



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 230**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/35 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99962729 .2**

96 Fecha de presentación : **10.11.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1135468**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2001**

54 Título: **Vectores víricos y sus procedimientos de preparación y administración.**

30 Prioridad: **10.11.1998 US 107840 P**
10.03.1999 US 123651 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.05.2010

73 Titular/es:
University of North Carolina at Chapel Hill
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, North Carolina 27599-4105, US

72 Inventor/es: **Rabinowitz, Joseph, E.;**
Samulski, Richard, Jude y
Xiao, Weidong

74 Agente: **Polo Flores, Carlos**

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

DESCRIPCIÓN

Vectores víricos y sus procedimientos de preparación y administración.

5 **Declaración de financiación federal**

Esta invención se llevó a cabo, en parte, con apoyo financiero del gobierno de los EEUU con las becas números DK42701 y 5-32938 0-110 del National Institutes of Health. El gobierno de los Estados Unidos tiene algunos derechos sobre esta invención.

10

Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a vectores víricos, en concreto, a vectores de parvovirus modificados y a sus procedimientos de preparación y administración.

15

Antecedentes

Los parvovirus son virus pequeños de ADN sin envuelta, de cadena única con entre veinte y treinta nanómetros de diámetro. Los genomas de los parvovirus tienen aproximadamente 5000 nucleótidos de longitud, que contienen dos marcos de lectura abiertos. El marco de lectura abierto a mano izquierda codifica las proteínas responsables de la replicación (Rep), mientras que el marco de lectura abierto a mano derecha codifica las proteínas estructurales de la cápsida (Cap). Todos los parvovirus tienen viriones con simetría icosaédrica compuestos por una proteína Cap mayor, normalmente la más pequeña de las proteínas Cap, y una o dos proteínas Cap menores. Las proteínas Cap se generan a partir de un gen único que inicia la traducción a partir de diferentes codones de inicio. Estas proteínas tienen términos C idénticos, pero poseen términos N únicos debido a los diferentes codones de inicio.

25

La mayoría de los parvovirus tienen una estrecha gama de huéspedes; el tropismo de B19 es para las células eritroides humanas (Munshi y col., (1993) J. Virology 67: 562), mientras que el parvovirus canino tiene un tropismo por los linfocitos en perros adultos (Parrish y col., (1988) Virology 166:293; Chang y col., (1992) J. Virology 66:6858). Los virus adenoasociados, por otra parte, pueden replicarse bien en líneas caninas, de ratón, pollo, bovino, mono, así como en numerosas humanas, cuando está presente el virus auxiliar apropiado. En ausencia del virus auxiliar, el VAA infectará y establecerá latencia en todos estos tipos de células, sugiriendo que el receptor de VAA es común y conservado entre especies. Se han identificado varios serotipos de VAA, que incluyen los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

30

El virus adenoasociado (VAA) es un parvovirus dependiente de veinte nanómetros de tamaño que requiere la infección simultánea con otros virus (tanto adenovirus como algunos miembros del grupo del virus del herpes) para experimentar una infección productiva en células cultivadas. En ausencia de infección simultánea con el virus auxiliar, el virión de VAA se une a un receptor celular y se introduce en la célula, migrando al núcleo, y libera un genoma de ADN de cadena única que puede establecer la latencia mediante la integración en el cromosoma del huésped. El interés del VAA como vector se ha centrado alrededor de la biología de este virus. Además de su ciclo de vida único, VAA tiene una amplia gama de huéspedes para infectividad (ser humano, ratón, mono, perro, etc.), es ubicuo en seres humanos, y es completamente no patogénico. La capacidad de empaquetado finita de este virus (4,5 kb) ha restringido en el pasado el uso de este vector a genes o ADNc pequeños. Para hacer avanzar la prospección de la liberación del gen de VAA, se pueden desarrollar vectores suficientes para transportar genes más grandes. Adicionalmente, se requerirán viriones que dirijan se específica y eficientemente a tipos de células definidos sin transducir otras que serán necesarias para la aplicación clínica.

35

40

45

Las proteínas de la cápsida de VAA2 son Vp1, 2, y 3, con pesos moleculares de 87, 73, y 62 kDa, respectivamente. Vp3 representa casi el 80% de la proteína total en viriones intactos, mientras que Vp1 y Vp2 representan el 10% cada una (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97; Rolling y col., (1995) Molec. Biotech. 3:9; Wistuba y col. (1997) J. Virology 71:1341). Estudios anteriores sobre el VAA2 apoyan que se necesitan las tres subunidades de la cápsida para extraer genomas de cadena única a partir de la mezcla de ADN de doble cadena replicante. A continuación se secuestran estos genomas en partículas inmaduras preformadas que maduran en partículas infecciosas. Estas partículas tienen una densidad entre 1,32 y 1,41 g/ml en cloruro de cesio y sedimentan entre 60S y 125S en sacarosa (Myers y col., (1981) (Myers y col., (1981) J. Biological Chem. 256:567; Myers y col., (1980) J. Virology 35:65).

