

P- 2021/37181

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2021/0017692**Solicitud de patente a nombre de **REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., domiciliada en Nueva York, Estados Unidos, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **3395** notificado electrónicamente el 8 de marzo de 2025, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Título

Objeción del examinador:

El examinador objeta el título de la solicitud por considerar que no guarda relación con la materia efectivamente reivindicada, contraviniendo lo dispuesto en el artículo 27 literal d) de la Decisión 486. Asimismo, respecto al título presentado con la modificación radicada bajo el N° NC2021/0017692 el 30 de julio de 2024, señala que este tampoco cumple con los requisitos del artículo mencionado y que además contiene errores tipográficos.

Argumentos del solicitante:

El solicitante respetuosamente no está de acuerdo con el cambio de título propuesto, ya que no refleja con precisión los conceptos inventivos de la presente solicitud. Sin aceptar las alegaciones, propone como alternativa el siguiente título:

"PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE AAV QUE COMPRENDEN SECUENCIAS DE AAV ANIMALES NO PRIMATES Y UN PRIMER MIEMBRO DE UN PAR DE UNIÓN PROTEÍNA:PROTEÍNA, Y COMPOSICIONES DE LAS MISMAS".

Cabe destacar que la solicitud, tal como fue presentada, así como las reivindicaciones actuales, abarcan proteínas de cápside no quiméricas derivadas de AAV de ave (AAAV), AAV de lobo marino y AAV escamoso, todas las cuales comprenden un primer miembro de un par de unión proteína:proteína. Por lo tanto, la enmienda propuesta que recita "PARTÍCULAS VIRALES

QUIMÉRICAS" resulta innecesariamente restrictiva y no representa adecuadamente el objeto técnico de la solicitud ni de las reivindicaciones vigentes.

En vista de lo anterior, se solicita respetuosamente que se acepte el título propuesto y se retire la objeción.

2. Modificación al capítulo reivindicatorio:

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de sesenta y ocho (68) reivindicaciones, el cual reemplaza completamente el documento presentado el 22 de diciembre de 2021. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

- 2.1. Se modificó el capítulo reivindicatorio con el fin de eliminar las antiguas reivindicaciones 1 a 38, 58, 59, 65, 76 a 87, 90 a 98, 105, 106, 110 y 115 a 124. Además, se ajustó la numeración del documento.
- 2.2. Se modificó la antigua reivindicación 39, con el fin de reclamar la proteína de la cápside de AAV según el grupo de donde selecciona la secuencia de aminoácidos AAV VP3. Dicha modificación se sustenta en las antiguas reivindicaciones 18 a 28 y ejemplos de la solicitud.
- 2.3. Se incluyó la nueva reivindicación dos con el fin de reclamar que la proteína de la cápside AAV comprende una secuencia de aminoácidos de la región común VP1/VP2 de la proteína de la cápside AAV, la proteína de la cápside AAV del león marino o la proteína de la cápside AAV escamosa. Dicha reivindicación se sustenta en las reivindicaciones anteriores 11 a 13 y ejemplos de la solicitud.
- 2.4. Se incluye una nueva reivindicación 3 con el fin de reclamar que la proteína de la cápside de AAV es una proteína derivada de dragón barbudo. Dicha reivindicación se sustenta en la antigua reivindicación 23 y ejemplos de la solicitud.
- 2.5. Se incluye la nueva reivindicación cuatro con el fin de reclamar la proteína de la cápside AAV comprende una secuencia de aminoácidos AAV no quimérica o en la que la proteína de la cápside AAV comprende una región VP1 única de una proteína de la cápside AAV de primates. Dicha modificación se sustenta en las antiguas reivindicaciones 11 a 14, 18 y en los ejemplos de la solicitud.

- 2.6. Se incluye la nueva reivindicación 9 con el fin de reclamar que el primer y segundo miembro del par de Unión proteína:proteína se unen mediante un enlace covalente. Dicha modificación se sustenta en las páginas 20, 24 a 27, 31 y 33 de la descripción.
- 2.7. Se modificó la antigua reivindicación 44 (nueva reivindicación 10), con el fin de reemplazar la expresión "*primer y segundo miembro cognado que se une*" por la referencia a que "*el enlace covalente*" es un enlace isozeptídico. Dicha modificación se realiza de conformidad con la nueva reivindicación 9 y las páginas de la descripción que la sustentan.
- 2.8. Se modificó las antiguas reivindicaciones 60 y 62 (nuevas reivindicaciones 24 y 26) con el fin de eliminar la referencia al "*AAV de animal no primate*" y aclarar que la proteína de cápside de AAV es una proteína de cápside de AAV. Dicha modificación se sustenta en las páginas 30 a 33 de la descripción.
- 2.9. Se modificó la antigua reivindicación 68 (nueva reivindicación 31) con el fin de restringir el grupo de secuencias de aminoácidos del que se selecciona la proteína de cápside de AAV.
- 2.10. Se incluyó la nueva reivindicación 34 con el fin de reclamar la cápside de AAV que comprende la proteína de cápside AAV reclamada en las reivindicaciones previas. Dicha reivindicación se sustenta en las páginas 14 y 42 de la descripción.
- 2.11. Se incluye la nueva reivindicación 35 con el fin de aclarar que la cápside AAV es un mosaico y comprende la proteína de cápside AAV de referencia en que carece el primer miembro del par de unión. Dicha reivindicación se sustenta en las páginas 89 y 90 de la descripción.
- 2.12. Se modificó la antigua reivindicación 72 (no reivindicación 37) con el fin de aclarar que la molécula de ácido nucleico comprende el gen *cap* que codifica a la proteína de cápside AAV reclamada reivindicaciones previas. Dicha modificación se sustenta en las páginas 43 y 44 de la descripción.
- 2.13. Se modificó la antigua reivindicación 88 (nueva reivindicación 41) con el fin de aclarar que la "*la proteína de la cápside del AAV comprende una región*

única VP1 de una proteína de la cápside del AAV de primate". Dicha modificación se sustenta en la página 47 de la descripción.

- 2.14. Se modificó la antigua reivindicación 99 (nueva reivindicación 43) con el fin de restringir el grupo de secuencias de ácido nucleico.
- 2.15. Se incluyó las nuevas reivindicaciones 50 a 54 con el fin de reclamar método de producción de una partícula AAV que comprende cultivar una célula de empaquetamiento. Dicha modificación se sustenta en la página 86 y 119 de la descripción y antigua reivindicaciones 115 a 118.
- 2.16. Se modificó la antigua reivindicación 107 (nueva reivindicación 55) con el fin de reemplazar la referencia a que la *"molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de interés flanqueado"* por *"la partícula de AAV o la célula de empaquetamiento comprenden un polinucleótido flanqueado"*. Dicha modificación se sustenta de conformidad con la materia reclamada en las reivindicaciones 53 y 54 de la cuales depende.
- 2.17. Se incluyó la nueva reivindicación 56 con el fin de reclamar que el polinucleótido esta comprendido en un plásmido de transferencia. Dicha modificación se sustenta en las páginas 57 y 86 de la descripción.
- 2.18. Se incluyó las nuevas reivindicaciones 57 y 58 con el fin de reclamar las características de la segunda secuencia de nucleótidos ITR. Dichas reivindicaciones se sustentan en las páginas 55 y 56 y en las modalidades 125 y 126 de la descripción.
- 2.19. Se incluyó la nueva reivindicación 64 con el fin de reclamar una composición farmacéutica que comprende la partícula de AAV y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha modificación se sustenta en las páginas 122 a 128 y en la modalidad 128 de la descripción

Estas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, ya que se encuentran sustentadas tanto en la descripción como en el listado de secuencias, y se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

3. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020**.

Ahora, en relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito resaltar que junto a la presente respuesta no se realiza el pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, dado que el nuevo capítulo reivindicatorio cuenta con un menor número de cláusulas que el presentado y estudiado anteriormente por su despacho.

4. No es una invención

Objeción del examinador:

El examinador objeta las reivindicaciones 1 a 4, 8 a 23, 25, 26, 28, 30 a 34, 36, 38 a 42, 50, 51, 56 a 58, 60 a 61, 63 a 64, 67, 69, 106, 107, 126 a 128 por no constituir una invención conforme al literal b) del artículo 15 de la Decisión 486. Según esta disposición, no se consideran invenciones las partes de seres vivos o el material biológico tal como existe en la naturaleza o que puede ser aislado. El objeto de estas reivindicaciones, aunque se refiere a partículas virales recombinantes de AAV o a proteínas de cápside quiméricas, carece de características técnicas estructurales esenciales que permitan diferenciarlas de las partículas virales AAV naturales.

De forma similar, las reivindicaciones 70 a 74, 76, 80, 81 a 92, 94, 95, 97, 98, 101, 103 a 105 también son consideradas no patentables por referirse a secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de cápside de AAV, las cuales, a pesar de describirse como quiméricas, no presentan elementos técnicos distintivos respecto a los genes cap presentes en virus AAV silvestres. En consecuencia, el alcance de estas reivindicaciones incluye materia natural o aislable, excluida de protección conforme a la normativa vigente.

Argumentos del solicitante:

Sin admitir las objeciones formuladas, únicamente con el fin de facilitar el trámite de examen y sin que ello implique renuncia o perjuicio alguno a los derechos del Solicitante, mediante el presente memorial se eliminan las reivindicaciones 1 a 37. Asimismo, se modifica la anterior reivindicación 38, renumerada ahora como reivindicación 1, para que reclame una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) que comprende al menos una secuencia de aminoácidos VP3 de una proteína de la cápside de AAV aviar (AAAV), AAV de león marino o AAV escamoso, en la que dicha proteína de la cápside AAV está modificada para incluir al menos un primer miembro de un par de unión proteína:proteína.

El Solicitante sostiene respetuosamente que las reivindicaciones en su forma actual incluyen características estructurales esenciales, tales como la presencia específica de una secuencia VP3 de AAVs derivados de animales no primates, lo cual limita sustancialmente el alcance de la

invención. Adicionalmente, la inclusión de al menos un primer miembro de un par de unión proteína:proteína constituye una modificación estructural que distingue inequívocamente la proteína de la cápside AAV reivindicada de cualquier proteína de cápside que pudiera encontrarse en la naturaleza. Esta distinción también aplica a los ácidos nucleicos que codifican dicha proteína, tal como se reivindica en las nuevas reivindicaciones 34 a 45.

Por tanto, se considera que las presentes reivindicaciones definen claramente una materia con intervención humana, estructuralmente distinta de los productos naturales, y que requiere de un grado significativo de ingenio técnico, lo cual las hace patentables. En consecuencia, se solicita respetuosamente el retiro de la objeción.

5. Excepción de Patentabilidad

Objeción del examinador:

El examinador objeta el contenido de las reivindicaciones 132 a 138 ya que considera que busca reclamar materia no patentable de conformidad con los requerimientos del artículo 20 literal (d) de la Decisión 486. Esto debido a que se caracteriza un método de entrega de un nucleótido de interés a una célula objetivo, que se refiere implícitamente a métodos de tratamiento.

Argumentos del solicitante:

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de dar continuidad al proceso, y sin perjuicio o renuncia a los derechos del Solicitante, la antigua reivindicación 132 (nueva reivindicación 135) se modifica para reclamar un método *in vitro*, el cual excluye completamente la posibilidad de que se lleve a cabo como método de tratamiento ya que como establece su significado en la Real Academia de la Lengua Española: "*Se emplea con el sentido de 'fuera del organismo, utilizando métodos experimentales en el laboratorio'*"¹ (Énfasis añadido). Cabe aclarar que dicha modificación también restringe el alcance de la antigua reivindicación 133 (nueva reivindicación 126).

Por otra parte, el solicitante ha decidido eliminar las reivindicaciones 134-136. De ese modo, el solicitante sostiene respetuosamente que las reivindicaciones modificadas, no se refieren a un método de tratamiento, y por ende reclaman materia susceptible de patentabilidad. En consecuencia, el solicitante solicita respetuosamente el retiro de la presente objeción.

6. Claridad y concisión de las reivindicaciones

¹ <https://www.rae.es/dpd/in%20vitro>

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por el examinador en su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas del examinador, me permito manifestar lo siguiente:

- 6.1.** El examinador objeta la claridad del capítulo reivindicatorio teniendo en cuenta que contiene un número excesivo de reivindicaciones independientes que repiten información y protegen sustancialmente la misma materia. Según el examinador, esto genera confusión y falta de concisión, por lo que sugiere presentar una sola reivindicación independiente, y en caso de variantes, usar reivindicaciones dependientes.

Argumentos del solicitante:

En este sentido el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con el examinador, sin embargo, únicamente con el propósito de facilitar el curso del examen, y sin que ello implique renuncia ni perjuicio alguno a los derechos del Solicitante, mediante el presente memorial se modifica el conjunto de reivindicaciones para incluir una única reivindicación independiente dirigida a una proteína de la cápside de AAV.

En virtud de esta modificación, el Solicitante sostiene respetuosamente que el conjunto actual de reivindicaciones cumple con los requisitos de claridad y concisión exigidos por la normativa aplicable. Por lo tanto, se solicita respetuosamente el retiro de la objeción correspondiente.

- 6.2.** El examinador objeta las reivindicaciones 5, 6, 7, 24, 27 y 29 por carecer de claridad, concisión y sustento en la descripción. Esto debido a que considera que estas reivindicaciones no incluyen las características técnicas esenciales estructurales de la materia reclamada y contienen múltiples elementos opcionales que no limitan su alcance. Referencias como "*una porción de esta*", "*cualquier porción*", "*AAV remoto*", "*AAV de animal no primate*", o "*un segundo AAV*" son ambiguas, incluyen entidades no descritas ni exploradas, y exceden lo divulgado. Tampoco se define qué es una etiqueta detectable, la secuencia de la proteína quimérica, ni las mutaciones puntuales. Se sugiere incluir las secuencias, modificaciones, posiciones, secuencias ITR y serotipos específicos para acotar razonablemente las reivindicaciones.

Argumentos del solicitante:

En relación con lo señalado, el Solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. No obstante, con el ánimo de facilitar la continuidad del trámite, se aclara que las reivindicaciones objetadas ya no forman parte del capítulo reivindicatorio vigente. Asimismo, con el fin de evitar ambigüedades en el nuevo conjunto de reivindicaciones, mediante el presente escrito se modifican las reivindicaciones reenumeradas 17 a 19 y 56 (correspondientes

a las reivindicaciones previas 51 a 53 y 121, respectivamente) para: (i) eliminar las referencias genéricas a “porciones” o, en su defecto, sustituirlas por la expresión “porción de unión al antígeno” en el contexto de los anticuerpos.

En este sentido, el Solicitante sostiene respetuosamente que la página 71 de la descripción original brinda un soporte técnico claro para la expresión “porción de unión al antígeno”, al definirla como la parte del anticuerpo responsable del reconocimiento y unión a un antígeno. Además, una persona versada en la materia entendería sin dificultad que ciertas regiones mínimas del anticuerpo conservan dicha capacidad, conforme a lo descrito.

