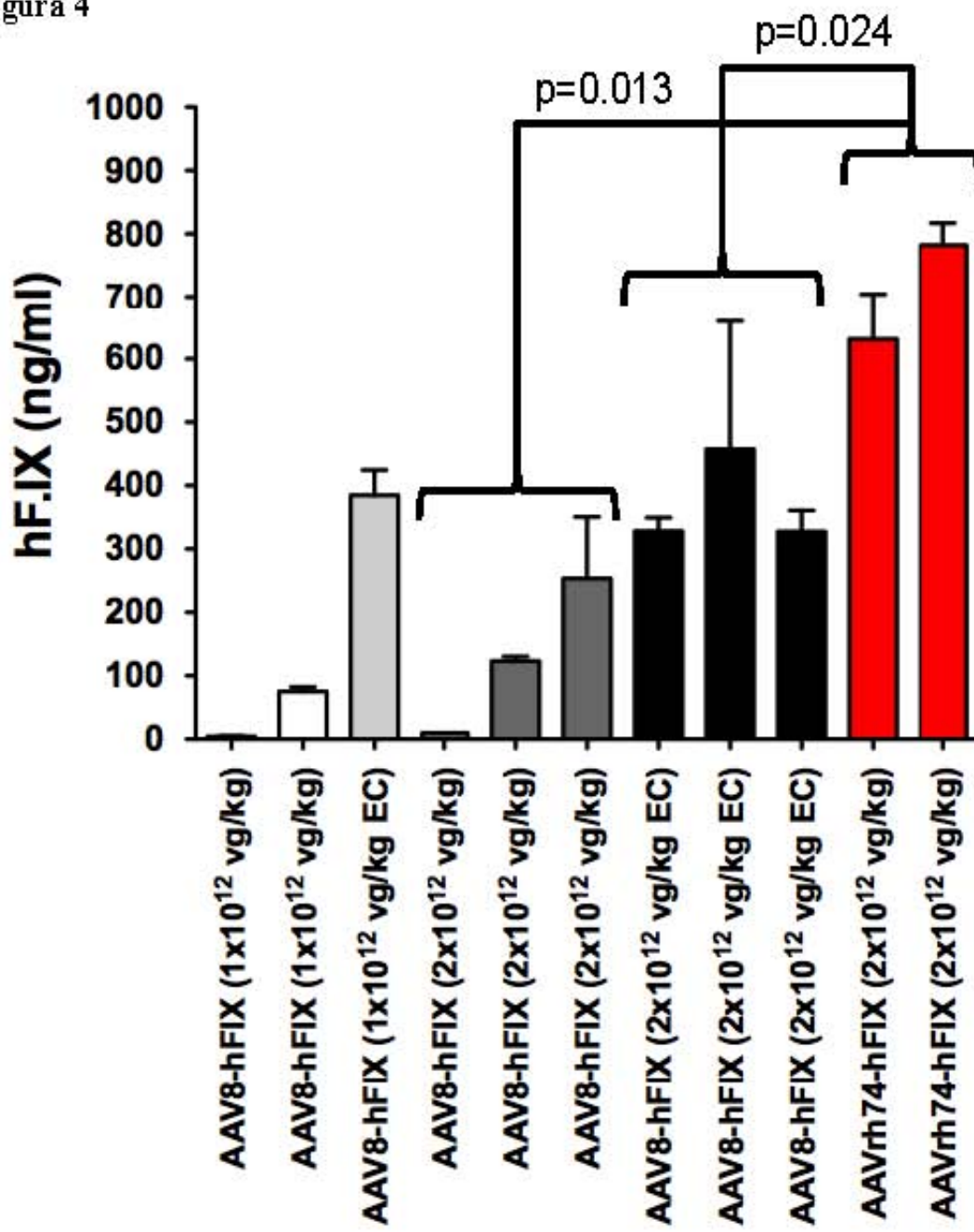


Figura 5



RHM4_1	G195A-L199V- S201P-G202N
RHM15_2	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R
RHM15_3	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R
RHM15_4	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R
RHM15_5	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R
RHM15_6	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R