50

55

Estudios anteriores de mutagénesis en cápsidas de AAV2 han demostrado que las inserciones y deleciones en la región Vp3 inhiben completamente la acumulación de viriones de cadena única y la producción de partículas infecciosas (Hermonat y col., (1984) J. Virology 51:329; Ruffing y col., (1992) J. Virology 66:6922). Yang y col., (1998) Human Gene Therapy 9:1929, han informado de la inserción de una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo de cadena única contra CD34 humano en el extremo 5' de las regiones que codifican Vp1, Vp2 o Vp3 de VAA2. Estos investigadores observaron la transducción extremadamente baja de células KG-1 que expresaban CD34 por viriones de VAA que contenían la proteína de fusión Vp2 (1,9 unidades de transducción/ml o menos, declaración que abarca las páginas 1934-35). Se dice que las células KG-1 no son permisivas a la infección por un vector de VAA natural. Estos resultados con la Vp2 de fusión de VAA son sospechosos ya que la transducción de células KG-1 por este virus fue esencialmente insensible a un anticuerpo de cápsida dirigido contra VAA (430 frente a 310 unidades de

60

65

transducción/ml; Tabla 2) mientras que la transducción de células HeLa fue marcadamente reducida por este anticuerpo (63.200 frente a < 200 unidades de transducción/ml; Tabla 2). no se emprendió la caracterización de los presuntos viriones de fusión para confirmar que las partículas contenían la proteína Vp2 de fusión, se expresaba el anticuerpo en la superficie de la cápsida, o que las partículas se unían a las proteínas CD34. Adicionalmente, se podrían producir únicamente partículas de VAAr si se proporcionaran las tres subunidades de la cápsula naturales, además de la subunidad quimérica (Página 1934, Col. 2, líneas 5-12). Colectivamente, estos resultados sugieren que las subunidades quiméricas no se incorporaron a las partículas de VAA viables, y que el bajo nivel de proteína quimérica observada en las células diana fue, de hecho, debido a la captación celular de proteína de cápsida quimérica o a que la proteína se agrega mediante otros mecanismos.

Diversos estudios han demostrado que pueden mutar las proteínas de la cápsida de parvovirus y estudiarse el ensamblaje del virión. En un estudio, se sustituyó la región de codificación de 147 aminoácidos de la lisozima de la clara de huevo de gallina por la secuencia de codificación única de Vp1 de B19. Esta modificación dio como resultado partículas vacías purificadas que retenían la actividad enzimática de la lisozima (Miyamura y col., (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:8507). Adicionalmente, la expresión de los péptidos (restos 9 y 13) en Vp2 de B19 dio como resultado partículas vacías que eran inmunógenas en ratones que soportaban presentación superficial de las inserciones (Brown y col., (1994) Virology 198:477). En un estudio más reciente, se insertó nucleoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML) contra el epítipo CD8+CTL (restos 118-132) en la proteína Vp2 de la cápsida del parvovirus porcino (pvp) (Sedlik y col., (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 94:7503). Esta proteína de cápsida, con el epítipo clonado en el término N, se autoensambló cuando se expresó en un sistema de baculovirus. Esta partícula de tipo virus quimérico se usó a continuación para inmunizar ratones contra un estímulo letal procedente de VCML. Aunque estos estudios evaluaron la estructura y el ensamblaje de la cápsida, no resolvieron el problema del empaquetado de los genomas de B19 en las cápsidas alteradas.

Los vectores de VAA(r) recombinantes requieren sólo secuencias duplicadas terminadas invertidas en *cis* de las 4679 bases para generar virus. El resto de secuencias víricas son dispensables y se pueden suministrar en *trans* (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). Las características atractivas de los vectores de VAA para terapia génica son la estabilidad, la simplicidad genética y la facilidad de manipulación genética de este virus. Aunque cada uno de estos factores sigue siendo válido, han salido recientemente a la luz algunos obstáculos para la aplicación de los vectores de VAAr. Entre estos se incluyen la ineficacia de transducción del vector y las restricciones de empaquetado. No es sorprendente, dada la naturaleza críptica de este virus, que hayan aparecido nuevas percepciones en su biología únicamente tras extensa investigación con vectores de VAAr, que se ensayan más fácilmente en comparación con los VAA naturales.

Con respecto a la eficacia de la transducción del vector, algunos estudios recientes han mostrado una gran promesa en términos de duración de la expresión transgénica *in vivo*; sin embargo, existe una insuficiencia en la eficacia de la transducción, que inesperadamente, estaba basada en los resultados anteriores *in vitro* (Flotte y col., (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:10613). Uno de los primeros experimentos en roedores para demostrar la utilidad de los vectores de VAAr *in vivo* se dirigió en la transducción de tejido cerebral en rata (Kaplitt y col., (1994) Nature Genet. 7:148). Adicionalmente al cerebro, se ha encontrado que los vectores de VAA transdujeron eficazmente *in vivo* el músculo, demostrando expresión génica a largo plazo (al menos 1,5 años), ausencia de respuesta inmune, y no toxicidad del vector (Xiao y col., (1996) J. Virol. 70:8098; Clark y col., (1996) Hum. Gene Ther. 8:659; Fisher y col., (1997) Nat. Med. 3:306; Monahan y col., (1998) Gene Ther. 5:40). Las etapas primarias que influyen la liberación eficiente del vector son la Entrada y la conversión del virus de la síntesis de la segunda cadena (véase Ferrari y col., (1996) J. Virology 70:3227-34).

El éxito global de VAA como un vector vírico de objetivo general depende de la capacidad de empaquetar genomas de longitud más grande (5 kb) que la de los vectores de VAAr completos. Los estudios de Dong y col., (1996) Hum. Gene Ther. 7:2101, han determinado que las limitaciones de empaquetado usando vectores de VAAr son entre 104% y 108%. Esta restricción de empaquetado impide el uso de numerosos genes importantes que se están ensayando actualmente para la terapia génica (por ejemplo, el gen de la distrofina o las construcciones actuales de minidistrofina).