Con respecto a las referencias a “AAV remoto” y “AAV de animal no primate”, el Solicitante considera que tales términos resultan comprensibles a la luz de la divulgación contenida en la descripción. Sin embargo, en aras de mantener el curso del examen, se han eliminado dichas expresiones del capítulo reivindicatorio.

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones modificadas son claras y delimitan de forma inequívoca la materia protegida, por lo que se solicita respetuosamente el retiro de las objeciones correspondientes.

6.3. El examinador objeta las reivindicaciones 5 a 7, 35, 66, 100 por carecer de claridad. Esto debido a que la expresión “una identidad de secuencia significativa” es ambigua e impide definir el alcance. Se recomienda eliminar esta referencia y definir las secuencias mediante SEQ ID NO, como se divulgó en la descripción.

Argumentos del solicitante:

Sin estar de acuerdo, pero ir con el fin de contribuir a dar continuidad al proceso el Solicitante ha decidido eliminar del capítulo reivindicatorio los porcentajes de identidad y cualquier referencia a una identidad de secuencia significativa, con el objetivo de atender a las observaciones de claridad planteadas por el Examinador. En ese sentido, se solicita amablemente que la presente objeción se considere superada.

6.4. El examinador objeta las reivindicaciones 5 a 7, 52, 53, 121, 130 por carecer de claridad. Esto debido a que el término “porción” es no limitativo y puede referirse a fragmentos tan pequeños como un aminoácido, lo cual genera incertidumbre. Por ende, el examinador sugiere eliminar dicha expresión.

Argumentos del solicitante:

En este sentido, y tal como se mencionó anteriormente, se ha modificado el capítulo reivindicatorio con el fin de aclarar que la expresión “porción” hace referencia específicamente a una porción de unión al antígeno, la cual, conforme a lo descrito en la página 71, corresponde

al fragmento funcional responsable del reconocimiento y la unión al antígeno. Esta definición, en conjunto con el conocimiento general de una persona versada en la materia, permite una interpretación clara en el contexto de las reivindicaciones. Por lo tanto, se solicita amablemente que la presente objeción se considere superada.

6.5. El examinador objeta las reivindicaciones 5 a 7, 35, 66, 100, 109, 125 por carecer de claridad. Esto debido a que estas reivindicaciones incluyen expresiones como "opcionalmente", "preferentemente" y "por ejemplo", que no limitan el alcance. Se recomienda trasladar tales características a reivindicaciones dependientes.

Argumentos del solicitante:

Al respecto, el solicitante manifiesta que el nuevo capítulo reivindicatorio no incluye ninguna de las expresiones que el examinador consideró imprecisas, tales como "opcionalmente", "preferentemente" o "por ejemplo". Esto permite delimitar de manera adecuada y precisa el alcance de la invención. En ese sentido, se solicita amablemente que se considere superada la presente objeción.

6.6. El examinador objeta las reivindicaciones 5 a 7, 114, 115, 122. Esto debido a que los términos como "AAV de animal no primate", "AAV remoto", "un segundo AAV", "AAV de animal primate", y "cápside de referencia" son ambiguos y engloban demasiadas posibilidades no descritas. Se sugiere definir los AAV mediante SEQ ID NO o indicar el serotipo específico.

Argumentos del solicitante:

En este sentido, el solicitante desea aclarar que, sin aceptar las objeciones, pero con el fin de avanzar con el trámite, se han eliminado las referencias a "AAV de animal no primate" y "AAV remoto".

Respecto a los términos "*segundo AAV*" y "*cápside de referencia*", se considera que estos serían comprensibles para una persona versada en la materia y deben interpretarse conforme a lo dispuesto en el artículo 51 de la Decisión 486 de 2000, el cual establece:

"El alcance de la protección conferida por la patente estará determinado por el tenor de las reivindicaciones. La descripción, los dibujos y, en su caso, el listado de secuencias o el depósito de material biológico servirán para interpretarlas".

En ese sentido, en la página 49 de la descripción se indica que el "*segundo AAV*" es un AAV de primate o una combinación de AAV de primate, y que, en algunas modalidades, este se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 o una combinación de los mismos. No obstante, para mayor

claridad, el solicitante ha modificado el capítulo reivindicatorio para hacer referencia explícita a "AAV de primate".

En cuanto al "gen cap de referencia", se aclara que en la página 57 de la descripción se establece que dicho gen codifica una proteína de cápside de referencia correspondiente a al menos una de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de AAV, modificadas excepto por dicha modificación. Para aportar mayor precisión, el capítulo reivindicatorio ahora especifica que la proteína de cápside de AAV de referencia "carece del primer miembro del par de unión proteína:proteína", en conformidad con la página 89 de la descripción.

Por lo anterior, se solicita respetuosamente que se considere superada la presente objeción.

6.7. El examinador objeta las reivindicaciones 120, 125, 129, por carecer de sustento. Esto teniendo en cuenta que estas reivindicaciones se refieren a combinaciones de elementos no exploradas experimentalmente, como modificaciones, genes reporteros, serotipos o etapas de método. Se sugiere eliminarlas o restringirlas a combinaciones respaldadas por la descripción.

Argumentos del solicitante:

Sin aceptar las objeciones, pero con el fin de contribuir a la continuación del trámite, el solicitante ha modificado el capítulo reivindicatorio para eliminar la reivindicación 120. Adicionalmente, en relación con las demás reivindicaciones, en particular, la referida al método *in vitro*, se han ajustado sus características de forma que la partícula AAV, la cápside de AAV, la molécula de ácido nucleico y la célula de empaquetamiento incluyan las propiedades definidas en las reivindicaciones anteriores, asegurando así una relación directa y clara con la materia reclamada. En virtud de lo anterior, se solicita respetuosamente que se considere superada la presente objeción.

6.8. El examinador objeta las reivindicaciones 35, 66, 100 por carecer de claridad. Esto debido a que en ellas se reivindican secuencias con al menos 95% de identidad sin evidencia experimental de variantes exploradas que respalden dichos porcentajes. Además, los porcentajes de identidad no definen concretamente la secuencia. Se recomienda definir las secuencias con SEQ ID NO o describir variantes especificando posiciones y sustituciones.

Argumentos del solicitante:

Sin estar de acuerdo, pero ir con el fin de contribuir a dar continuidad al proceso el Solicitante ha decidido eliminar del capítulo reivindicatorio los porcentajes de identidad y cualquier referencia a una identidad de secuencia significativa, con el objetivo de atender a las

observaciones de claridad planteadas por el Examinador. En ese sentido, se solicita amablemente que la presente objeción se considere superada.

- 6.9.** El examinador objeta las reivindicaciones 29, 35, 66, 100, 116 a 118 por carecer de claridad. Esto debido al término "al menos" es impreciso y no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se recomienda sustituirlo por un valor o rango específico.

Argumentos del solicitante:

El solicitante sostiene respetuosamente que el término "al menos" es claro para una persona normalmente versada en la materia, dado que se emplea en el contexto técnico con su significado ampliamente aceptado: indica una cantidad mínima requerida o una característica obligatoria que puede presentarse sola o acompañada de otras adicionales. Este uso no introduce ambigüedad ni incertidumbre en cuanto al alcance de la protección solicitada, sino que otorga una flexibilidad técnica razonable dentro de los límites definidos por la redacción completa de la reivindicación.

Asimismo, tal como se ha señalado previamente, conforme al artículo 51 de la Decisión 486, las reivindicaciones deben interpretarse a la luz de la descripción. En este sentido, la utilización del término "al menos" no implica una extensión injustificada del alcance, sino que permite que la proteína de la cápside AAV comprenda las secuencias de aminoácidos o componentes específicos según lo respaldado por las modalidades descritas en la solicitud. En ningún caso se pretende reivindicar materia que exceda lo divulgado. Por tanto, se solicita respetuosamente que se considere superada la presente objeción.

En vista de lo anterior, las objeciones relacionadas con la claridad, la concisión y el soporte en la descripción del capítulo reivindicatorio, han quedado completamente superadas.

7. Descripción

El examinador indica que la descripción no divulga la materia reclamada de manera suficiente para que una persona normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla, por lo que no cumpliría con las disposiciones del Art. 28 de la Decisión Andina 486.

Objeción del examinador:

La Oficina considera que la solicitud no cumple con el requisito de suficiencia en la divulgación, dado que la descripción no presenta evidencia experimental que permita obtener una partícula viral de AAV recombinante con una cápside que contenga VP1, VP2 y VP3 (o porciones de estas) al menos 95% idéntica a cualquier AAV de animal no primate, ni que incluya de manera sustentada modificaciones como un miembro de un par de unión proteína:proteína, etiquetas

detectables, mutaciones puntuales o secuencias quiméricas. Asimismo, no se sustenta que las ITR tengan al menos 95% de identidad con cualquier AAV distinto de uno de animal no primate. Esta falta de información genera una carga excesiva para la persona versada en la materia, quien tendría que recurrir al ensayo y error para determinar el serotipo de AAV del cual provienen la cápside y la ITR, así como el tipo de modificación y su localización en la proteína. Por tanto, se concluye que el alcance de las reivindicaciones es excesivamente amplio y que las modalidades descritas no son suficientes para cubrir la amplitud del objeto reclamado.

Argumentos del solicitante:

En este sentido, el solicitante desea resaltar que la materia reclamada en el capítulo reivindicatorio ya no incluye porcentajes de identidad que pudieran afectar la caracterización estructural de la proteína de la cápside AAV, lo que permite una mejor correlación entre la materia reivindicada y la divulgación contenida en la descripción.

Asimismo, el solicitante sostiene respetuosamente que las proteínas de la cápside AAV actualmente citadas, así como las composiciones que las comprenden o codifican, cuentan con adecuado respaldo en la solicitud tal como fue presentada.

En particular, los Ejemplos 2 a 4 demuestran de forma clara la producción de proteínas de la cápside AAV que comprenden al menos una secuencia de aminoácidos VP3 derivada de un AAV aviar (AAAV), de león marino o escamoso, como por ejemplo AAV de dragón barbudo, y que incluyen un primer miembro de un par de unión proteína:proteína, como SpyTag. Por su parte, los Ejemplos 5 a 7 evidencian claramente la utilidad de dichas proteínas de cápside AAV. En consecuencia, una persona normalmente versada en la materia estaría en capacidad de llevar a cabo la invención y utilizarla sin necesidad de una experimentación indebida, y con una expectativa razonable de éxito.

Finalmente, el solicitante resalta la drástica limitación introducida en el capítulo reivindicatorio, en el cual la reivindicación independiente ha sido modificada para centrarse específicamente en una proteína de cápside AAV, de forma que guarde una relación clara y concisa con la materia divulgada en la descripción. Por lo tanto, se solicita respetuosamente que se considere superada la presente objeción.

De esta manera, la materia divulgada en la descripción ahora se relaciona de una manera más cercana con la materia definida en el capítulo reivindicatorio. Por lo tanto, la descripción proporciona toda la información necesaria para llevar a cabo la invención y cumple con los requisitos legales establecidos en la Decisión Andina 486.

8. Novedad

El examinador afirma en su concepto técnico que las antiguas reivindicaciones 5 a 7, 29, 35, 37, 75, 77 a 79, 100, 102, 108 a 125 y 129 a 131, carecen de novedad teniendo en cuenta las enseñanzas de D1 (WO 2019/006046).

En este sentido, quisiera destacar que el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que la invención se considera nueva cuando no está incluida en el estado de la técnica. Es decir, según el espíritu de la norma legal indicada, la invención no se considera nueva si está "*comprendida*" en el estado de la técnica, dicha norma se refiere, por supuesto, a la invención en su totalidad y no a sus componentes de forma aislada.

A este respecto, considero pertinente subrayar que, para considerar que el objeto de la solicitud no es nuevo, deben tenerse en cuenta al menos los siguientes aspectos:

- El objeto de la invención objeto de estudio debe estar contenido TOTAL y ABSOLUTAMENTE en el documento mencionado anteriormente; y
- La comparación del objeto de la invención en cuestión y el estado de la técnica no debe centrarse ni limitarse a los elementos de esta que se conocen previamente, sino de lo inédito y novedoso que la caracteriza. Esto significa que debe analizarse el valor añadido que aporta la invención con sus nuevas características al campo técnico al que pertenece la solicitud en estudio.

Esto significa que, para que un documento del estado de la técnica afecte a la novedad de una solicitud, debe revelar todas y cada una de las características técnicas que lo definen.

También es de señalar lo que se establece en el Manual Andino para el Examen de Patentes sobre el análisis de novedad.

"Para determinar la novedad de la invención, se debe comprobar si existen anticipaciones del estado de la técnica que contengan explícitamente todas las características técnicas esenciales de la invención. El examen de novedad se efectúa comparando elemento por elemento de la invención tal como está definido por las reivindicaciones con los del estado de la técnica." (El énfasis es nuestro)

"Si todas las características técnicas de la reivindicación independiente se encuentran descritas en un mismo antecedente y además se encuentran íntimamente relacionadas, el objeto de dicha reivindicación carece de novedad. Si una característica, aunque sea banal, no se encuentra contenida en el antecedente, la reivindicación es nueva" (El énfasis es nuestro)

"Modificaciones obvias o equivalentes del objeto descrito en el estado de la técnica no pueden ser citadas en contra de la novedad del objeto reivindicado sino cuando están descritas ellas mismas en el antecedente." (El énfasis es nuestro)

De lo anterior, puede interpretarse sin lugar a dudas que, **si existe al menos una característica diferenciadora** entre el objeto reivindicado y lo **divulgado explícitamente en los antecedentes** tomados en cuenta por sí solos, en este caso D1, **incluso si dicha diferencia no es una característica esencial sino banal**, debe reconocerse la novedad de la invención.

Objeción del examinador:

El examinador objeta la solicitud con base en el documento D1, el cual divulga una partícula viral recombinante que comprende una proteína de la cápside derivada de AAV9 que incluye las proteínas VP1, VP2 y VP3, junto con el método para producir dicha partícula viral. Además, considera que anticipa una secuencia de ácido nucleico de interés (gen reportero o terapéutico) flanqueada por repeticiones terminales invertidas 5' y 3' de AAV. Dicha cápside está modificada mediante la incorporación de una etiqueta peptídica (primer miembro de un par de unión proteína:proteína), seleccionada del grupo que incluye SpyTag:SpyCatcher, SpyTag002:SpyCatcher002, SpyTag:KTag, Isopeptag:pilin-C y SnoopTag:SnoopCatcher. Además, se menciona la inserción de una etiqueta Myc después del residuo N587. El documento también divulga secuencias específicas que coinciden con las reclamadas en la solicitud: la SEQ ID NO: 53 incluye la SEQ ID NO: 45, y las SEQ ID NO: 1 y 48 son idénticas en un 100% a las SEQ ID NO: 42 y 49, respectivamente, como se evidencia en los alineamientos aportados.

Argumentos del solicitante:

Como se ha expuesto previamente, las presentes reivindicaciones se dirigen a una proteína de la cápside de un virus adenoasociado (AAV) que comprende al menos una secuencia de aminoácidos VP3 derivada de una proteína de cápside de AAV aviar (AAAV), de AAV de león marino o de AAV escamoso, en la que dicha proteína de cápside ha sido modificada para incluir al menos un primer miembro de un par de interacción proteína:proteína.