Figura 4



TGTGGACTTTGCTGTCAATACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACC
TCACCCGTAATCTGTAA

Aminoácido VP2 Rh74 (SEQ ID NO:3):

TAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMAD
NNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDREVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFH
CHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPF
PADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYL
YYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLNVN
GVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVN
SQGALPGMVWQNRDVYLQGPiWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQY
STGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Aminoácido VP3 Rh74 (SEQ ID NO:4):

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDREVITTTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYST
PWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVL
GSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPPHSSYAHSQSLD
RLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKY
HLNGRDSLNVNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQ
QNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPiWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFN
QAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Aminoácido VP1 RHM4-1 (SEQ ID NO:5)

1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpggapkpkankqkdngrglvlpgykylgpfngld
61 kgepvnaadaaaalehd kaydqqlqagdnpylrynhadaefqerlqedtsfggnlgravfq
121 akkrvleplglvespvktapgkkrpvepspqrspdsstgigkkgqqpakkrlnfggtgds
181 esvpdpqpigepaapsgvgpntmaagggapmadnnegadgv gsssgnwhcdstwl gdrv
241 ittstrtwalptynnhlykqisngtsggstndntyfgystpwgyfdfnrfhchfsprdwq
301 rlinnnwgfrpkrlnfklfniqvkevtqnegtktiannltstiqvftdseyqlpyvlgsa
361 hggclppfpadvfmipqygytl nngsqav grssfy cleyfpsqmlrtgnnfe fsynfed
421 vpfhssyahsqsl drlmnplidqylyylsrtqstggtagtqql lfsqagpnnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvt t t l s q n n n s n f a w t g a t k y h l n g r d s l v n p g v a m a t h k d d e e r f f p s s
541 gvlmfgkqgagkdnvdyssvmltseeeikttnpvateqygvvadnlqqqnaapivgavns
601 qgalpgmvwqnr d v y l q g p i w a k i p h t d g n f h p s p l m g g f g l k h p p p q i l i k n t p v p a d p
661 p t t f n q a k l a s f i t q y s t g q v s v e i e w e l q k e n s k r w n p e i q y t s n y y k s t n v d f a v n t e
721 gtyseprpigtryltrnl

Figura 3 (SEQ ID NOs:1-5)**Aminoácido VP1 Rh74 (SEQ ID NO:1):**

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKG
 EPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGE
 PPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYN
 NHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRHFHCHFSRWDWQRLINNNWGFRPKRLNFK
 LFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTL
 NNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFFSYNFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLS
 RTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYH
 LNGRDSL VNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVAT
 EQYGVVADNLQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHDTGDNFHPSPLMGG
 FGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTS
 NYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL.

ADN VP1 Rh74 (SEQ ID NO:2):