Según esto, sigue existiendo una necesidad en la técnica de vectores víricos mejorados con límites de empaquetado y eficacia de transducción mayores que los de los vectores de VAA. Adicionalmente, sigue existiendo una necesidad de vectores víricos con tropismos alterados en comparación con los vectores de VAA.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona vectores de parvovirus para introducir (es decir, administrar) y, preferiblemente, expresar una secuencia de nucleótidos en una célula. La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que se pueden crear vectores de parvovirus que poseen estructuras y características únicas en comparación con los vectores actuales sustituyendo o insertando una secuencia extraña (es decir, una secuencia exógena de aminoácidos) en una cápsida de parvovirus. La invención proporciona además vectores novedosos que se generan empaquetando en cruzado un genoma de parvovirus (preferiblemente un genoma de VAA) en el interior de una cápsida de parvovirus diferente. La presente invención proporciona un repertorio de novedosos vectores de parvovirus que pueden poseer propiedades antigénicas únicas y ventajosas, capacidades de empaquetado, y tropismos celulares en comparación con los vectores de VAA actuales.

Estos y otros aspectos de la invención se muestran con más detalle en la descripción de la invención a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra la estrategia de mutagénesis insercional para la cápsida de VVA2. Se clonó un casete que contenía el gen Kan^r flanqueado por los emplazamientos *EcoRV* y *Nae I* en el plásmido pAV2Cap. pAV2Cap, que contiene el marco de lectura abierto de la cápsida de VAA2, se digirió parcialmente con *Hae III*, *Nla IV*, y *Rsa I* separadamente, de tal manera que se aislaron los productos de longitud unidad. Se muestran las 43 posiciones de los emplazamientos de restricción para estos enzimas por encima del diagrama del marco de lectura abierto de la cápsida. Se mapeó la posición de la inserción de Kan^r mediante digestión del enzima de restricción y en algunos casos, se secuenció. Una vez que se determinó la posición, se eliminó el gen Kan^r mediante digestión con *EcoRV*, y se subclonó la región de la cápsida en pACG. Esta estrategia dio como resultado insertar un fragmento de 12 pares de bases con la mitad de los emplazamientos *Nae I* flanqueando un único emplazamiento *EcoRV*, en los emplazamientos *Hae III*, *Nla IV*, y *Rsa I* respectivos. Las doce pares de bases codifican cuatro aminoácidos, uno de los cuales se muestra por encima del diagrama de pACG2;

la fig. 2 muestra la expresión de las proteínas de la cápsida en células transfectadas con plásmidos auxiliares mutantes naturales y de inserción de pACG2. Se analizaron los lisados celulares de células 293 transfectadas con 1, H2285; 2, H2634; 3, H2690; 4, N2944; 5, H2944; 6, H3595; 7, H4047; 8, natural, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal B1 y se detectaron mediante el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. En la parte izquierda de la transferencia Western están las posiciones de los patrones de peso molecular y en la parte derecha están las posiciones de la proteína mayor de la cápsida, VP3, y de las proteínas menores de la cápsida VP2 y VP1;

la fig. 3 muestra la expresión del transgen Lac Z en células infectadas con virus mutante de inserción o natural. Panel A. hibridación por transferencia en mancha del transgen Lac Z. Se sometieron los lisados celulares de células 293 infectadas con adenovirus a gradiente isopéncico de cloruro de cesio. Las fracciones procedentes del gradiente se trataron con DNasa y RNasa antes de la transferencia en mancha para eliminar los ácidos nucleicos no empaquetados, se marcaron los números de fracción antes de la transferencia en mancha. La fracción 1 tiene un intervalo de densidad de 1,377-1,41, la fracción 2 tiene un intervalo de densidad de 1,39-1,435, y la fracción 3 tiene un intervalo de densidad de 1,42-1,45. Se usó el gen de la β -galactosidasa como plantilla control, para estimar los números de partículas. Se derivaron las estimaciones del número de partículas suponiendo que 1 μ g de ADN de 100 pb tiene $9,1 \times 10^{11}$ moléculas. Panel B. Infección de células HeLa con $1,75 \times 10^8$ partículas procedentes de la cápsida de mutantes de inserción y naturales que contenían el transgen Lac Z. las células que expresaban el transgen aparecieron en azul cuando se tiñeron con X-gal;

la fig. 4 muestra la caracterización de los mutantes de inserción usando microscopio electrónico. Se dializaron muestras de 200 μ l de cada virus de la fracción punta de gradiente frente a 1xPBS + MgCl₂ 1 mM y se desecaron mediante vacío rápido, a continuación se volvieron a suspender en 20 μ l de H₂O destilada. Se tiñeron las muestras negativo con ácido fosfotúngstico al 2%. Panel A. VAA2r con virión natural. Virus de inserción infecciosos H2690 (Panel B), y H2591 (Panel C). Virus no infecciosos H2285 (Panel D), H2634 (Panel E) y, H3595 (Panel F). La barra negra tiene 100 nm; el aumento es equivalente en cada panel;

la fig. 5 presenta el análisis de la composición del virión de virus naturales y diversos mutantes de inserción aislados de lisados celulares mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Se determinaron las fracciones punta del virus mediante hibridación por transferencia de mancha y se dializaron frente a 1xPBS + MgCl₂ 1 mM. Por cada uno, se usó una muestra vírica entre $1,0 \times 10^9$ y $2,5 \times 10^9$ partículas. Se analizaron los viriones procedentes de 1 VAA2r natural; 2 H2285; 3. R2349; 4. H2591; 5. H2634; 6. H2690; 7. H3766; and 8. N4160 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal B1 y se detectaron mediante el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. En la parte izquierda de la transferencia Western están las posiciones de los patrones de peso molecular y en la parte derecha están las posiciones de la proteína mayor de la cápsida, VP3, y de las proteínas menores de la cápsida VP2 y VP1;