El solicitante sostiene respetuosamente que el documento D1 no divulga ni sugiere, de manera explícita ni inherente, una proteína de cápside AAV que contenga al menos una secuencia de aminoácidos VP3 de una cápside de AAV aviar, de león marino o escamoso. En consecuencia, el contenido de D1 no anticipa las características técnicas definidas en las presentes reivindicaciones, por lo que se solicita respetuosamente el retiro de la objeción formulada por falta de novedad.

En vista de lo anterior, y dado que el documento D1 no revela de forma clara, directa e inequívoca la totalidad de las características técnicas esenciales de la materia reivindicada en la presente solicitud, se concluye que la invención cumple con el requisito de novedad establecido en el artículo 16 de la Decisión 486.

9. Nivel inventivo

El examinador ha indicado que las reivindicaciones 24, 27, 43 a 49, 52 a 55, 59, 62, 65, 66, 68, 93, 96 y 99 carecerían de nivel inventivo en vista de las enseñanzas del documento D1 y D3 (Choi, V. W., et al., Curr Gene Ther., "AAV Hybrid Serotypes: Improved Vectors for Gene Delivery").

Con respecto a lo anterior, me permito resaltar las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que establecen que *"se considerará que la invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. Por el contrario, el análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

El análisis del examinador

El examinador objeta la reivindicación 1 indicando que el documento D1 constituye el estado de la técnica más cercano, ya que divulga una partícula viral recombinante que comprende una proteína de la cápside derivada de AAV9, con presencia de las proteínas VP1, VP2 y VP3, y una secuencia de ácido nucleico de interés (reportero o terapéutico) flanqueada por repeticiones terminales invertidas 5' y 3' de AAV. Además, señala que al menos una de las proteínas de la cápside está modificada para incluir una etiqueta peptídica.

El examinador reconoce que la diferencia principal entre la invención definida en la reivindicación 23 y la partícula viral de D1 radica en que el AAV utilizado es de dragón barbudo. No obstante, considera que esta diferencia carece de un efecto técnico distintivo, ya que D1 ya anticipa la posibilidad de modificar el tropismo de una partícula viral mediante la incorporación de un miembro de un par de unión proteína:proteína en la cápside, lo que incluye la viabilidad de emplear un AAV de otra especie como el de dragón barbudo.

Adicionalmente, el examinador argumenta que el documento D3 divulga métodos conocidos para generar AAV híbridos mediante estrategias como la transcapsidación (uso de ITR de un serotipo con cápside de otro), la adsorción de proteínas externas sobre la cápside, la producción de cápsides en mosaico (mezcla de proteínas de distintos serotipos), y la formación de cápsides

quiméricas (con inserciones de proteínas exógenas). En consecuencia, considera que una persona normalmente versada en la materia estaría motivada a combinar las enseñanzas de D3 con la partícula de AAV de D1, lo que haría que la materia reivindicada carezca de actividad inventiva.

Argumentos del solicitante:

El solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con las alegaciones formuladas, en tanto que una persona versada en la materia no habría estado motivada a combinar los documentos D1 y D3 para llegar a la materia actualmente reivindicada, ni habría tenido una expectativa razonable de éxito al hacerlo.

Como se ha señalado anteriormente, D1 no enseña ni sugiere una proteína de cápside de AAV que comprenda al menos una secuencia de aminoácidos VP3 derivada de una cápside de AAV aviar (AAAV), de AAV de león marino o de AAV escamoso. D1 se enfoca en proteínas de cápside de AAV que comprenden un primer miembro de un par de interacción proteína:proteína, pero no contempla la utilización de cápsides derivadas de especies no primates.

Por su parte, D3 menciona de forma tangencial las proteínas de cápside de AAV de dragón barbudo como serotipos recientemente identificados (véase parte superior de la página 4; citando a Jacobson et al., Vet Pathol, 1996, 33(3): 343-346). Sin embargo, no ofrece discusión alguna sobre el uso de dichas cápsides, sean quiméricas o no, que incluyan secuencias de VP3 de AAV de animales no primates (por ejemplo, dragón barbudo) para la infección de células de mamíferos.

En consecuencia, ni D1 ni D3 motivan al experto en la técnica a emplear una proteína de cápside de AAV que comprenda simultáneamente un primer miembro de un par de unión proteína:proteína y una secuencia de VP3 derivada de un AAV aviar, de león marino o escamoso.

Además, no existe en dichos documentos ninguna enseñanza que proporcione una expectativa razonable de éxito para el uso de tales cápsides en la transducción de células de mamíferos.

De hecho, el documento de Bossis & Chiorini (J. Virol. 2003, 77(12): 6799-6810; aportado aquí como "Anexo 1") demuestra que el experto habría tenido razones fundadas para dudar que una cápside que comprendiera VP3 de un AAV no primate, como el AAAV, pudiera transducir células de mamíferos. En los resultados presentes en las figuras correspondientes, se indica que la transducción por rAAAV en células de mamíferos fue prácticamente nula, sugiriendo que el AAAV utiliza un mecanismo de entrada o transducción distinto al de los AAV de primates.

Por lo tanto, a la luz del estado de la técnica vigente al momento de la solicitud, una persona versada en la materia no podía prever razonablemente que las cápsides de AAV que incorporan una secuencia VP3 de un AAV de ave, escamoso o león marino y un primer miembro de un par

de unión proteína:proteína podrían redirigirse con éxito a células de mamíferos y utilizarse eficazmente como vectores para terapia génica en mamíferos.

Por el contrario, como se demuestra en la presente solicitud, las proteínas de cápside que comprenden al menos una secuencia VP3 derivada de AAVs de aves, leones marinos o dragones barbudos, junto con un primer miembro de un par proteína:proteína, son capaces de formar partículas funcionales de AAV que pueden redirigirse exitosamente a células de mamíferos in vitro (véase, por ejemplo, los Ejemplos 5 a 7 de la solicitud) e in vivo (véase, por ejemplo, los Ejemplos 9 y 10).

Estos resultados no habrían podido preverse a partir del estado de la técnica, lo cual evidencia la actividad inventiva de las presentes reivindicaciones respecto de D1 y D3. Por lo tanto, se solicita respetuosamente el retiro de las objeciones por falta de actividad inventiva.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, queda claro que las características técnicas de la materia definida en el capítulo reivindicatorio presentado junto al presente memorial no se derivan de manera obvia o evidente de las enseñanzas de D1 y D3. Por lo tanto, el objeto reclamado cumple con el requisito de Nivel inventivo establecido en el Art. 18 de la Decisión 486.

10.Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) El nuevo título de la solicitud es claro y se relaciona con el objeto reclamado, cumpliendo así con el literal d) del artículo 27 de la Decisión 486 de 2000;
- ii) El nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00;
- iii) La invención de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 30 y 28 de la Decisión 486;
- iv) La presente invención se relaciona con materia susceptible de patentabilidad, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 14, 15 y 20 de la Decisión 486;
- v) La invención de la presente solicitud no había sido divulgada previamente en el estado de la técnica cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 16 de la Decisión 486.

- vi) La invención de la presente solicitud no resulta obvia ni se derivada de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

Asimismo, respetuosamente solicito a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

11. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por sesenta y ocho (68) reivindicaciones.
- Anexo 1: Bossis I, Chiorini JA. Cloning of an avian adeno-associated virus (AAAV) and generation of recombinant AAAV particles. J Virol. 2003 Jun;77(12):6799-810. doi: 10.1128/jvi.77.12.6799-6810.2003. PMID: 12768000; PMCID: PMC156192.
- Recibo de pago por concepto de modificaciones a las reivindicaciones.

Señora Directora,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de la cápside AAV que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de AAV VP3 de una proteína de cápside de AAV aviar (AAAV), una proteína de cápside de AAV de león marino o una proteína de cápside de AAV de escamoso,

en donde la proteína de la cápside de AAV es modificada para comprender al menos un primer miembro de un par de unión proteína:proteína.

2. La proteína de cápside de AAV de la reivindicación 1, en la que la proteína de cápside de AAV comprende una secuencia de aminoácidos de región común VP1/VP2 de la proteína de cápside de AAAV, la proteína de cápside de AAV de león marino o la proteína de cápside de AAV de escamoso.

3. La proteína de cápside de AAV de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que la proteína de cápside de AAV de escamoso es una proteína de cápside de AAV de dragón barbudo.

4. La proteína de cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de cápside de AAV comprende una secuencia de aminoácidos de AAV no quimérica o en la que la proteína de cápside de AAV comprende una región única VP1 de una proteína de cápside de AAV de primate.

5. La proteína de la cápside de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el primer miembro del par de unión proteína: proteína está flanqueado por un primer y/o un segundo enlazador que enlaza el primer miembro de el par de unión proteína: proteína con la proteína de la cápside de AAV, y en donde cada uno del primer y/o el segundo enlazador tiene, independientemente, al menos un aminoácido de longitud.

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

6. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer y el segundo enlazadores no son idénticos.

7. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el primer y el segundo enlazadores son idénticos y tienen 10 aminoácidos de longitud.

8. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la proteína de la cápside de AAV comprende además un segundo miembro cognado del par de unión proteína: proteína.

9. La proteína de cápside de AAV de la reivindicación 8, en donde el primer miembro y segundo miembro se unen mediante un enlace covalente.

10. La proteína de cápside AAV de la reivindicación 9, en donde el enlace covalente es un enlace isopeptídico.

11. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el primer miembro del par de unión proteína: proteína comprende SpyTag.

12. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde el segundo miembro cognado comprende SpyCatcher.

13. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde el segundo miembro cognado comprende KTag.

14. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el primer miembro es KTag y el segundo miembro cognado comprende SpyTag.

15. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el primer miembro es SnoopTag y el segundo miembro cognado comprende SnoopCatcher.

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

16. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el primer miembro es isopeptag y el segundo miembro cognado comprende Pilin-C.

17. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el primer miembro es SpyTag002 y el segundo miembro cognado comprende SpyCatcher002.

18. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 8-17, en donde el segundo miembro cognado se enlaza operativamente a un ligando de direccionamiento.

19. La proteína de cápside AAV de la reivindicación 18, en donde el ligando de direccionamiento es un resto de unión.

20. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el resto de unión es un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este.

21. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este se fusiona a SpyCatcher.

22. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 20 o reivindicación 21, en donde el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este, se fusiona con un enlazador en el extremo C, y el enlazador se fusiona con SpyCatcher en el extremo C del enlazador.

23. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el enlazador comprende una secuencia establecida como la SEQ ID NO: 49 (GSGESG).

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

24. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la proteína de cápside de AAV es una proteína de cápside de AAV.

25. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 24, en donde la modificación está en la posición I-444 o I-580 de la proteína de la cápside de un AAV VP1.

26. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la proteína de cápside de AAV es una proteína de cápside de AAV de escamoso.

27. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 26 , en donde la proteína de AAV de escamoso es una proteína de cápside de AAV de dragón barbudo.

28. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 26 o reivindicación 27, en donde la modificación está en la posición I-573 o I-436 de la proteína de la cápside AAV VP1.

29. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en donde la proteína de cápside de AAV es una proteína de cápside de AAV de lobo marino.

30. La proteína de la cápside de AAV de la reivindicación 29, en donde la modificación está en una posición seleccionada del grupo que consiste en I-429, I-430, I-431, I-432, I-433, I-434, I-436, I-437, y A565 de la proteína de cápside AAV VP1 de lobo marino.

31. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-30, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 8,
- (b) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 10,

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

- (c) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 12,
- (d) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 14,
- (e) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 16,
- (f) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 18,
- (g) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 20,
- (h) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 22,
- (i) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 24,
- (j) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 26,
- (k) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 28,
- (l) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 30,
- (m) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 32,
- (n) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 34,
- (o) una secuencia de aminoácidos establecida como la SEQ ID NO: 36,
- (p) una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las porciones de AAV VP2 y/o AAV VP3 de las secuencias de aminoácidos establecidas en cualquiera de (a)-(o).

32. La proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-31, en donde el primer miembro de un par de unión proteína: proteína comprende una etiqueta detectable.

33. La proteína de la cápside de AAV de acuerdo con la reivindicación 32, en donde la etiqueta detectable comprende c-myc (SEQ ID NO: 44).

34. Una cápside de AAV que comprende la proteína de cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-33.

35. La cápside de AAV de la reivindicación 34 en donde la cápside de AAV es un mosaico de cápside de AAV que comprende una proteína de cápside de AAV de referencia que carece del primer miembro del par de unión proteína:proteína.

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

36. Una partícula de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-33 o la cápside de AAV de la reivindicación 34 o la reivindicación 35.

37. Una molécula de ácido nucleico que comprende un gen *cap* de AAV que codifica una proteína de la cápside de cualquiera de las reivindicaciones 1-33 o la cápside de AAV de la reivindicación 34 o la reivindicación 35.

38. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 37, en donde el gen *cap* se enlaza operativamente a un promotor.

39. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 38, en donde dicho promotor dirige la expresión de la proteína de cápside de AAV en una célula de empaquetamiento.

40. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 38 o la reivindicación 39, en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste de p40, SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG.

41. La proteína de cápside de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 4-33 o la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37-40, en donde la proteína de la cápside del AAV comprende una región única VP1 de una proteína de la cápside del AAV de primate, en donde el AAV de primate se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 .

42. La proteína de cápside de AAV o la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 41, en donde el AAV primate es AAV2.

43. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37-42, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en

(a) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 7,

(b) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 9,

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

(c) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 11,
(d) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 13,
(e) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 15,
(f) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 17,
(g) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 19,
(h) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 21,
(i) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 23,
(j) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 25,
(k) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 27,
(l) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 29,
(m) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 31,
(n) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 33,
(o) la secuencia de nucleótidos establecida como la SEQ ID NO: 35,
(p) cualquier porción de la secuencia de nucleótidos de (a)-(o) que codifica una proteína de la cápside VP2 de AAV y/o una proteína de la cápside VP3 de AAV.

44. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las modalidades 37-43, que comprende además un gen *rep* de AAV que codifica una o más proteínas Rep de AAV y se enlaza operativamente a un promotor.

45. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 44, en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en p5, p19 SV40, EF, CMV, B19p6 y CAG.

46. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 44 o la reivindicación 45, en donde las una o más proteínas Rep se seleccionan de Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40.

47. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 44-46, en donde las una o más proteínas Rep comprenden Rep78.

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

48. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 44-47, en donde las una o más proteínas Rep son proteínas Rep de AAV de animal primate.

49. Una célula de empaquetamiento para producir partículas de AAV que comprenden la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37-48.

50. Un método de producción de una partícula AAV que comprende cultivar una célula de empaquetamiento según la reivindicación 49 en condiciones suficientes para la producción de partículas AAV.

51. El método de la reivindicación 50, que comprende además uno o más de los siguientes pasos:

- a. limpiar los restos celulares
- b. tratar el sobrenadante que contiene partículas AAV con Benzonasa o DNasa I y $MgCl_2$,
- c. concentración de las partículas AAV
- d. purificación de las partículas AAV, y
- e. cualquier combinación de a.-d.