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTG
 GTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCAGCAAAAGCAGGACAACGGCCGG
 GGTCTGGTGCTTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCCGT
 CAACGCGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTG
 ACAATCCGTACCTGCGGTATAATCACGCCGACGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATAC
 GTCTTTTGGGGGCAACCTCGGGCGCGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGCGGGTTCTCGAACCTCTGG
 GCCTGGTTGAATCGCCGGTTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGAGCCATCACCCCA
 GCGCTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAGGCCAGCAGCCCGCAAAAAGAGACTCA
 ATTTTGGGCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCTCAACCAATCGGAGAACCACCAGCA
 GGCCCCCTCTGGTCTGGGATCTGGTACAATGGCTGCAGGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAA
 CGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAGTTCTCAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTGGGC
 GACAGAGTCATCACCAACAGCACCCGCACCTGGGCCCTGCCCACCTACAACAACCACTCTACAA
 GCAAATCTCCAACGGGACCTCGGGAGGAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCC
 CCTGGGGGTATTTTGAATTCAACAGATTCCACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAGCGACTC
 ATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCCCAAGAGGCTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAA
 GGAGGTCACGCAGAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCAGCACGATTTCAGGTC
 TTTACGGAAGTACGGAATACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTCGGCGCACCAGGGCTGCCTGCCCTC
 GTTCCCGGCGGACGTCTTCATGATTCTCAGTACGGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGG
 CTGTGGGCCGGTCTGCTCTTCTACTGCCTGGAGTACTTTCCTTCTCAAATGCTGAGAACGGGCAAC
 AACTTTGAATTTCAGCTACAACCTCGAGGACGTGCCCTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAG
 CCTGGACCGGCTGATGAACCTCTCATCGACCAGTACTTGTACTACCTGTCCCGGACTCAAAGCA
 CGGGCGGTACTGCAGGAACCTCAGCAGTTGCTATTTTCTCAGGCCGGGCCTAACAACATGTGGCT
 CAGGCCAAGAAGTGGCTACCCGGTCCCTGCTACCGGCAGCAACGCGTCTCCACGACACTGTGCGCA
 GAACAACAACAGCAACTTTGCCTGGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCT
 CTGGTGAATCCTGGCGTTGCCATGGCTACCCACAAGGACGACGAAGAGCGATTTTTTCCATCCAG
 CGGAGTCTTAATGTTTGGGAAACAGGGAGCTGGAAAAGACAACGTGGACTATAGCAGCGTGATG
 CTAACCAGCGAGGAAGAAATAAAGACCACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGGTGG
 CCGATAACCTGCAACAGCAAAACGCCGCTCCTATTGTAGGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTA
 CCTGGCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGGCCAAGATTCTCTCA
 TACGGACGGCAACTTTCATCCCTCGCCGCTGATGGGAGGCTTGGACTGAAGCATCCGCCCTCTC
 AGATCCTGATTAATAAACACACCTGTTCCCGCGGATCCTCCGACCACCTTCAATCAGGCCAAGCTG
 GCTTCTTTCATCACGCAGTACAGTACCGGCCAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGA
 AGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCCAGAGATTCAGTACACTTCCAACCTACTACAAATCTACAAA

Figura 2

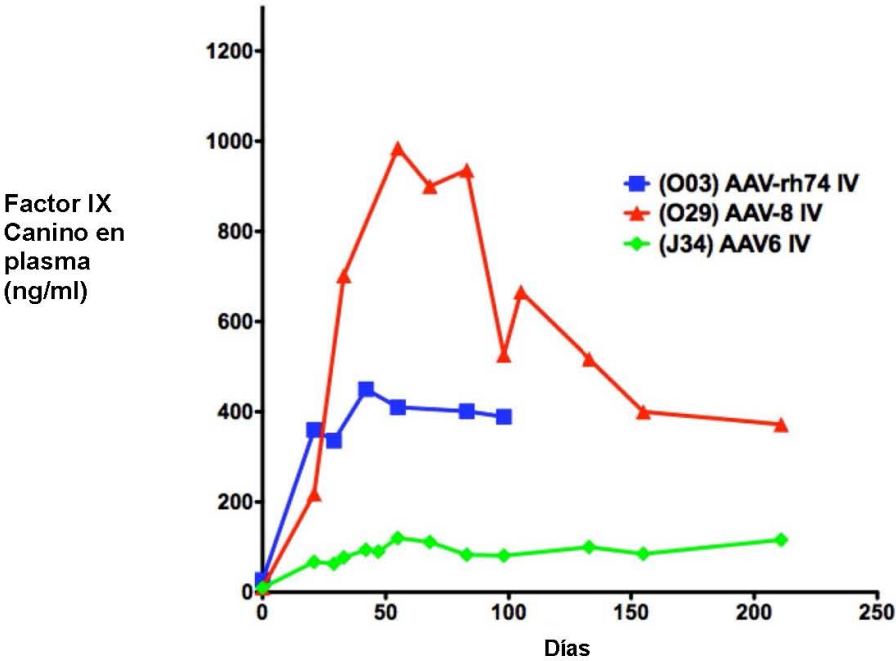


Figura 1