la fig. 6 muestra el análisis del lote de virus natural y los mutantes de inserción no infecciosos que se unen a la heparina agarosa mediante hibridación por transferencia en mancha. Se dializaron los virus con viriones naturales y de inserción en las cápsidas frente a 0,5 x PBS y MgCl₂. Se unieron cien microlitros de cada virus a 100 μ l de heparina agarosa, a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron las muestras seis veces con 500 μ l de tampón de lavado cada una, seguido por elución con 100 μ l de 0,5 a 1,0 y 1,5 M cada una, y se reservó el sobrenadante de cada etapa de lavado y elución. Se usaron veinte microlitros del sobrenadante de cada etapa y 20 μ l del residuo de agarosa para la hibridación por transferencia de mancha. Se combinaron las parejas de lavados y se usó 1/50 del volumen total de cada pareja para la hibridación por transferencia de mancha, a la vez que se usaron un quinto del sobrenadante de la elución y los volúmenes del lecho de agarosa. El 100% de la unión fue equivalente a un quinto del virus añadido a la heparina agarosa. Muestras 1. VAA2r con virión natural; 2. H2285; 3. H2416; 4. H2634; y 5. H3761;

la fig. 7 es una representación esquemática de las quimeras de la subunidad VAA2/4;

la fig. 8 es un diagrama del plásmido pAA2/B19p2Cap auxiliar. La región de codificación de la proteína estructural mayor de B19, Vp2, se clonó sin soldadura a partir de VAA-Vp3 con TAA;

la fig. 9 proporciona el análisis del EM de las partículas quiméricas del virus producidas con pAAV/B19Vp2Cap.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona vectores de parvovirus para la liberación de ácidos nucleicos en las células, *in vitro* e *in vivo*. Alternativamente, la invención proporciona estructuras de cápsidas novedosas para uso, por ejemplo, como vacunas o para la liberación de compuestos en las células (por ejemplo, tal como se describe por la Patente de los Estados Unidos N° 5.863.541 de Samulski y col.). Los vectores de parvovirus de la presente invención utilizan las ventajosas propiedades de los vectores de VAA, y pueden mitigar algunos de los problemas encontrados con
10 estos vectores. En realizaciones concretas, los vectores de parvovirus pueden poseer características diferentes o alteradas respecto de las de los vectores de VAA, entre las entre los que se incluyen, pero no se limitan a, propiedades antigénicas, capacidades de empaquetado, y/o tropismo celular.

El término “parvovirus” según se usa en el presente documento abarca todos los parvovirus, incluyendo los parvovirus y dependovirus que se replican autónomamente. Los parvovirus autónomos incluyen miembros de los géneros *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus*, y *Contravirus*. Los parvovirus autónomos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, virus minute del ratón, parvovirus bovino, parvovirus canino, parvovirus de pollo, virus de la panleucopenia felina, parvovirus felino, parvovirus del ganso, y virus B19. Los expertos en la técnica conocen otros parvovirus autónomos, Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS y col., *VIROLOGY*, volumen 2, capítulo 69 (3ª
20 ed., Lippincott-Raven Publishers).

El género *Dependovirus* contiene los virus adenoasociados (VAA), entre los que se incluyen, pero no se limitan a VAA tipo 1, VAA tipo 2, VAA tipo 3, VAA tipo 4, VAA tipo 5, VAA tipo 6, VAA aviar, VAA bovino, VAA canino, VAA equino, y VAA ovino. Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS y col., *VIROLOGY*, volumen 2, capítulo 69
25 (3ª ed., Lippincott-Raven Publishers).

Las partículas, cápsidas y genomas de parvovirus de la presente invención proceden preferiblemente de VAA.

El término “tropismo” según se usa en el presente documento se refiere a la entrada del virus en la célula, opcional
30 y preferiblemente, seguida por la expresión de las secuencias transportadas por el genoma vírico en la célula, por ejemplo, para un virus recombinante, la expresión de la(s) secuencia(s) heteróloga(s) de nucleótidos. Las personas expertas en la técnica apreciarán que la transcripción de una secuencia heteróloga de ácido nucleico a partir del genoma vírico puede no iniciarse en ausencia de factores trans-actantes, por ejemplo, de un promotor inducible o secuencia de ácido nucleico regulada de otra manera. En el caso del VAA, la expresión génica procedente del genoma
35 vírico puede ser de un provirus integrado de manera estable, de un episoma no integrado, así como de cualquier otra forma que pueda tomar el virus en el interior de la célula.

Los vectores de parvovirus de la presente invención son útiles para la liberación de ácidos nucleicos en las células *in vitro* e *in vivo*. En particular, se pueden emplear ventajosamente los vectores inventivos para liberar o transferir
40 ácidos nucleicos en las células animales. Los ácidos nucleicos de interés incluye ácidos nucleicos que codifican péptidos y proteínas, preferiblemente péptidos o proteínas terapéuticos (por ejemplo, para usos médicos o veterinarios) o inmunógenos (por ejemplo, para vacunas).

Un péptido o proteína “terapéutico” es un péptido o proteína que puede aliviar o reducir los síntomas que son el
45 resultado de una ausencia o de defectos en una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un péptido o proteína “terapéutico” es uno que confiere de otra manera un beneficio a un sujeto, por ejemplo, efectos anticancerosos. Los péptidos y proteínas terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, CTFR (proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística), distrofina (que incluye el producto de la proteína de los minigenes de la distrofina, véase, por ejemplo, Vincent y col., (1993) *Nature Genetics* 5:130), utrofina (Tinsley y col., (1996) *Nature* 384:349), factores
50 de coagulación (Factor XIII, Factor IX, Factor X, etc.), eritropoyetina, el receptor LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, β -glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, cetoadido deshidrogenasa de cadena ramificada, hormonas, factores de crecimiento (por ejemplo, factores de crecimiento 1 y 2 de tipo insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nerviosos, factor
55 3 y 4 neurotrófico, factor neurotrófico derivado de cerebro, factor de crecimiento derivado de la glia, factor α y β de crecimiento transformante, y similares), citoquinas (por ejemplo, interferón α , interferón β , interferón γ , interleucina-2, interleucina-4, interleucina 12, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, linfotoxina), productos de genes suicidas (por ejemplo, timidina quinasa del virus del herpes simple, citosina desaminasa, toxina de la difteria, citocromo P450, desoxicidina quinasa, y factor de necrosis tumoral), proteínas que confieren resistencia a
60 un fármaco usado en la terapia del cáncer, productos génicos supresores del tumor (por ejemplo, p53, Rb, Wt-1, NF1, VHL, APC, y similares), y cualquier otro péptido o proteína que tenga un efecto terapéutico en un sujeto en necesidad del mismo.