52.El método de la reivindicación 51, en el que además las partículas AAV son partículas AAV autocomplementarias y/o se aíslan del sobrenadante de cultivo.

53.La célula de empaquetamiento de la reivindicación 49 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 50-52, en el que la célula de empaquetamiento comprende además un plásmido ayudante y/o un plásmido de transferencia.

54.Una partícula AAV fabricada según el método de cualquiera de las reivindicaciones 50-53.

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

55. La partícula de AAV de la reivindicación 36 o la reivindicación 54, la célula de empaquetamiento de la reivindicación 49, 52 o 53, o el método de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, que comprende además la partícula de AAV o la célula de empaquetamiento comprenden un polinucleótido flanqueado por una primera secuencia de nucleótidos de una repetición terminal invertida (ITR) de AAV, que es reconocida por una o más proteínas Rep.

56. La partícula AAV, la célula de empaquetamiento o el método de la reivindicación 55, en los que el polinucleótido está comprendido en un plásmido de transferencia.

57. La partícula de AAV, la célula de empaquetamiento o el método de acuerdo con la reivindicación 55 o la reivindicación 56, en donde el polinucleótido está flanqueado además por una segunda secuencia de nucleótidos de ITR del mismo AAV que la primera secuencia de nucleótidos de ITR de AAV.

58. La partícula AAV, célula de empaquetamiento o método de la reivindicación 55 o la reivindicación 56, en donde el polinucleótido está flanqueado además por una segunda secuencia de nucleótidos ITR de AAV, en la que la segunda secuencia de nucleótidos ITR de AAV y la primera secuencia de nucleótidos ITR de AAV son de AAV diferentes.

59. La partícula AAV, la célula de empaquetamiento o el método de la reivindicación 57 o la reivindicación 58, en donde la segunda secuencia de nucleótidos ITR de AAV es una secuencia de nucleótidos ITR de AAV de animales primates.

60. La partícula de AAV, la célula de empaquetamiento o el método de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, en donde el polinucleótido de interés es un gen reportero.

61. La partícula de AAV, la célula de empaquetamiento o el método de acuerdo con la reivindicación 60, en donde el gen reportero codifica β -galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), MmGFP, proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul potenciada (eBFP),

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP), Emerald, CyPet, proteína fluorescente cian (CFP), Cerulean, T-Sapphire, luciferasa, fosfatasa alcalina.

62. La partícula de AAV, la célula de empaquetamiento o el método de cualquiera de las reivindicaciones 55-59, en donde el polinucleótido de interés codifica una proteína terapéutica, un gen suicida, un anticuerpo o un fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una molécula de ARNi o un ARNhp.

63. La célula de empaquetamiento o un método de cualquiera de las reivindicaciones 49-53 y 55 a 62, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de referencia.

64. Una composición farmacéutica que comprende:

(a) una partícula AAV

(i) según cualquiera de las reivindicaciones 36 o 54-62,

(ii) que comprende una proteína de cápside de AAV según cualquiera de las reivindicaciones 1-33,

(iii) que comprende una cápside de AAV según la reivindicación 34 o la reivindicación 35

(iv) que comprende una proteína de cápside de AAV codificada por la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37-48,

(v) elaborado por la célula de empaquetamiento de la reivindicación 49, o

(vi) fabricado según el método de cualquiera de las reivindicaciones 50-52, y

(b) un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

65. Un método *in vitro* para suministrar un polinucleótido de interés a una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con:

2021/37181 (NC2021/0017692)

Reivindicaciones Modificadas en respuesta oficio 3395

June 6, 2025

(a) la partícula de AAV

- i. de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36 o 54 a 62,
- ii. Que comprende una proteína de cápside de AAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33,
- iii. Que comprende una cápside de AAV de acuerdo con las reivindicaciones 34 o 35,
- iv. Que comprende una proteína de cápside de AAV condificada por una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 37 a 48,
- v. Elaborada por la célula de empaquetamiento de la reivindicación 49, o
- vi. Fabricada de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 52, o

(b) la composición de acuerdo con la reivindicación 64.

66. El método de la reivindicación 65, en donde la cápside de la partícula de AAV comprende un ligando de direccionamiento que se une específicamente a una proteína expresada en la superficie de la célula diana.

67. El método de la reivindicación 65 o la reivindicación 66, en donde la célula diana es una célula humana.

68. El método de cualquiera de las reivindicaciones 65-67, en donde el polinucleótido de interés codifica una proteína terapéutica, un gen suicida, un anticuerpo o un fragmento de este, un sistema CRISPR/Cas, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, una molécula de ARNi o un ARNhp.

Cloning of an Avian Adeno-Associated Virus (AAAV) and Generation of Recombinant AAAV Particles

Ioannis Bossis and John A. Chiorini*

Gene Therapy and Therapeutics Branch, NIDCR, NIH, Bethesda, Maryland 20892

Received 2 December 2002/Accepted 28 March 2003

Recent studies have proposed that adeno-associated viruses (AAVs) are not evolutionarily linked to other mammalian autonomous parvoviruses but are more closely linked to the autonomous parvoviruses of birds. To better understand the relationship between primate and avian AAVs (AAAVs), we cloned and sequenced the genome of an AAAV (ATCC VR-865) and generated recombinant AAAV particles. The genome of AAAV is 4,694 nucleotides in length and has organization similar to that of other AAVs. The entire genome of AAAV displays 56 to 65% identity at the nucleotide level with the other known AAVs. The AAAV genome has inverted terminal repeats of 142 nucleotides, with the first 122 forming the characteristic T-shaped palindromic structure. The putative Rep-binding element consists of a tandem (GAGY)₄ repeat, and the putative terminal resolution site (*trs*), CCGGT/CG, contains a single nucleotide substitution relative to the AAV₂ *trs*. The Rep open reading frame of AAAV displays 50 to 54% identity at the amino acid level with the other AAVs, with most of the diversity clustered at the carboxyl and amino termini. Comparison of the capsid proteins of AAAV and the primate dependoviruses indicate that divergent regions are localized to surface-exposed loops. Despite these sequence differences, we were able to produce recombinant AAAV particles carrying a *lacZ* reporter gene by cotransfection in 293T cells and were able to examine transduction efficiency in both chicken primary cells and several cell lines. Our findings indicate that AAAV is the most divergent AAV described to date but maintains all the characteristics unique to the genera of dependovirus.

Adeno-associated viruses (AAVs) are small, nonpathogenic parvoviruses that require coinfection with a helper virus, such as adenovirus or herpesvirus, for productive infection (2). To date, eight AAV isolates (AAV types 1 to 8 [AAV1 to -8]) have been characterized and sequenced (2, 4, 19, 20, 25, 32, 51, 56), with AAV2 having been the most extensively studied.

AAV virions are approximately 20 to 25 nm in diameter and are composed of a mixture of assembled proteins (VPs) that encapsidate a linear ~4.7-kb single-stranded DNA (ssDNA) of plus or minus polarity (7, 43). The genome of AAVs is flanked by inverted terminal repeats (ITRs), which in the case of AAV₂ are 145 nucleotides in length. The ITR is organized as three interrupted palindromes that can fold in an energetically favored T-shaped hairpin structure, which can exist in two orientations, termed flip and flop (42). The ITRs serve as origin of replication and contain *cis*-acting elements required for rescue, integration, excision from cloning vectors, and packaging (41, 42, 49, 58).

The genetic map of the AAVs has been derived primarily from studies of AAV2 but is conserved in all serotypes (26, 27, 29, 36, 42, 45, 46, 58, 60, 64). Two major open reading frames (*rep* and *cap* ORFs) and three transcriptional active promoters (*P*₅, *P*₁₉, and *P*₄₀) have been identified in the genome of AAV2. The *P*₅ and *P*₁₉ promoters encode the nonstructural replication proteins Rep78 and Rep68 and Rep52 and Rep40, respectively. Due to differential splicing, Rep78 and Rep52 have different C termini from Rep68 and Rep40. Transcription initiation from two promoters results in Rep78 and Rep68 having

different N termini from Rep52 and Rep40. The *P*₄₀ promoter transcribes two alternatively spliced mRNAs. The major mRNA species encodes the major capsid protein VP3 from a conventional AUG codon and the minor capsid protein VP2 from an upstream in-frame ACG codon. The minor mRNA species encodes the entire *cap* ORF to produce the minor capsid protein VP1 (47). VP1, VP2, and VP3 are found in a ratio of 1 to 1 to 10, respectively, and this stoichiometry is generated by the high abundance of one of the mRNA species and the low translation efficiency from an ACG codon in the case of VP2 (14, 47, 55). Previous studies have indicated that VP2 and VP3 are sufficient for particle formation and accumulation of encapsidated ssDNA progeny, while VP1 is required for assembly of highly infectious particles (63, 64).

All four Rep proteins possess NTP binding activity, DNA helicase activity, and nuclear localization sequences; however, only Rep78 and Rep68 possess DNA binding ability (33, 34, 66). Mutant AAVs defective for the synthesis of the small Rep proteins (Rep52 and Rep40) are able to replicate DNA, but no ssDNA progeny is encapsidated (16). The ability of Rep78 and Rep68 to bind and nick DNA in a sequence- and strand-specific manner inside the ITR is essential in every phase of the AAV life cycle, namely, DNA replication, AAV gene expression, rescue from the integrated state, and self-excision from cloning vectors (29, 35, 44). Nicking of the DNA within the ITR at the terminal resolution site (*trs*) requires binding of Rep78 and Rep68 proteins to a motif composed of tandem repeats of GAGY.

Among AAV serotypes, AAV1, AAV4, AAV7, and AAV8 are believed to be of simian origin, while AAV2, AAV3, and AAV5 are from humans. AAV6 was found in a human adenovirus preparation and is very similar to AAV1. AAVs have

* Corresponding author. Mailing address: NIH 10/1N113, 10 Center Dr., MSC 1190, Bethesda, MD 20892-1190. Phone: (301) 496-4279. Fax: (301) 402-1228. E-mail: Jchiorini@dir.nidcr.nih.gov.

also been reported in other mammalian species including canines, bovines, ovines, and equines (8). An avian AAV (AAAV) was first isolated from the Olson strain of quail bronchitis adenovirus (68). It was later found that 50% of adenoviral field isolates from chickens in the United States and Ireland contained AAVs serologically indistinguishable from the initial isolate (24). The AAV was found to be 20 nm in diameter, was serologically distinct from AAV1–4, did not agglutinate erythrocytes from several species tested, and required adenovirus or herpesvirus for replication (5, 68). In addition, AAV was found to inhibit replication of several avian adenoviruses and herpesviruses (5, 52, 53). Physicochemical studies revealed that the capsid of AAV consists of three VP proteins similar to those of other AAVs. The buoyant density of AAV in CsCl gradients (1.39 to 1.44 g/cm³) is similar to what has been reported for all AAVs (6, 30, 68). One study (30) also provided a limited restriction endonuclease map of AAV.

The ability of AAV vectors to infect dividing and nondividing cells and establish long-term transgene expression and the lack of pathogenicity have made them attractive for use in gene therapy applications. Recent evidence has indicated lack of cross competition in binding experiments, suggesting that each AAV serotype may have a distinct mechanism of cell entry. Comparison of the *cap* ORFs from different serotypes has identified blocks of conserved and divergent sequences, with most of the latter residing on the exterior of the virion, thus explaining the altered tissue tropism among serotypes (19–21, 48, 56). Vectors based on new AAV serotypes may have different host ranges and different immunological properties, thus allowing for most efficient transduction in certain cell types. In addition, characterization of new serotypes will aid in identifying viral elements required for altered tissue tropism.

Serological studies have provided evidence of AAV infection in humans (69). Six percent of an unselected adult population was found positive for antibody to AAV by agar gel precipitation (AGP), and 15.6% was positive by virus neutralization. Fourteen percent of poultry workers (industry or research) were positive for AAV antibody by AGP and 66% were positive by virus neutralization. In the same studies, no cross-reaction was noted by AGP when antiserum to AAV was reacted against primate antigens of serotypes 1 to 4 or when antiserum to AAV serotypes 1 to 4 were reacted against AAV antigen. In addition, antiserum prepared against primate AAV1–4 did not neutralize the AAV. These results suggest that AAV is a distinct serotype and that infections are not restricted to avian species but are found in the adult human population.

Based on the genome organization and sequence homology among insect densovirus, rodent parvovirus, and human dependovirus, it has been previously proposed that these viruses may have diverged from a common ancestor and evolved strictly in their hosts (3). However, the high sequence homology between avian autonomous parvovirus and primate AAVs and the epidemiological documentation of AAV transmission to humans provide evidence for host-independent evolution of at least some parvovirus genera. To better understand the relationship between the avian and the primate AAVs, the complete viral genome of AAV was cloned and sequenced and used to generate recombinant viral particles.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and virus propagation. 293T and COS cells were maintained in Iscove's modified Eagle medium and AMEM, respectively DFI cells (spontaneously immortalized chicken embryonic fibroblasts), QNR cells (quail neuroretinal cells), A549 cells, and primary chicken embryonic fibroblasts (CEF) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Primary chicken embryonic kidney cells were maintained in β -mercaptoethanol supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Primary chicken pituitary cells were maintained in DMEM supplemented with 5% horse serum. QT6 cells (quail fibrosarcoma) were maintained in Ham's F12K supplemented with 10% FBS. LMH cells (chicken hepatoma cells) were maintained in Waymouth's medium supplemented with 10% FBS. DT-90 (chicken lymphoblastoma) cells were maintained in DMEM supplemented with 15% FBS, 5% chicken serum, and 0.015% β -mercaptoethanol. Human primary fibroblasts were obtained from Clonetics and maintained in serum-free proprietary medium supplied by the manufacturer. AAV (ATCC VR-865) was propagated in 10-day-old Spafas pathogen-free embryonated chicken eggs coinfected with the Phelps strain of fowl adenovirus type 1 (FAV1; ATCC VR-486). AAV at 10^4 to 10^7 and FAV1 at 10^5 infectious particles in saline were simultaneously injected into the chorioallantoic cavity of eggs and incubated for 96 h at 37°C. At the end of the incubation, allantoamniotic fluids were harvested and clarified by centrifugation at $6,000 \times g$ for 10 min.