Los péptidos o proteínas terapéuticos adicionales a modo de ejemplo incluyen los que se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad o dolencia incluyendo, pero sin limitarse a, fibrosis quística (y otras enfermedades del
65 pulmón), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos de la sangre, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia, y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (por ejemplo, Duchenne, Becker), enfermedad de Gau-

cher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina desaminasa, enfermedades de almacenamiento del glicógeno y otros defectos metabólicos, enfermedades degenerativas retinales (y otras enfermedades del ojo), y enfermedades de órganos sólidos (por ejemplo, cerebro, hígado, riñón, corazón).

La presente invención proporciona también vectores útiles como vacunas. Se conoce en la técnica el uso de parvovirus como vacunas (véanse, por ejemplo, Miyamura y col., (1994) Proc. Nat. Acad. Sci USA 91:8507; Patente de los Estados Unidos N° 5,916,563 de Young y col., documento 5.905.040 de Mazzara y col., Patente de los Estados Unidos N° 5.882.652, patente de los Estados Unidos N° 5.863.541 de Samulski y col.). Se puede presentar el antígeno en la cápsida del parvovirus, según se describe a continuación, para los vectores de parvovirus quiméricos y modificados. Alternativamente, se puede expresar el antígeno a partir de un ácido nucleico heterólogo introducido en un genoma de VAA recombinante y transportarse por los parvovirus inventivos. Se puede proporcionar cualquier inmunógeno de interés mediante el vector de parvovirus. Se conocen bien en la técnica los inmunógenos de interés e incluyen, pero no se limitan a, los inmunógenos del virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la gripe, las proteínas gag, los antígenos tumorales, los antígenos cancerosos, los antígenos bacterianos, los antígenos víricos, y similares.

Como alternativa adicional, la secuencia heteróloga de ácido nucleico puede codificar un péptido o proteína indicador (por ejemplo, una enzima) Se conocen en la técnica las proteínas indicadoras e incluyen, pero no se limitan a, Proteína Fluorescente verde, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, y similares.

Alternativamente, en las realizaciones particulares de la invención, el ácido nucleico de interés puede codificar un ácido nucleico de sentido contrario, una ribozima (por ejemplo, según se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.877.022), los ARN que efectúan el corte y empalme en trans mediado por el ayustosoma (Puttaraju y col., (1999) Nature Biotech. 17:246), u otros ARN no traducidos, tales como los ARN "guía" (Gorman y col., (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:4929; Patente de los Estados Unidos N°. 5.869.248 de Yuan y col.), y similares.

Excepto que se indique de otra manera, se pueden usar los procedimientos normalizados conocidos por las personas expertas en la técnica para la construcción de los genomas de VAAr, vectores de empaquetado transcomplementantes, células de empaquetado transfectadas de manera transitoria y estable según la presente invención. Las personas expertas en la técnica conocen dichas técnicas. Véanse, por ejemplo, SAMBROOK y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ª Ed. (Cold Spring Harbor, NY, 1989); F. M. AUSUBEL y col. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

I. Virus híbridos

Los vectores híbridos de parvovirus de la presente invención pueden superar algunas de las desventajas de los vectores de VAA para la liberación de ácidos nucleicos u otras moléculas en las células.

Un parvovirus "híbrido", según se usa en el presente documento, es un genoma de VAA encapsidado en el interior de una cápsida de parvovirus diferente (es decir, otra, extraña, exógena). Dicho de otra forma, un parvovirus híbrido tiene un genoma de parvovirus encapsidado en el interior de una cápsida de parvovirus diferente. Según se usa en el presente documento, por "diferente" se pretende que el genoma de VAA esté empaquetado en el interior de otra cápsida de parvovirus, por ejemplo, la cápsida de parvovirus es de otro serotipo de VAA o de un parvovirus autónomo.

Preferiblemente, el genoma de parvovirus es un genoma de VAA (preferiblemente un genoma de VAA recombinante). Se prefiere también que el genoma de VAA comprenda uno o más duplicado(s) terminal(es) invertido(s) de VAA según se describe a continuación. Normalmente, según se describe con más detalle a continuación, un genoma de VAA recombinante (VAAr) retendrá únicamente aquellos elementos requeridos en *cis* (por ejemplo, uno o más ITR de VAA), proporcionándose el resto del genoma (por ejemplo, los genes rep/cap) en *trans*.

En realizaciones particulares preferidas, la cápsida de parvovirus es una cápsida de VAA (es decir, un vector híbrido de VAA). Según esta realización, la cápsida de VAA empaqueta un genoma de VAA de un serotipo diferente (y preferiblemente, de un serotipo diferente procedente de uno o más ITR de VAA). Por ejemplo, se puede encapsidar un genoma de VAA recombinante de tipo 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 en el interior de una cápsida de VAA de tipo 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, con la condición de que la cápsida y el genoma de VAA (y preferiblemente de uno a más ITR de VAA) son de serotipos diferentes.

Los parvovirus híbridos ilustrativos según la presente invención son el genoma de VAA de tipo 2 empaquetado en el interior de una cápsida de VAA de tipo 1, 3, 4, 5, ó 6. En las realizaciones particulares preferidas, el parvovirus híbrido comprende una cápsida de VAA de tipo 3, tipo 4, o tipo 5 que empaqueta un genoma de VAA de tipo 2, más preferiblemente, una cápsida de VAA de tipo 3 o tipo 5 que empaqueta un genoma de tipo 2.

En otras realizaciones preferidas, un genoma de VAA de tipo 1, 3, 4, 5 ó 6 está empaquetado en el interior de una cápsida de VAA diferente (por ejemplo, un genoma de tipo 1 en una cápsida de tipo 2, 3, 4, 5, ó 6, y similar).

Son preferidos también los parvovirus híbridos de B19/VAA en los que un genoma de VAA (por ejemplo, un genoma de VAA de tipo 1, 2, 3, 4, 5 ó 6) está empaquetado en el interior de una cápsida de B19. Más preferiblemente, el parvovirus híbrido tiene una cápsida de B19 y un genoma de VAA de tipo 2.

ES 2 340 230 T3

Los parvovirus adicionales son híbridos en los que una cápsida de virus minute de ratón, parvovirus bovino, parvovirus canino, parvovirus de pollo, virus de la panleucopenia felina, parvovirus felino, o parvovirus de ganso empaqueta un genoma de VAA, más preferiblemente un genoma de VAA de tipo 2.

5 Los virus híbridos específicos incluyen los que tienen la secuencia de la cápsida codificada por el plásmido auxiliar de VAA2/4 que se proporciona en el Apéndice 1 (nucleótidos 2123 a 4341 de la SEC DE ID N°: 1). Esta secuencia codifica los genes rep de VAA2 y la cápsida de VAA4 en un esqueleto pBluescript. Se prefiere también que el parvovirus híbrido que tiene la secuencia de la cápsida que se proporciona por la SEC DE ID N°: 1 sea un genoma de VAA2. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos de la cápsida de VAA4 es sustancialmente homóloga a la secuencia de
10 nucleótidos que se proporciona como los nucleótidos 2123 a 4341 de la SEC DE ID N°: 1. Como alternativa adicional, la secuencia de nucleótidos de la cápsida de VAA4 codifica la secuencia de aminoácidos codificada por los nucleótidos 2123 a 4341 en la SEC DE ID N°: 1. El término “sustancialmente homóloga” es según se define en el presente documento a continuación.

15 Una de las limitaciones de los vectores VAA actuales para la liberación del gen es la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra VAA en el interior de la población humana. Por ejemplo, se estima que el 80% de los adultos son seropositivos para el VAA de tipo 2. En las realizaciones preferidas, la presente invención proporciona vectores de parvovirus híbridos que se pueden emplear ventajosamente para reducir (por ejemplo, disminuir, reducir, mitigar, y similares) una respuesta inmune en el sujeto que está siendo tratado. De esta manera, por ejemplo, un genoma de vector
20 de VAA de tipo 2 transporta una secuencia o secuencias heterólogas de ácido nucleico que se pueden empaquetar en el interior de una cápsida de VAA de tipo 3 y administrarse a un sujeto que es seropositivo para el VAA de tipo 2 y que no puede neutralizar el virus VAA de tipo 3.

Según este aspecto de la invención, se puede empaquetar un genoma de VAAr en el interior de cualquier cápsida no
25 homóloga de parvovirus para liberar a una célula, *in vitro* o *in vivo*. En las realizaciones preferidas, el genoma de VAA se empaqueta en el interior de una matriz de cápsidas no homólogas para superar los anticuerpos neutralizantes y/o evitar el desarrollo de una respuesta inmune. En las realizaciones particulares preferidas, se puede liberar el VAAr en el interior de una serie de partículas híbridas de virus, de tal manera que se presenta continuamente al sistema inmune un nuevo vector vírico. Esta estrategia permitirá la administración repetida sin aclaramiento inmune.

30 Una limitación adicional encontrada con los vectores de VAA se refiere al tropismo celular de estos virus. El tropismo natural de VAA es problemático debido a que VAA infecta una amplia gama de tipos de células y debido a que no presenta infectividad en otras células diana potenciales de interés (por ejemplo, células eritroides). Los parvovirus autónomos, en contraste, tienen un tropismo celular más estrecho. Las personas expertas en la técnica conocen los tropismos de los parvovirus autónomos particulares. Los tropismos celulares ilustrativos de los parvovirus autónomos incluyen: el virus B19 (células eritroides), el parvovirus canino (epitelio del intestino) MVM(p) (fibroblastos); y el parvovirus del ganso (revestimiento miocárdial del corazón). Además, los parvovirus autónomos presentan una gama más amplia de especies de huéspedes que VAA, cuyas características se pueden utilizar para desarrollar vectores de
35 VAA para la administración a bovinos, caninos, felinos, gansos, patos, y similares, por ejemplo, para tratamientos veterinarios. De esta manera, se puede utilizar el empaquetado en cruzado de los genomas de VAA en cápsidas de parvovirus autónomos según la presente invención para producir un vector vírico con un tropismo celular diferente que VAA.