Viral DNA isolation, cloning, and sequencing. Virus from infected clarified allantoamniotic fluids was precipitated by centrifugation at $100,000 \times g$ for 2 h. The supernatant was discharged, and the virus-containing pellet was resuspended in proteinase K digestion buffer (50 mM Tris [pH 8], 20 mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS], 200 μ g of proteinase K per ml) and incubated at 45°C for 2 h. Following a phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, the viral DNA was resuspended in Tris-EDTA buffer containing 0.1 M NaCl. The single-stranded viral DNA was annealed by heating to 95°C for 5 min followed by slow cooling to 65°C for 6 h. The annealed viral DNA was separated electrophoretically in 1% agarose gel, and the double-stranded AAV DNA of approximately 4.7 kb was excised and purified with a gel extraction kit (Qiagen). The viral DNA was further processed to fill in the ends by treating with DNA polymerase (Klenow fragment) at 37°C for 15 min in the presence of deoxynucleoside triphosphates. The whole genome was then blunt end cloned in the pPCR-script cloning vector containing the *lacZ* gene, allowing blue-white screening of ampicillin-resistant colonies (Stratagene). Colonies that contained large inserts (4.7 kb) were initially screened by restriction digestion, and three clones were selected for sequencing. No sequence differences were found in these three clones. The sequence of the entire genome (except ITRs) was determined by using an ABI 373A automated sequencer and FS dye terminator chemistry (ABI). Due to the high degree of secondary structure, ITRs were sequenced by isothermal noncycling sequencing chemistry by using radiolabeled dCTP (Epicentre). One of the clones (pAAAV) that contained the entire consensus sequence of AAV was further used to generate packaging and vector plasmids for construction of recombinant AAV (rAAAV) virus. The complete DNA sequence of AAV has been submitted to GenBank (accession number AY186198).

Sequence analysis. DNA and protein sequence alignments were performed by using the Clustal W multiple sequence alignment tool of the Biology Workbench web-based software (SDSC). Promoter, transcription initiation, and splice sites were predicted by using the Neural Network Promoter Prediction web-based software (BDGP). The presence of potential transcription binding sites was analyzed with the MatInspector computer program (54). Putative motifs in the Rep proteins were identified with the BLIMPS program that searches for motifs in the Blocks protein database (28).

Southern blot hybridization. The ability of pAAAV to support self-excision, packaging, and generation of nuclease-resistant wild-type (wt) AAV particles was examined. 293T cells seeded in 6-well plates were transfected by using calcium phosphate coprecipitation with pAAAV alone, pAAAV plus pAd12 (a helper plasmid containing the E2 and E4 ORFs and VA RNAs of Ad5), and pAAAV plus infection with Ad5. In addition, LMH cells seeded in gelatin-coated 6-well plates were similarly transfected with pAAAV alone or with pAAAV plus infection with FAV1. After 48 h, clarified lysates were prepared by using three freeze-thaw cycles and centrifugation at $3,800 \times g$ for 20 min. The lysate ($\sim 100 \mu$ l) was treated with 5 U of DNase for 2 h at 37°C to remove vector and unpackaged progeny. Subsequently, the solutions were adjusted to contain 20 mM EDTA (pH 8), 0.5% SDS, and 200 μ g proteinase K per ml and incubated at 45°C for 2 h. After one phenol-chloroform extraction, nucleic acids were precipitated with the addition of an equal volume of isopropanol, and the pellet was resuspended in 30 μ l of Tris-EDTA buffer containing 0.1 M NaCl. The

samples were heated to 95°C for 5 min, slowly cooled down to 65°C, and incubated for 5 h. After electrophoresis and blotting, the membrane was probed with a ^{32} P-labeled 1.2-kb *Bam*HI fragment of pAAAV.

Generation of recombinant AAV particles. For production of recombinant particles, we generated and examined the efficiency of three different helper plasmids, pMA₃VRC, pCA₃VRC, and pA₃VRC, containing the AAV *rep* and *cap* genes under control of a mouse mammary tumor virus (MMTV), cytomegalovirus (CMV), or native p5 promoter, respectively. For generation of pMA₃VRC, the *rep* and *cap* ORFs (nucleotides 243 to 4482) was produced by PCR with PFU polymerase (Stratagene) as specified by the manufacturer by using primers containing BstZ107 and *Not*I sites. The PCR products were digested with BstZ107 and *Not*I and ligated in a BstZ107/*Not*I fragment of pMMTV2.1 (18) containing an MMTV promoter and SV40 poly(A). For generation of pCA₃VRC, the *rep* and *cap* ORFs (nucleotides 243 to 4482) were produced by PCR with PFU polymerase and blunt-end ligated in the pCMV-script (Stratagene) vector, which contains a CMV promoter and SV40 poly(A). For generation of pA₃VRC, the *rep* and *cap* genes of AAV including the p5 promoter and poly(A) signal (nucleotides 142 to 4516) was produced by PCR using PFU polymerase and blunt end ligated in pPCR-script. Orientation of inserts was verified by restriction digestion analysis, and final clones were confirmed by sequencing. For generation of the vector carrying the β -galactosidase gene flanked by AAV ITRs, the plasmid pAAAV was digested with *Bsm*BI (NEB). *Bsm*BI does not cut in the plasmid backbone but cuts at positions 838, 1111, 2590, 4419, and 4530 of the AAV genome. The resulting fragment that contained the plasmid backbone and 700 bp of AAV genome flanked by ITRs was used to ligate a *Bsm*BI-*Bsm*I linker. The resulting plasmid was digested with PmlI (cuts at nucleotide 146 of AAV genome) and *Bsm*I and used to ligate a BstZ107-*Bsm*I fragment of pAAV₃RnLacZ (18) that contains the β -galactosidase gene under the control of an RSV promoter and SV40 poly(A) tail. The resulting plasmid (pA₃VRSV β -Gal) was cotransfected with one of the helper plasmids described above and pAd12 in 293T cells plated in 150-cm dishes. Forty-eight hours posttransfection, cells were harvested and quantitated with a hemacytometer, and rAAAV was prepared by using standard CsCl gradient purification. The number of rAAAV genomes was estimated by using real-time quantitative PCR (QPCR) and expressed as nuclease-resistant particles per cell recovered after transfections. Titration of rAAAV was performed in exponentially growing CEF, DF-1, LMH, QNR, QT6, DT-90, 293T, COS, and primary embryonic chicken kidney cells and nondividing primary pituitary cells plated in 96-well plates and transduced with serial dilutions of recombinant virus for 48 h as previously described (20).

RESULTS

To obtain AAV genomic DNA for cloning, a stock of AAV was obtained from ATCC (VR-865) and coinfecting with FAV1 in day 10 embryonated chicken eggs. Virus was concentrated after subjecting infected allantoamniotic fluids to high-speed centrifugation. Viral DNA was released by SDS-proteinase K digestion and purified by gel electrophoresis after annealing the complementary single strands by heating the purified DNA to 95°C and slowly cooling to 65°C. Preliminary experiments indicated that 10^5 infectious particles of FAV1 resulted in productive infection without killing the embryo prematurely. Coinfection with at least 10^5 infectious particles of AAV was required to detect viral DNA (~4.7 kb) by ethidium bromide staining (data not shown). After recovery and end filling, the double-stranded AAV genome was blunt end ligated and cloned into pPCR-script. Several clones that contained an insert of approximately 4.7 kb were initially screened by restriction digestion (data not shown) and all gave bands similar in size to those previously reported (30). We subsequently sequenced three of these clones and all gave identical sequences. One of the clones was randomly selected and used in subsequent analysis (pAAAV).

To verify that pAAAV can support self-excision, viral DNA replication, and packaging in mammalian and avian cells, we prepared viral lysates from 293T and LMH cells transfected

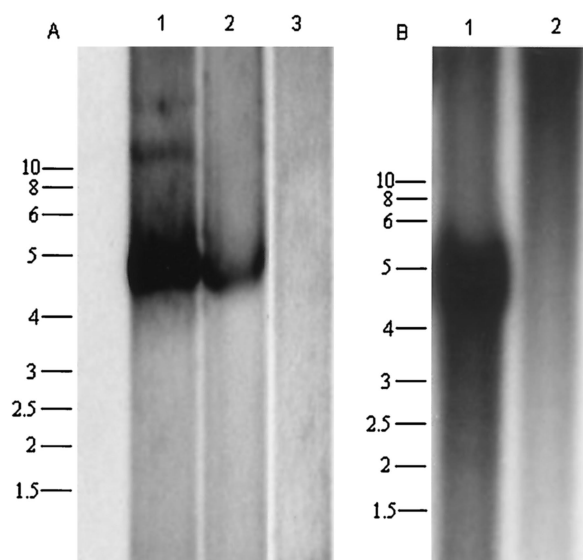


FIG. 1. Southern blot analysis of AAV nuclease-resistant particles in 293T and LMH cells. (A) 293T cells were transfected with pAAAV alone (lane 3), pAAAV plus pAd12 (lane 2), and pAAAV plus infection with wt Ad (lane 1). (B) LMH cells were transfected with pAAAV alone (lane 2) or pAAAV plus infection with FAV1 (lane 1). Viral DNA was isolated as described in Materials and Methods and fractionated on agarose gel before Southern blot analysis with a ^{32} P-labeled pAAAV DNA.

with pAAAV and infected with wild-type (wt) Ad5 or FAV1, respectively. In addition, the ability of an Ad5 plasmid to provide helper functions was examined in 293T cells. Southern blot analysis showed encapsidated (nuclease-resistant particles) AAV progeny in the presence of wt Ad5 or Ad helper plasmid in 293T cells and FAV1 in LMH cells but not in the absence of these (Fig. 1A and B). This result suggests that pAAAV can support rescue of AAV in mammalian and avian cells in the presence of mammalian or avian adenoviral genes.

The AAV ITR is composed of 142 nucleotides with the first 122 forming the characteristic T-shaped palindromic structure (Fig. 2), and it is 60 to 62% homologous with the ITRs of serotypes 2, 3, 4, and 6 and 48% homologous with AAV5. A tandem repeat of GAGY in the ITR, which serves as the binding element of Rep78 and Rep68 (RBE), is conserved between AAV and the other AAVs (Fig. 3, 4). The *trs* rec-

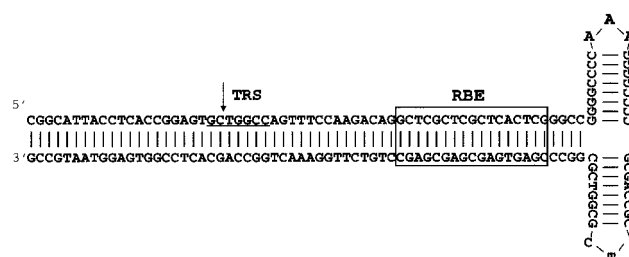


FIG. 2. AAV ITR. The sequence of the ITR is shown in the hairpin conformation. The putative Rep binding site is boxed, while the putative *trs* is underlined and the cleavage site is indicated by an arrow. RBE, Rep binding element.