Con respecto a los híbridos de VAA/VAA, todos los serotipos de VAA infectan una amplia gama de células huéspedes.
45 Sin embargo, existen diferencias en las velocidades de transducción del vector, sugiriendo que diferentes serotipos pueden usar diferentes receptores celulares. Adicionalmente, únicamente se observó competición limitada entre serotipos en los experimentos de unión, cuya observación indica además que los diferentes serotipos han evolucionado para usar distintos receptores (Mizukami y col., (1996) Virology 217: 124). Según esto, los parvovirus híbridos de la presente invención que empaquetan un genoma de VAA en una cápsida de VAA de un serotipo diferente proporcionan
50 también oportunidades para liberar vectores de VAA en una gama más amplia de tipos de células que los vectores de VAA actuales y/o para dirigir los vectores de VAA a las células diana específicas.

En las realizaciones preferidas, la partícula de parvovirus híbrido contiene un genoma de VAAr. Según se usa en el presente documento, el genoma de VAAr transporta al menos una secuencia heteróloga de ácido nucleico que se va
55 a liberar en una célula. Las personas expertas en la técnica apreciarán que el genoma de VAAr puede codificar más de una secuencia heteróloga de ácido nucleico (por ejemplo, dos, tres o más secuencias heterólogas de ácido nucleico), limitadas generalmente de manera única por la capacidad de empaquetado de la cápsida del virus. La(s) secuencia(s) heteróloga(s) de interés para uso según la presente invención son como se describe anteriormente.

Según se usa en el presente documento, una partícula de parvovirus híbrido recombinante abarca las partículas
60 de virus con cápsidas de parvovirus híbridos, quiméricos, dirigidos y/o modificados según se describe en el presente documento a continuación. Más aún, las personas expertas en la técnica comprenderán que la cápsida de parvovirus puede incluir otras modificaciones o mutaciones (por ejemplo, delección, inserción, mutaciones puntuales y/o sin sentido, y similares). Las personas expertas en la técnica apreciarán además que se pueden introducir incidentalmente mutaciones en el genoma de VAAr o la cápsida del parvovirus como resultado de la estrategia de clonación empleada.
65

El genoma de VAAr del parvovirus híbrido codifica preferiblemente al menos un duplicado terminal invertido de VAA (ITR), preferiblemente dos ITR de VAA, y más preferiblemente dos ITR homólogos de VAA, que flanquean la(s)

secuencia(s) heteróloga(s) de ácido nucleico que se va a liberar en la célula. El(los) ITR(s) de VAA pueden ser de cualquier VAA, prefiriéndose los tipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y prefiriéndose más el tipo 2. El término “duplicado terminal invertido” incluye las secuencias sintéticas que funcionan como un duplicado terminal invertido de VAA, tal como la “secuencia doble D” según se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.478.745 de Samulski y col. Se ha demostrado que únicamente se requiere una secuencia doble D de 165 pb en *cis* para la integración, replicación, y encapsidación específica del emplazamiento de las secuencias del vector. Los ITR de VAA según la presente invención no necesitan tener una secuencia ITR natural (por ejemplo, se puede alterar una secuencia natural mediante inserción, delección, truncamiento, o mutaciones sin sentido), siempre que ITR funcione para mediar en el empaquetado, la replicación, la integración del virus, y/o el rescate del provirus, y similares.

En los parvovirus híbridos según la presente invención, el(los) ITR de VAA es (son) diferente(s) de la cápsida del parvovirus. Más aún, si la cápsida es una cápsida de VAA, la cápsida y el(los) ITR son de diferentes serotipos de VAA. En las realizaciones preferidas, el(los) ITR de VAA es (son) de VAA de tipo 2 y la cápsida del parvovirus es una cápsida de VAA de tipo 3, 4, 6 ó 5, más preferiblemente una cápsida de VAA de tipo 3 ó 5. En las realizaciones alternativas preferidas, el parvovirus híbrido tiene una cápsida de B19 y el(los) ITR de VAA es (son) VAA de tipo 2.

Los genomas de VAAr pueden contener adicionalmente elementos de control de la expresión, tales como señales control de la transcripción/traducción, los orígenes de la replicación, las señales de poliadenilación, y los emplazamientos internos de entrada al ribosoma (IRES), promotores, potenciadores, y similares, asociados de manera operable con la(s) secuencia(s) heteróloga(s) de ácido nucleico que se va(n) a liberar en la célula. Las personas expertas en la técnica apreciarán que se puede usar una variedad de elementos promotores/potenciadores dependiendo del nivel y de la expresión específica de tejido deseados. El promotor/potenciador puede ser natural o extraño y puede ser una secuencia natural o una sintética. Por extraña, se pretende que la región del promotor/potenciador no se encuentre en el huésped natural en el que se introdujo la región del promotor/potenciador.

Los más preferidos son los promotores/potenciadores que son naturales en la célula o sujeto diana que se va a tratar. Se prefieren también los promotores/potenciadores que son naturales en la secuencia heteróloga de ácido nucleico. Se escoge el promotor/potenciador de tal manera que funcionará en la(s) célula(s) diana de interés. Se prefieren también los promotores/potenciadores de mamífero.

Se prefieren los elementos inducibles de control de la expresión en aquellas aplicaciones en las que es deseable proporcionar regulación sobre la expresión de la(s) secuencia(s) heteróloga(s) de ácido nucleico. Los elementos promotores/potenciadores inducibles para la liberación del gen son preferiblemente elementos promotores/potenciadores específicos de tejido, e incluyen los elementos promotores/potenciadores específicos de músculo (incluyendo el músculo cardíaco, el esquelético y/o el liso), específicos del tejido neural (incluyendo los específicos del cerebro), específicos del hígado, específicos de la médula ósea, específicos del páncreas, específicos del bazo, específicos de la retina, y específicos del pulmón. Otros elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen elementos inducibles por hormonas e inducibles por metales. Los elementos promotores/potenciadores inducibles a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un elemento Tet activo/inactivo, un promotor inducible por RU486, un promotor inducible por ecdisona, un promotor inducible por rapamicina, y un promotor de la metalotioneína.