	RBS		RBS	
AAAV	-TGGC-CAGTTTC-CAAGACAGGCTCGCTCGCTCACTCG--GGCCGGGGCC-----CCAAAGGGGCCCCAGCCAGCGTTCGCGGTCG---CGGCCGAGTGAGCGAGCGAGCC	102		
AAV2	TTGGC-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA--GGCCGGGGCGA-----CCAAAGGTGCCCCAGCGCCGGGCTTTGCGCG--GGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCC	105		
AAV4	TTGGC-CACTCCCTCTATGCGCGCTCGCTCACTCACTCG--GGCCCTGGAGA-----CCAAAGGTCTCCAGACTGCGCGGCTCTGGCCG--GCAGGGCGAGTGAGTGAGCGAGCC	105		
AAV5	-TGGCACCTCTCCCCCTGCTGCGCTCGCTCGCTCGCTTTGGGGGGTGGCAGCTCAAGAGCTGCCAGACGAGCGGCTCTGGCCGTCGCCCCCCCAAAGAGCCAGCGAGCC	119		
	*****		*****	
	TRS ↓		USF	
AAAV	TGTCCTT---GGAATCGGCCAGCACTCCG-----GT-----GAGGT---AATGC---CGTCACGTGG	150		
AAV2	CGCAGA---GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGT---CCTGGAG---GGGTGG-----AGTCGTGAGTGAAT---TACGTCAATAGG	182		
AAV4	CGCATA---GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGT---GTCGAGT---GAGGTGG-----AGTCGTGAGTGAAT---TACGTCAATAGG	222		
AAV5	AGCGAACCGCAGAGGGGAGAGTCCACACTCTCAAGCAAG-----GGGGTTTGTAGCAGTGAATGTC-----ATAATGATGT---TATGTCACGCA	213		
	*****		*****	
	Sp-1	E ₂ F	TATA	
AAAV	TCGGGAA-----TGGGAACCGGAAATCTCCCGAGAACGTAA-ACAAATATAAGACCGGCGCA-----CACGGCGCTGCGTC	220		
AAV2	TTAGGGAGGCTCTGTATTTAGA-----GGTCACGTGAGTGT---TTCGACACATTTTGGCAGACCATGTGGTCAGCTGGGTATTTAAGCCGAGTGAGCAGCG-AGGGTCTCCATT	289		
AAV4	CGTAGGAGGCGCATACCAAGCTGCCACGTACAGCCAGCTGGTCCGTTTGGCAGAGTTTGGCAGACCATGTGGTGTGAGG-GGGTATATAACCGCGAGTGAGCCAGGAGGATCCATT	341		
AAV5	TAGTTAAAGTATTAACAGTCACTGTGATGTTTATCCCA-ATAGGAAGAAGAGCGCGTATGAGTTCTCGGAGACTTCG-GGGTATAAAGACCGAGTGAACGAGCGCGCCATTTCT	331		
	*****		*****	
	P5			
AAAV	ATAC-----GCGCGCGCGCACC-GGCGAGATGAGGTCTACTACGAGGTCACTGTTACGCTGCCAACGACGTCGAGAGTCAGGTACCTGGAATCTCCGATTCGTTCTGCTCACTGGA	331		
AAV2	TTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCA-GCCGCCATGCGCGGGT---TTACGAGATTTGATTAAGGTCCCGACGACCTTGACGGGCACTGCGCGGCACTTCTGACAGCTTTTGAACCTGGG	408		
AAV4	TTGCC-CGCGAATTTTGAACGAGCA-GCAGCCATGCGCGGGT---TACGAGATGCTGTTGAAGTCCCGACGACCTGCGCGGCACTTCTGACCTTTTGTGAGCTGGG	459		
AAV5	TTGCTCTGAGCTGTAGAGGACCTCGCTGCGCATGCTTACCTTCTATGAAGTCAATGTTTCGCGTCCATTTGACGTGGAGGAACATCTGCTCGGAATTTTGAACGCTTTGTGAGCTGGG	451		
	*****		*****	
AAAV	TTACGTCGCGAGAAATGAGCGTTGCTGAGGAGCGCGATTTGGGATTTGGACAGGTGATCAAGTTCAACTGACGCTCGGCGCAAAATCCAAGCGGAGATTCGAATCATTGGGGGACGA	451		
AAV2	TGCGCGAGAAGGAATGGGAGTTGCGCGGAGATTCGACATGGAATCTGAATCTGATTTGAGCAGGACCCCTGACCGTGGCGGAGAGCTGACGCGGCACTTCTGACGGAATGGCGCGGT	528		
AAV4	TGCGCGAGAAGGAATGGGAGTTGCGCGGAGATTCGACATGGAATCTGAATCTGATTTGAGCAGGACCCCTGACCGTGGCGGAGAGCTGACGCGGCACTTCTGACGGAATGGCGCGGT	579		
AAV5	TAACGTGTCAAATTTGGGAGCTGCTCCAGAGTCAGATTTAAATTTGACTCTGTTTGAACAGCTCAGTTGACGCTGGCTGATAGAATTCGCGCGCTGTTCTCTGTCAGGTGGAACAAAT	571		
	*****		*****	
AAAV	TGGCCAAAGAACCGGACTTTCACTATTTTATCCAATGGAACAAGGTGAGGTGTTCTTTCATTTACAGCTCTGCTGGAAACGTGTTCCGTAAAGCCGATGTTACTCGGAAGATATATCC	571		
AAV2	TGAGTAAGGCCCGGAGGCGCTTCTTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGGCTACTTCCACATGACGCTGCTGGAAACACCGGGGTGAAATCCATGTTTGGGAGCTTTCTCTGA	648		
AAV4	TGAGTAAGGCCCGGAGGCGCTTCTTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGGCTACTTCCACATGACATCTGTTGGAGACCGTGGGCGTCAATCCATGTTGTTGGGCGCTTACGTGA	699		
AAV5	TTTCCAAG---CAGGAGTCCAAATCTTTTGTGCAATTTGAGAAGGGATCTGAATTTTTCATCTGACACGCTTGTGGAGACCTTCGCGCATCTCTCTGTCAGGTGGAACAAAT	688		
	*****		*****	
	Egr-1			
AAAV	GACATATTCAACAAAAATTTGTAGTAAAGTCTACTGCGCCA-CGAGCCTACGATGGAAGGATGGATGCTGGTGACCAAGACCAAAATTTTC---GGGGGCGGCAACAAAGTCCGGGCC	687		
AAV2	GTGAGATTTCGCAAAATCTGATTCAGAGAAATTTACCGCGGATCGAGCGGACTTTGCGCAAACTGGTT---CGCGGTCAAAAGACCAAGAAATGGCGCGGAGGCGGGAACAGGTGGTGGAT	767		
AAV4	GCCAGATTAAAGAGAGCTGTTGACCGCGCTTACCGCGGGTTCGAGCGCAGCTTCCGAACTGGTT---CGCGGTGACCAAGACCGCTTAATGGCGCGGAGGCGGGAACAGGTGGTGGAT	818		
AAV5	GTGAGATTTCGCGCCAGCTGTTGAAGTGGTCTTCCAGGGAATGAACCCAGATCAACGACTGGT---GCCATCAACCAAGGTAAAGAGGCG---GGAGCC---AATAGGTGGTGGAT	801		
	*****		*****	
	ETS-1	P ₅₃	TATA	P19
AAAV	GAGTCGTATATTCGCCCTACCTGATCCCGAAGCAAGCAAGGAGTGGGCTGGAGTAACCTGCGCGAGTATATAAAGCGTGCTTGCCAGGAGAACTGCGTGGCAGTCTCGCG	807		
AAV2	GAGTCGTATATTCGCCCTACCTGATCCCGAAGCAAGCAAGGAGTGGGCTGGAGTAACCTGCGCGAGTATATAAAGCGTGCTTGCCAGGAGAACTGCGTGGCAGTCTCGCG	887		
AAV4	GAGTCGTATATTCGCCCTACCTGATCCCGAAGCAAGCAAGGAGTGGGCTGGAGTAACCTGCGCGAGTATATAAAGCGTGCTTGCCAGGAGAACTGCGTGGCAGTCTCGCG	938		
AAV5	TCGTGGTATATTCGCCCTACCTGATCCCGAAGCAAGCAAGGAGTGGGCTGGAGTAACCTGCGCGAGTATATAAAGCGTGCTTGCCAGGAGAACTGCGTGGCAGTCTCGCG	921		
	*****		*****	
AAAV	CGACTTCACCTCGAGGAGGCG---GGCGTCTCGCAATCCAAGGAAATCTCGCGAGAACTGCGAGCGG-CGCTCCCGTGATGCCAGCCGCGTCAGCAAACTGCTACATGAGCTCGTGGAT	924		
AAV2	GCGCAGCATCTGACGCGCGGTGCGCAGACGAGGAGCAGAACCAAGAGAAATCAGAAATCCCAATCTGATGCGCGGTCATGATCAAAACTTTCAGCCAGGTACATGAGAGCTGCTGGG	1007		
AAV4	GCGCAGCATCTGACGCGCGGTGCGCAGACGAGGAGCAGAACCAAGGAAATCAGAAATCCCAATCTGATGCGCGGTCATGATCAAAACTTTCAGCCAGGTACATGAGAGCTGCTGGG	1058		
AAV5	GCGCAGCTTCTGCGCAATCTCGCAG---CGCTCGCAGGAGGCGCTTCGCGCGTGAGTTCGCGGTGACCCGCTCATCAAAAGCAAGACTTCCAGAAATACATGGCGCTCGTCAAC	1038		
	*****		*****	
AAAV	TGGCTCGTGGAGAGGGGATCACACCGAGAAGGAATGGCTGCTGAAAAACAGAGAAAGCTTTCGAGGCTTTCAGGCTTCGAGCAACTCGGCGCTCAGATCAAGACCGCGCTGCAAGGC	1144		
AAV2	TGGCTCGTGGAGAGGGGATCACACCGAGAAGGATGGATCCAGGAGGAGGAGGCTCATACATCTCTTCAATGCGGCTTCAACTCGCGGTCCCAATCAAGGCTGCGTGGACAAT	1127		
AAV4	TGGCTCGTGGAGAGGGGATCACACCGAGAAGGATGGATCCAGGAGGAGGAGGCTTACATCTCTTCAACGCGGCTTCAACTCGCGGTCCCAATCAAGGCTGCGTGGACAAT	1178		
AAV5	TGGCTCGTGGAGAGGGGATCACACCGAGAAGGATGGATCCAGGAGGAGGAGGCTTACATCTCTTCAACTCGCGGCTTCAACTCGCGGCTTCAAGGCTGCGTGGACAAT	1158		
	*****		*****	
AAAV	GCCATCTCAGGAGTGTCTTACCAAGAGCGCGGAGGACTACCTCGTCGGAAGGATCCGCTCGGACGACGACATCCGTCAGAACCGCATCTCAAGATCTCGAATGAACCACTAC	1164		
AAV2	GCGGAAAGATTTAGGCTGACTTAAACCGCGCCCGGACTACCTGCTGGGCGCAGGAGCGCGT---GAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGAACATAACCGGCTAC	1241		
AAV4	GCTTCAAAATCATGAGCTGACAAAGCGGCTCGGAGTACCTGCTGGGCGCAGAACCTTCCGTTCAAGACTGCTGTCGCAAGATGATGATCTGTTGGGAGGAGGGAAGTACGACGCAAGGTCTGT	1292		
AAV5	GCGACCAAAATTTAGCTTGCAGAAAGCGCGGTGGACTACCTCGTGGGAGCTCCGTTCCT---GAGGACATTTCAAAACAGAAATCTGGCAAAATTTTGTAGATGAATGGCTAC	1272		
	*****		*****	
AAAV	GACCCAGCTACGTGGGAGTATTTTGTGCGGTGTTGCCAGAGAAATGGGCAAGGAGAAACAGCTGTGGCTGTTTGGACATGCGACACCGCGCAAGCAACATCGCGGAGGCTATT	1284		
AAV2	GATCCCAAGATATGCGGCTTCGCTCTTCTGGGATGGGCACGAAAGATTCGCAAGAGGAAACACCATCTGGCTGTTTGGGCTTGCACATACCGGAGAACCAACATCGCGGAGGCTATA	1361		
AAV4	GATCCGAGATACCGGCTTCGCTCTTCTGGGCTGGGCAGAAAGATTCGCAAGAGGAAACACCATCTGGCTGTTTGGGCTTGCACATACCGGAGAACCAACATCGCGGAGGCTATA	1412		
AAV5	GACCCGCTACGCGGATCCATCTCTACGCTGCTGTGACGCTCTTCAACAGAGGAAACACCGCTTGGCTTACGACACCGCGCAAGCAACATCGCGGAGGCTATC	1392		
	*****		*****	
AAAV	GCCCATGCTGTGCGCTTCTATGATGCTGTTAACTGGACCAACGAGAACTTTCCGTTCAACGACTGCTGCGAAAAATGATTTATCTGTTGGGAGGAGGGCAAAATGACCGCAAGGTGGT	1404		
AAV2	GCCACATCTGTGCTCTTACGCGGTGCTTAACTGGACCAATGAGAACTTTCCGTTCAACGACTGCTGCGAAAAATGATTTATCTGTTGGGAGGAGGGCAAAATGACCGCAAGGTGGT	1481		
AAV4	GATCCGAGATACCGGCTTCGCTCTTCTGGGCTGGGCAGAAAGATTCGCAAGAGGAAACACCATCTGGCTGTTTGGGCTTGCACATACCGGAGAACCAACATCGCGGAGGCTATA	1532		
AAV5	GCCACATCTGTGCTCTTACGCGGTGCTTAACTGGACCAATGAGAACTTTCCGTTTAACTGCTGTGCAAAATGCTCATTTTGTGGGAGGAGGGCAAAATGACCAAGGTGGT	1512		
	*****		*****	
AAAV	GAAACAGCAAGCGGATTTCTGGGAGGATCTCGGCTGAGAGTGGACAAAAATGCAAGGCTTCGTTCCGATCGAACCGAGCGCGGTATTATTACAGTAACCAACATCTGTTATGTC	1524		
AAV2	GAGTCGGCAAGCCATTTCTGGGAGGAGGAGTGGCGTGGACAGAAATGCAAGTCTTCGCGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATGCTCACTTCACTCAACCAACATCTGCGCGGT	1601		
AAV4	GAGAGCCCAAGCGATCTTCGGGAGGAGGAGTGGCGTGGACAAAGTGCAGTCTTCGCGCCAGATGACCCGACTCCCGTGATGCTCACTTCAACCAACATCTGCGCGGT	1652		
AAV5	GAATCCGCCAAGGCCATCTGGGAGGCTCAAGGTGCGGCTGATCAAGAAATGCTTCAATGATTTCACTCCCTGTCATTGTAATCTCAATACCAACATCTGTTGTTG	1632		
	*****		*****	

FIG. 3. Sequence of the AAV genome. The genomes of AAV, AAV2, AAV4, and AAV5 were aligned by using Clustal W. The sequences of the ITRs are presented in italics. The putative *trs* is indicated by a vertical arrow, and the putative Rep binding site is underlined. Proposed transcription factor binding sites and the polyadenylation signal are also underlined. Proposed transcription initiation sites of the p5, p19, and p40 promoters and splice donor and acceptor sites are indicated by horizontal arrows. Initiation and termination codons are presented in bold letters. USF, upstream factor.

FIG. 3—Continued

Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on December 9, 2020 by guest

FIG. 3—Continued.

ognition motif of serotypes 2, 3, 4, and 6 (CCGGT'TG) is highly homologous with that of the putative AAV *trs* (CCG GT'CG) and weakly homologous with the AAV5 *trs* site (ACG GT'GT). In addition, the spacing between the RBE and the putative *trs* is similar to that found in other serotypes, a characteristic that has been shown to be essential for Rep activity (12).

It has been proposed that a potential inverted repeat flanking the core *trs* sequence of AAV serotypes might be required for Rep *trs* nicking (11). Such an inverted repeat is not found around the AAV *trs* sequence. This observation may indicate that avian Rep nicking does not require any secondary structure around the core *trs* element. Methylation interference experiments have indicated the importance of the CTTTG motif found at the tip of one palindrome in AAV2 Rep binding (9, 57). Most of this motif is conserved in AAV ITR (CTTCG) and only one T residue is changed to C. Interestingly, the AAV4 ITR has a similar substitution in this motif (CTCTG). Thus, regardless of the overall nucleotide sequence homology, the secondary structure and the elements required for viral replication are conserved in the AAV ITR.

The entire AAV genome (Fig. 3) is 4,694 nucleotides in length and has a similar organization to that of other AAVs. It has two inverted terminal repeats and two distinct ORFs. The entire genome of AAV displays 56 to 65% identity at the nucleotide level with the other known AAVs. The p5 promoter region of AAV is much shorter and shows some divergence from homologous regions of other AAV serotypes. Core regulatory elements such as the TATAA box and Ebox/USF are conserved; however, YY1 and Rep binding sites are not present. This suggests that AAV gene expression might be regulated differently from that of other AAVs. The p19 promoter, the p40 promoter, and poly(A) can also be identified in the AAV genome by homology to those in primate AAV serotypes. Based on the general organization and sequence, these elements are highly conserved.

Clustal W protein sequence alignment indicates that the left ORF of AAV is 46 to 54% identical and equally divergent from that of the primate AAVs and the goose parvovirus (GPV) Rep ORF (Fig. 4A) and only 18 to 22% identical with the Rep ORF of other mammalian autonomous parvovirus (data not shown). In comparison, the Rep ORFs of isolates 1, 2, 3, 4, 6, 7, and 8 show greater than 90% similarity and are approximately 67 to 70% identical with that of the AAV5 Rep ORF. The central region of the AAV Rep ORF (amino acids [aa] 322 to 470), which is present in all Rep proteins, displays the greatest identity (82%) with the same region of the other AAVs and the GPV. This region of the Rep proteins is necessary for ATPase and helicase activity and contains an ATP-binding site (aa 334 to 349) and a divalent cation binding site at amino acid residue 421 (44, 61, 65). The amino terminus (aa 1 to 251) shows 42 to 45% similarity between AAV and the other AAVs. This region of the Rep78 and Rep68 proteins is required for DNA binding and *trs* endonuclease activities (22, 50). A tyrosine residue at 155 is homologous to the Tyr156 in AAV2 that functions as the active nucleophile in the *trs* endonuclease site (22, 62). The active site is assembled by the spatial convergence of a divalent metal ion that is tetrahedrally coordinated by Asp24, Glu83, His90, and His92. In addition, Glu6 is required for the correct orientation of the two active-

site imidazoles from His90 and His92 (31). All of these amino acid residues are strictly conserved among AAV serotypes, including AAV. Furthermore, a helix region important for Rep multimerization (aa 159 to 179) is also conserved in AAV. The carboxyl terminal portion (aa 490 to 662) of the unspliced AAV Rep proteins appears highly divergent, displaying less than 15% homology with the primate serotypes. However, a characteristic zinc finger motif was identified by using the BLIMPS algorithm. This feature is conserved in all AAV serotypes.

The right ORF of AAV, which encodes the three viral capsid proteins, is approximately 54 to 57% identical to the capsid ORF of the other AAVs and the GPV (Fig. 4B). It has been previously reported (6) that the AAV capsid proteins VP1, VP2, and VP3 have apparent molecular masses of 92, 69, and 61 kDa, respectively, as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The calculated molecular masses based on amino acid composition for VP1, VP2, and VP3 are 83, 67, and 60 kDa. We also subjected purified AAV virions to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and found that they have molecular masses of 91, 68, and 60 kDa (data not shown). As with the primate AAVs and the goose and duck autonomous parvovirus, the AAV cap gene contains two ATG initiator codons, one for VP1 and the other for VP3. The unusual ACG initiator codon for VP2 is also conserved in AAV.

Clustal W alignment of the VP ORFs indicated the presence of conserved and divergent regions. The N terminus of VP1 (aa 1 to 143), which is required for particle formation, is relatively conserved among AAV, AAV2, AAV4, AAV5, and GPV. However, the start sites for VP2 and VP3 are found in a divergent region. Based on the published three-dimensional structure of the canine parvovirus and comparisons of parvovirus capsid sequences (15, 67), most of the divergent regions among AAV, AAV2, AAV4, AAV5, and GPV are located on the exterior of the virus, thus suggesting different uptake mechanisms and altered tissue tropism.

In the present study, we constructed recombinant AAV particles containing the gene for nucleus-localized β -galactosidase. Virus was produced as previously described (19, 20) by constructing a vector plasmid containing the β -galactosidase gene under the control of a Rous sarcoma virus promoter flanked by AAV ITRs (pA3V β -Gal, Fig. 5A) and a helper plasmid containing the AAV *rep* and *cap* genes. Virus was isolated from 293T cell lysates by CsCl banding, and the distribution of recombinant virus across the gradient was determined by QPCR analysis of gradient fractions. The majority of packaged genomes were found in fractions with a density of 1.42 g/cm³, which is similar to that of wt AAV. We also examined the yield of rAAV when using helper plasmids with the *rep* gene under the control of three different promoters, CMV, MMTV, or the native P5 promoter (Fig. 5A). The different helper plasmids (pCA3VRC, pMA3VRC, and pA3VRC) were cotransfected with pA3V β -Gal and an adenovirus helper plasmid in 293T cells, and rAAV was purified from the three different clarified viral lysates by using CsCl gradients. The number of rAAV genomes was determined by QPCR. In three independent trials, the yield of rAAV was 5-fold and 15-fold greater when using the stronger CMV promoter than the yield with the MMTV and the native P5 promoter, respectively (Fig. 5A). This finding with rAAV is in

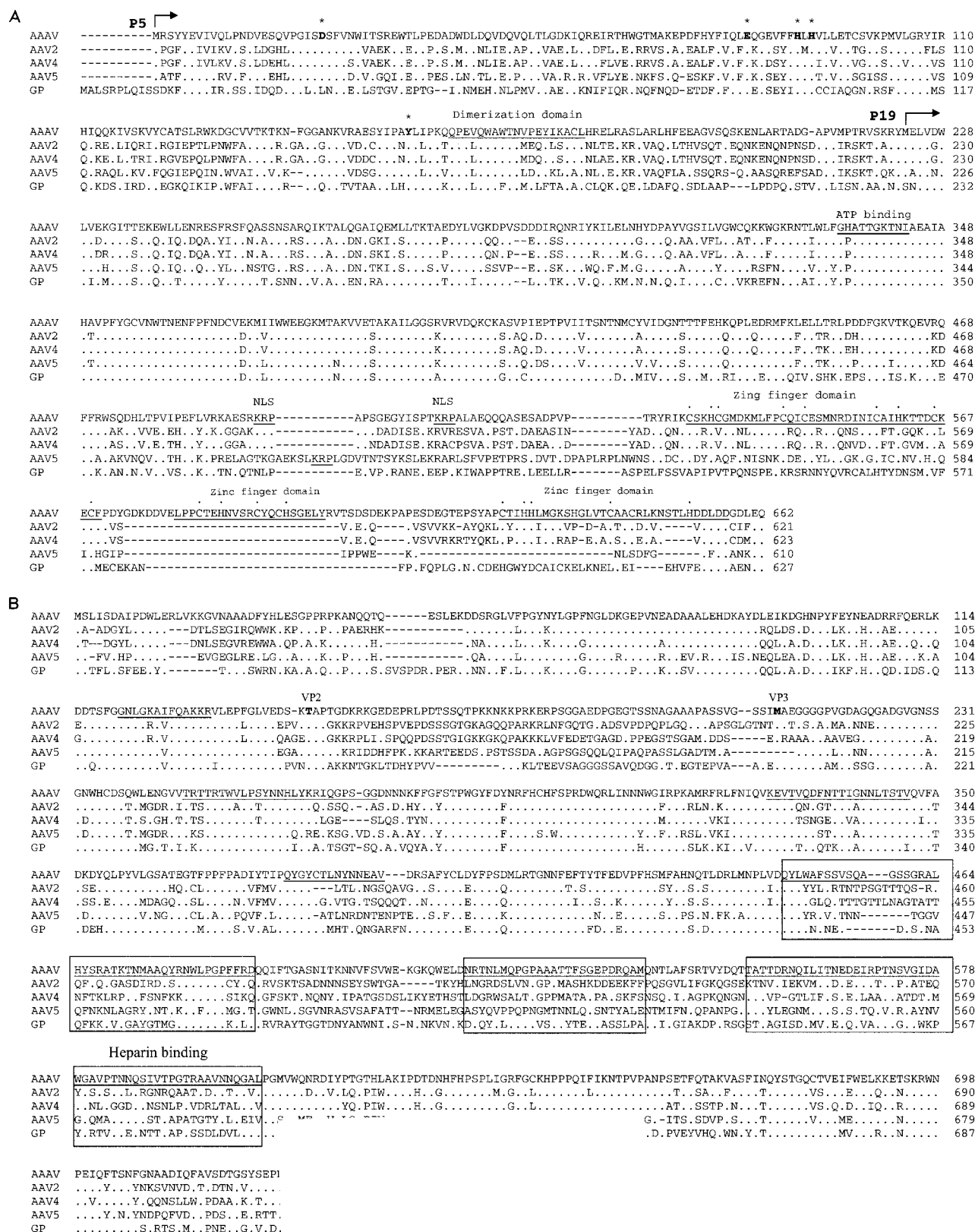


FIG. 4. Comparisons of *rep* and *cap* ORFs. The *rep* and *cap* ORFs of AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, and GPV (GP) were aligned by using Clustal W. Identical amino acids are indicated by a dot. Dashes indicate gaps in the sequence added by the alignment program. (A) Horizontal arrows indicate the initiator codon of the p5 and p19 Rep proteins. The Rep endonuclease site established by Tyr155 and the tetrahedrally coordinated Asp24, Glu83, His90, and His92 are presented in bold letters and are overlined by an asterisk. The region important for Rep multimerization, the ATP binding site, and the basic amino acids of the nuclear localization signal are underlined. The zinc finger motifs in the carboxy terminus are underlined and the coordinating cysteine and histidine residues are indicated by dots. (B) The theoretical initiator codons of VP2 and VP3 are indicated in bold letters. Regions that have been proposed to be on the surface of AAV2 are underlined and divergent regions are boxed. The heparin binding region in the capsid of AAV2 is also indicated.

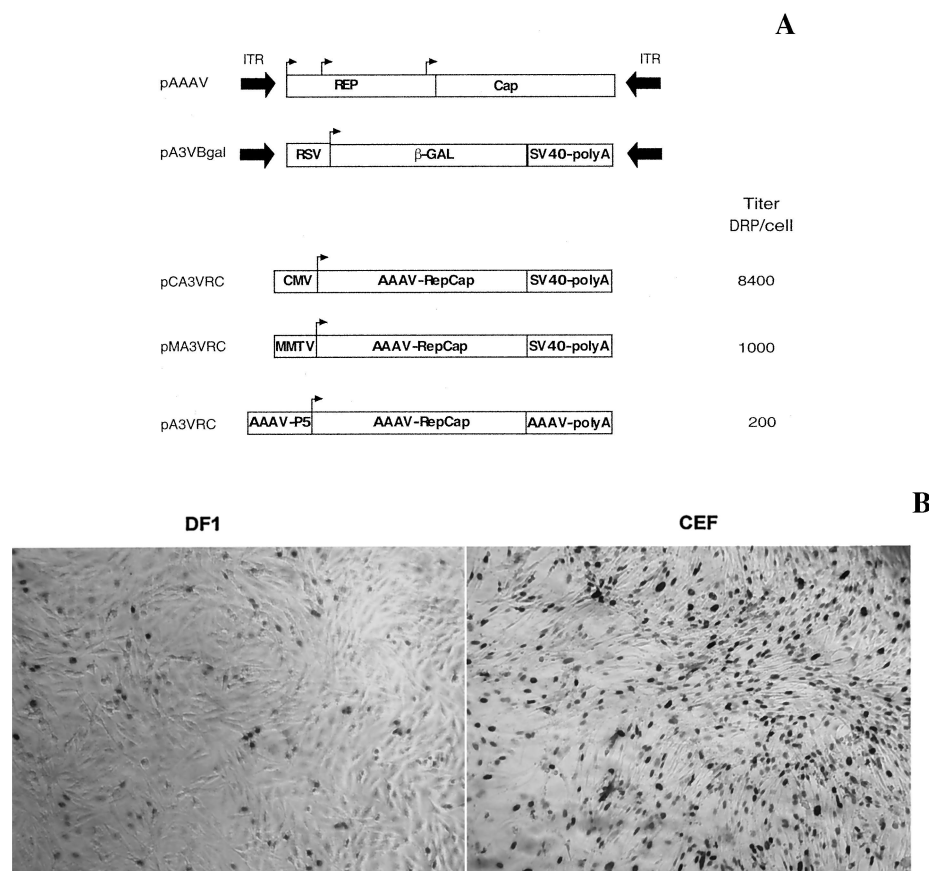


FIG. 5. Vector constructs for the generation of recombinant AAV and transduction of chicken fibroblasts. (A) Wild-type AAV, vector plasmid (pA3V β -Gal), and production yields of rAAAV using helper plasmids providing the *rep* gene under the control of CMV, MMTV, or the native P5 promoter. The helper plasmids pCA3VRC, pMA3VRC, and pA3VRC were individually cotransfected with pA3V β -Gal and an adenovirus helper plasmid in 293T cells, and rAAAV was produced as described in Materials and Methods. The number of rAAAV genomes produced in each group was determined by quantitative PCR and is expressed as DNase-resistant particles per cell (DRP/cell). (B) Relative transduction efficiency of primary chicken embryonic fibroblasts (CEF) and immortalized chicken embryonic fibroblasts (DF1) with equal particles of rAAAV expressing LacZ.

contrast to previous work with AAV2, which demonstrated that the use of a CMV promoter inhibited the production of rAAV2 (39).

In preliminary studies, we observed that the addition of detergents during virus purification affected infectivity. To better understand the effect of detergents, we prepared rAAAV in the presence of the following conditions: 0.5% deoxycholate, 0.5% 3-[(3-chloamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS), 0.5% octylglucoside, or no detergent, respectively. The virus from the four groups was purified by using CsCl gradients, and rAAAV genomes were quantitated by using quantitative PCR. No effect was observed on the yield of viral particles or density of rAAAV in the four preparations. After dialysis against phosphate-buffered saline, transduction efficiency was measured by titration on CEF cells. Addition of OCG or CHAPS had no significant effect on transduction efficiency. However, deoxycholate, which is a stronger ionic detergent, reduced transduction efficiency almost 10-fold (data not shown).

Tissue tropism of rAAAV was determined in CEF, DF1, LMH, DT-90, QNR, QT6, 293T, COS, primary chicken embryonic kidney cells, primary chicken pituitary cells, and pri-

mary human fibroblasts and compared with that of rAAV2, rAAV4, and rAAV5 (Table 1). Transduction efficiency of rAAAV was 10- to 300-fold higher in avian cells than in rAAV2, rAAV4, and rAAV5. In contrast, transduction of the mammalian cells in the panel by rAAAV was almost absent. This observation suggests that AAV is using a different uptake or transduction mechanism compared with the primate AAVs. Interestingly, rAAAV exhibited ~15-fold higher transduction efficiency in primary chicken embryonic fibroblasts than did the immortalized embryonic fibroblasts (Fig. 5B).

DISCUSSION

Although the molecular and biological properties of AAV were largely unknown, serological and immunological data have indicated that AAV is distinct from the primate AAV (68, 69). That evidence prompted us to isolate, clone, and sequence an infectious clone of AAV and construct a recombinant vector.

Previous studies have indicated difficulties in directly cloning full-length infectious clones of AAVs. These difficulties have been attributed to the genetic instability of parvoviral inverted

TABLE 1. Titers for rAAAV, rAAV2, rAAV4, and rAAV5 expressing LacZ in avian and mammalian cell lines and primary cells

Cell type	Transducing units per 10 ⁶ genomes ^a			
	rAAAV	rAAV ₂	rAAV ₄	rAAV ₅
CEF	7,140 ± 380	25 ± 3.5	84 ± 6.3	58 ± 5.7
DF-1	530 ± 35	8 ± 0.9	45 ± 4.7	60 ± 6.1
LMH	2,380 ± 145	230 ± 25	34 ± 5.6	40 ± 4.9
DT-90	ND	ND	ND	ND
QNR	1,260 ± 90	176 ± 18	42 ± 5.2	185 ± 26
QT6	930 ± 62	112 ± 21	23 ± 3.8	33 ± 5
Chicken primary embryonic kidney cells	8,080 ± 560	422 ± 46	350 ± 40	235 ± 38
Chicken primary pituitary cells	4,640 ± 375	144 ± 17	70 ± 12	91 ± 8.4
293T	ND	4,500 ± 355	3,130 ± 270	684 ± 57
COS	5 ± 0.7	6,920 ± 420	3,550 ± 165	592 ± 53
A549	ND	2,190 ± 315	1,360 ± 140	26 ± 4.3
Human primary fibroblasts	ND	1,990 ± 170	1,130 ± 145	292 ± 31

^a Transductions were performed as described in Materials and Methods, and efficiency is expressed as transducing units per 10⁶ recombinant particles. Numbers represent mean ± standard deviation from four independent assays. ND, none detected.

terminal repeats. For that reason, investigators have used *recBC* bacterial strains (10, 70) or low-copy-number plasmids (56, 59) or constructed the full genome from cloned subfragments (20, 37, 48). Surprisingly, in the present study we did not encounter any difficulties in directly cloning the full AAV genome in a medium- to high-copy-number pUC18 derivative plasmid. This may indicate a higher genetic stability of the AAV ITRs than that of the primate isolates.

The nucleotide sequence of AAV is 56 to 65% identical with the other known AAVs and contains all the structural components and genetic elements that characterize the family of AAVs. These elements include the ITRs, promoters, ORFs, transcription start and stop sites, and intron splice junctions. Particularly, the ITRs of all serotypes (including AAV) are similar in length and symmetry, contain a conserved *rep*-binding site, and retain the ability to form the characteristic hairpin structure. Previous studies have demonstrated that the ability to form the terminal hairpin structure is important for AAV replication (38). This observation is further supported by the conservation of this structure between AAV and the primate AAVs.

The high degree of conservation of the *rep* ORF between the primate AAVs indicates the importance of this gene to the life cycle of the virus. The *rep* ORF of AAV is significantly more divergent than it is in other serotypes; however, the core region (aa 322 to 470) containing the ATPase and helicase activity is highly conserved (82% identity). This region is highly conserved in all vertebrate parvovirus, both autonomous and dependovirus, indicating the region's importance in the parvovirus life cycle. The N-terminal region of *rep* has been shown to be important for DNA binding; however, the exact amino acids involved are not known. The *rep*-binding site in the ITRs is highly conserved among AAVs including AAV. Therefore, it is anticipated that the motif in the N-terminal region of *rep* involved in DNA binding must also be conserved. The N-terminal region of AAV (aa 1 to 251) only shows 43% similarity with that of the other serotypes. Thus, the low degree of homology may help in identifying the conserved motif involved in DNA binding.

The carboxyl terminal of the unspliced Rep proteins encodes a zinc finger motif, and it is conserved among the AAV serotypes. The function of this region is largely unknown; however,

previous studies have indicated involvement in transactivation (23). In addition, this region has been shown to be important for interaction with the cellular kinases PrKX and PKA, causing inhibition of kinase activity (17, 23). The carboxyl terminus of AAV *rep* is highly divergent, displaying less than 15% homology. This fact may explain the increased titers of rAAAV obtained when using a helper plasmid that drives expression of the *rep* gene from a CMV promoter.

The predicted amino acid sequence of the capsid proteins indicates several regions with significant variation between serotypes (Fig. 4B). Several differences in the capsid proteins (aa 450 to 613) lie in regions that have been proposed to be on the exterior surface. These regions may play a role in serotype-specific properties such as antigenicity and/or binding to specific cellular receptors. However, not all of the changes are confined to the proposed exterior regions (aa 152 to 221), and they may also be important for other unique properties of AAV versus the primate AAVs.

Transduction efficiency in avian and mammalian cells was very distinct between rAAAV and rAAV2, rAAV4, and rAAV5. The only difference in our four recombinant constructs is the presence of serotype-specific ITRs flanking the expression cassette [RSV-β-Gal-SV40poly(A)] and the serotype-specific capsid. Although it is possible that each serotype-specific ITR could interact differently with host-specific intracellular factors, it is more likely that transduction efficiencies are affected by the presence of distinct cell surface receptors. These data, combined with the extensive divergence of the *cap* ORF, suggest that AAVs utilize a different uptake mechanism from those utilized by other serotypes.

The original hypothesis of a host-dependent evolution of parvovirus (3) is in contrast to the high sequence homology reported between the goose and Muscovy duck autonomous parvovirus and the primate AAVs (13, 40, 70). This observation raised the possibility of horizontal transfer of parvovirus between different species during evolution. The AAV might be the missing link between the avian autonomous parvovirus and the AAVs or may constitute a distinct branch in the evolution of dependovirus. The AAV genome (both *rep* and *cap* genes) is equally divergent between the avian autonomous parvovirus and AAVs. However, the structure and function of the AAV ITR are very similar to those of AAVs. Thus, the

proposed classification of parvoviruses based on the properties of the ITRs (1) gains further merit.

REFERENCES

- Astell, C. R. 1990. Terminal hairpins of parvovirus genomes and their role in DNA replication, p. 59–79. In P. Tijssen (ed.), *Handbook of parvoviruses*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Atchison, R. W., B. C. Casto, and W. Hammon. 1965. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* **149**:754–756.
- Bando, H., J. Kusuda, T. Gojobori, T. Maruyama, and S. Kawase. 1987. Organization and nucleotide sequence of a densovirus genome imply a host-dependent evolution of the parvoviruses. *J. Virol.* **61**:553–560.
- Bantel-Schall, U., and H. zur Hausen. 1984. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* **134**:52–63.
- Bauer, H. J., and G. Monreal. 1986. Herpesviruses provide helper functions for avian adeno-associated parvovirus. *J. Gen. Virol.* **67**:181–185.
- Bauer, H. J., R. Schneider, H. R. Gelderblom, R. Lurz, V. Friehe, and G. Monreal. 1991. Biological and physicochemical characterization of the major (1.40) and minor (1.45) component of infectious avian adeno-associated virus. *Arch. Virol.* **120**:123–133.
- Berns, K. I., and S. Adler. 1972. Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains. *J. Virol.* **9**:394–396.
- Berns, K. I., M. Bergoin, M. Bloom, M. Lederman, N. Muzyczka, G. Siegl, J. Tal, and P. Tattersall. 1994. *Parvoviridae*. Vth report of International Committee on Taxonomy of Viruses, p. 166. In F. A. Murphy, C. M. Faquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers (ed.), *Virus taxonomy*. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- Bohenzky, R. A., R. B. LeFebvre, and K. I. Berns. 1988. Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology* **166**:316–327.
- Boissy, R., and C. R. Astell. 1985. An *Escherichia coli* recBCSbcBrecF host permits the deletion-resistant propagation of plasmid clones containing the 5'-terminal palindrome of minute virus of mice. *Gene* **35**:179–185.
- Brister, J. R., and N. Muzyczka. 1999. Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification. *J. Virol.* **73**:9325–9336.
- Brister, J. R., and N. Muzyczka. 2000. Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J. Virol.* **74**:7762–7771.
- Brown, K. E., S. W. Green, and N. S. Young. 1995. Goose parvovirus—an autonomous member of the dependovirus genus? *Virology* **210**:283–291.
- Buller, R. M. L., and J. A. Rose. 1978. Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. *J. Virol.* **25**:331–338.
- Chapman, M. S., and M. G. Rossmann. 1993. Structure, sequence and function correlations among parvoviruses. *Virology* **194**:491–508.
- Chejanovsky, N., and B. J. Carter. 1989. Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication. *Virology* **173**:120–128.
- Chiorini, J. A., B. Zimmermann, L. Yang, R. H. Smith, A. Ahearn, F. Herberg, and R. M. Kotin. 1998. Inhibition of PrKX, a novel protein kinase, and the cAMP-dependent protein kinase, PKA, by the regulatory proteins of adeno-associated virus type 2. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5921–5929.
- Chiorini, J. A., C. M. Wendtner, E. Urcelay, B. Safer, M. Hallek, and R. M. Kotin. 1995. High-efficiency transfer of the T cell co-stimulatory molecule B7-2 to lymphoid cells using high-titer recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* **6**:1531–1541.
- Chiorini, J. A., F. Kim, L. Yang, and R. M. Kotin. 1999. Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *J. Virol.* **73**:1309–1319.
- Chiorini, J. A., L. Yang, Y. Liu, B. Safer, and R. M. Kotin. 1997. Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *J. Virol.* **71**:6823–6833.
- Davidson, B. L., C. S. Stein, J. A. Heth, I. Martins, R. M. Kotin, T. A. Derksen, J. Zabner, A. Ghodsi, and J. A. Chiorini. 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:3428–3432.
- Davis, M. D., J. Wu, and R. A. Owens. 2000. Mutational analysis of adeno-associated virus type 2 Rep68 protein endonuclease activity on partially single-stranded substrates. *J. Virol.* **74**:2936–2942.
- Di Pasquale, G., and S. N. Stacey. 1998. Adeno-associated virus Rep78 protein interacts with protein kinase A and its homolog PRKX and inhibits CREB-dependent transcriptional activation. *J. Virol.* **72**:7916–7925.
- El Mishad, A. M., K. J. McCormick, V. J. Yates, and J. J. Trentin. 1975. Detection and serological identification of adeno-associated virus in avian adenovirus stocks. *Infect. Immun.* **11**:287–299.
- Gao, G. P., M. R. Alvira, L. Wang, R. Calcedo, J. Johnston, and J. M. Wilson. 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:11854–11859.
- Green, M. R., and R. G. Roeder. 1980. Definition of a novel promoter for the major adenovirus-associated virus mRNA. *Cell* **22**:231–242.
- Green, M. R., and R. G. Roeder. 1980. Transcripts of the adeno-associated virus genome: mapping of the major RNAs. *J. Virol.* **36**:79–92.
- Henikoff, S., J. G. Henikoff, and S. Pietrokovski. 1999. Blocks+: a non-redundant database of protein alignment blocks derived from multiple compilations. *Bioinformatics* **15**:471–479.
- Hermonat, P. L., M. A. Labow, R. Wright, K. I. Berns, and N. Muzyczka. 1984. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J. Virol.* **51**:329–339.
- Hess, M., G. Paul, S. Kling, and G. Monreal. 1995. Molecular characterization of two strains of the avian adeno-associated virus (AAAV). *Arch. Virol.* **140**:591–598.
- Hickman, A. B., D. R. Ronning, R. M. Kotin, and F. Dyda. 2002. Structural unity among viral origin binding proteins: crystal structure of the nuclease domain of adeno-associated virus Rep. *Mol. Cell* **10**:327–337.
- Hoggan, M. D., N. R. Blacklow, and W. P. Rowe. 1966. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**:1467–1474.
- Im, D. S., and N. Muzyczka. 1992. Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization. *J. Virol.* **66**:1119–1128.
- Kleinschmidt, J. A., M. Mohler, F. W. Weindler, and R. Heilbronn. 1995. Sequence elements of the adeno-associated virus rep gene required for suppression of herpes-simplex-virus-induced DNA amplification. *Virology* **206**:254–262.
- Labow, M. A., P. L. Hermonat, and K. I. Berns. 1986. Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J. Virol.* **60**:251–258.
- Laughlin, C. A., H. Westphal, and B. J. Carter. 1979. Spliced adenovirus-associated virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5567–5571.
- Laughlin, C. A., J. D. Tratschin, H. Coon, and B. J. Carter. 1983. Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. *Gene* **23**:65–73.
- LeFebvre, R. B., S. Riva, and K. I. Berns. 1984. Conformation takes precedence over sequence in adeno-associated virus DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1416–1419.
- Li, J., R. J. Samulski, and X. Xiao. 1997. Role for highly regulated rep gene expression in adeno-associated virus vector production. *J. Virol.* **71**:5236–5243.
- Lukashov, V. V., and J. Goudsmit. 2001. Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses. *J. Virol.* **75**:2729–2740.
- Lusby, E., K. H. Fife, and K. I. Berns. 1980. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **34**:402–409.
- Lusby, E., R. Bohenzky, and K. I. Berns. 1981. Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: independence of the orientation at either end of the genome. *J. Virol.* **37**:1083–1086.
- Mayor, H. D., K. Torikai, J. L. Melnick, and M. Mandel. 1969. Plus and minus single-stranded DNA separately encapsidated in adeno-associated satellite virions. *Science* **166**:1280–1282.
- McCarty, D. M., T. H. Ni, and N. Muzyczka. 1992. Analysis of mutations in adeno-associated virus Rep protein in vivo and in vitro. *J. Virol.* **66**:4050–4057.
- McLaughlin, S. K., P. Collis, P. L. Hermonat, and N. Muzyczka. 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* **62**:1963–1973.
- Mendelson, E., J. P. Trempe, and B. J. Carter. 1986. Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J. Virol.* **60**:823–832.
- Muralidhar, S., S. P. Becerra, and J. A. Rose. 1994. Site-directed mutagenesis of adeno-associated virus type 2 structural protein initiation codons: effects on regulation of synthesis and biological activity. *J. Virol.* **68**:170–176.
- Muramatsu, S. I., H. Mizukami, N. S. Young, and K. E. Brown. 1996. Nucleotide sequence and generation of an infectious clone of adeno-associated virus 3. *Virology* **221**:208–217.
- Nahreini, P., S. H. Larsen, and A. Srivastava. 1992. Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome. *Gene* **119**:265–272.
- Owens, R. A., M. D. Weitzman, S. R. Kyostio, and B. J. Carter. 1993. Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J. Virol.* **67**:997–1005.
- Parks, W. P., J. L. Melnick, R. Rongey, and H. D. Mayor. 1967. Physical assay and growth cycle studies of a defective adeno-satellite virus. *J. Virol.* **1**:171–180.
- Pronovost, A. D., V. J. Yates, and D. E. Fry. 1978. Effect of avian adeno-associated virus on pathogenicity of Tipton virus in chicks. *Avian Dis.* **22**:354–357.
- Pronovost, A. D., V. J. Yates, and D. E. Fry. 1979. Inhibition and enhance-

- ment of avian adenovirus plaque production by heavy and light avian adenovirus-associated viral particles. *Am. J. Vet. Res.* **40**:549–551.
54. Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender, and T. Werner. 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* **23**:4878–4884.
 55. Rose, J. A., J. V. Maizel, Jr., J. K. Inman, and A. J. Shatkin. 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *J. Virol.* **8**:766–770.
 56. Rutledge, E. A., C. L. Halbert, and D. W. Russell. 1998. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *J. Virol.* **72**:309–319.
 57. Ryan, J. H., S. Zolotukhin, and N. Muzyczka. 1996. Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats. *J. Virol.* **70**:1542–1553.
 58. Samulski, R. J., A. Srivastava, K. I. Berns, and N. Muzyczka. 1983. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* **33**:135–143.
 59. Samulski, R. J., K. I. Berns, M. Tan, and N. Muzyczka. 1982. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:2077–2081.
 60. Senapathy, P., J. D. Tratschin, and B. J. Carter. 1984. Replication of adeno-associated virus DNA. Complementation of naturally occurring rep 2 mutants by a wild-type genome or an ori 2 mutant and correction of terminal palindrome deletions. *J. Mol. Biol.* **179**:1–20.
 61. Smith, R. H., and R. M. Kotin. 1998. The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J. Virol.* **72**:4874–4881.
 62. Smith, R. H., and R. M. Kotin. 2000. An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA. *J. Virol.* **74**:3122–3129.
 63. Smuda, J. W., and B. J. Carter. 1991. Adeno-associated viruses having nonsense mutations in the capsid genes: growth in mammalian cells containing an inducible amber suppressor. *Virology* **184**:310–318.
 64. Tratschin, J. D., I. L. Miller, and B. J. Carter. 1984. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J. Virol.* **51**:611–619.
 65. Walker, S. L., R. S. Wonderling, and R. A. Owens. 1997. Mutational analysis of the adeno-associated virus Rep68 protein: identification of critical residues necessary for site-specific endonuclease activity. *J. Virol.* **71**:2722–2730.
 66. Wonderling, R. S., S. R. M. Kyostio, and R. A. Owens. 1995. A maltose-binding protein/adeno-associated virus rep68 fusion protein has DNA-RNA helicase and ATPase activities. *J. Virol.* **69**:3542–3548.
 67. Xie, Q., W. Bu, S. Bhatai, J. Hare, T. Somasundaram, A. Azzi, and M. S. Chapman. 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:10405–10410.
 68. Yates, V. J., A. M. el-Mishad, K. J. McCormick, and J. J. Trentin. 1973. Isolation and characterization of an avian adenovirus-associated virus. *Infect. Immun.* **7**:973–980.
 69. Yates, V. J., G. J. Dawson, and A. D. Pronovost. 1981. Serologic evidence of avian adeno-associated virus infection in an unselected human population and among poultry workers. *Am. J. Epidemiol.* **113**:542–545.
 70. Zadori, Z., R. Stefancsik, T. Rauch, and J. Kisary. 1995. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology* **212**:562–573.



**Superintendencia de
Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2021/0017692
Recibo: 25-152241
Fecha: 06/06/2025

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 1118649
CUS: 1536322323

Patente PCT
PARTÍCULAS VIRALES MODIFICADAS Y USOS DE ESTAS

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 225,000	\$ 225,000
TOTAL					\$ 225,000