En las realizaciones de la invención en las que la(s) secuencia(s) heteróloga(s) de ácido nucleico se transcribirán y a continuación se traducirán en las células diana, se requieren generalmente señales específicas de inicio para la traducción eficiente de las secuencias de codificación de la proteína insertada. Estas secuencias exógenas de control de la traducción, que pueden incluir el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes, pueden ser de una variedad de orígenes, naturales y sintéticas.

El genoma de VAA de los vectores de parvovirus inventivos puede incluir los genes que codifican las proteínas Cap y Rep de VAA. En las realizaciones preferidas, los genes que codifican al menos una de las proteínas Cap de VAA o al menos una de las proteínas Rep de VAA se borrarán del genoma de VAAr. Según esta realización, se pueden proporcionar las funciones de Cap y Rep en *trans*, por ejemplo, a partir de un vector de empaquetado transcomplementante o mediante una línea celular de empaquetado transformada de manera estable. En las realizaciones más preferidas, los genes que codifican todas las proteínas Cap de VAA o todas las proteínas Rep de VAA se borrarán del genoma de VAAr. Finalmente, en las realizaciones más preferidas, todos los genes cap de VAA y todos los genes rep de VAA se borrarán del vector de VAA. Esta configuración maximiza el tamaño de la(s) secuencia(s) heteróloga(s) de ácido nucleico que se pueden transportar por el genoma de VAA, simplifica los procedimientos de clonación, y minimiza la recombinación entre el genoma de VAAr y las secuencias que empaquetan rep/cap proporcionadas en *trans*.

En los parvovirus híbridos según la presente invención, los genes cap de parvovirus (si están presentes) pueden codificar las proteínas Cap a partir de cualquier parvovirus, preferiblemente un VAA. En contraste, los genes rep (si están presentes) serán normal y preferiblemente los genes rep de VAA. Se prefiere adicionalmente que los genes rep y el(los) duplicados(s) terminal(es) invertido(s) de VAA transportados por el genoma de VAA sean del mismo serotipo. Más aún, si los genes cap son genes cap de VAA, los genes rep serán preferiblemente de un serotipo diferente de VAA procedente de los genes cap de VAA.

Se pueden evaluar los genes/proteínas rep de diferentes serotipos de VAA para los que proporcionan el vector de título más alto en conexión con parvovirus híbridos particulares sin experimentación indebida. En las realizaciones

ES 2 340 230 T3

particulares preferidas los genes rep de VAA codifican una proteína Rep78 y/o Rep68 sensible a la temperatura según se describe por Gavin y col., (1999) J. Virology 73:9433.

Según se describe anteriormente, las proteínas Cap del parvovirus híbrido son diferentes de las del genoma de VAA (es decir, las proteínas Cap son tanto de un serotipo de VAA diferente como de un parvovirus autónomo). Adicionalmente, según se describe anteriormente, las proteínas Cap serán normal y preferiblemente diferentes de las procedentes de los genes rep (si están presentes).

Según esto, en las realizaciones particularmente preferidas, el parvovirus híbrido tienen una cápsida de VAA de tipo 3, 4 ó 5 y transporta un genoma de VAA de tipo 2 que incluye un(os) ITR de tipo 2. El genoma de VAA puede incluir adicionalmente los genes rep de VAA (preferiblemente de tipo 2) y los genes cap de VAA (preferiblemente, VAA de tipo 3, 4, ó 5, respectivamente). Normalmente, sin embargo, el genoma de VAA será un genoma de VAAr, y los genes rep y cap se borrarán del anterior. En una realización alternativa preferida, el parvovirus híbrido tiene una cápsida de B19 y transporta un genoma de VAA, más preferiblemente, un genoma de VAA de tipo 2, que incluye un(os) ITR de VAA. El genoma de VAA puede codificar opcionalmente codifican las proteínas Rep de VAA (preferiblemente VAA de tipo 2) y las proteínas de la cápsida de B19, pero preferiblemente es un genoma de VAAr que carece de estas secuencias.

La presente divulgación proporciona también secuencias y vectores de nucleótidos (incluyendo vectores de clonación y de empaquetado) que codifican los genomas de VAA y el(los) gen(es) cap de parvovirus y el(los) gen(es) rep de VAA, se borran a partir del genoma de VAA. Se pueden proporcionar las funciones Rep y Cap en trans mediante el(los) vector(es) empaquetado(s). Se pueden emplear múltiples vectores de empaquetado (por ejemplo, dos, tres, etc), pero normal y preferiblemente se proporcionan todas las funciones Rep y Cap mediante un vector de empaquetado único.

Los vectores de clonación y empaquetado pueden ser cualquier vector conocido en la técnica. Los vectores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores de ADN desnudos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) y vectores víricos. Los vectores víricos preferidos incluyen de VAA, adenovirus, herpesvirus, virus de Epstein-Barr (VEB), baculovirus, y vectores retrovíricos (por ejemplo, lenti-víricos).

La presente divulgación proporciona también células que contiene los vectores inventivos. La célula puede ser cualquier célula conocida en la técnica incluyendo células bacterianas, protozoarias, de levaduras, hongos, plantas y animales (por ejemplo, insectos, aviar, mamíferos).

Se proporcionan adicionalmente células de empaquetado transformadas de manera estable que expresan las secuencias que codifican el(los) gen(es) cap de parvovirus o el(los) gen(es) rep de VAA para producir los parvovirus híbridos inventivos. Se puede emplear cualquier célula conocida adecuada en la técnica para expresar el(los) gen(es) cap y/o rep de parvovirus. Se prefieren las células de mamíferos (por ejemplo, células HeLa). Se prefieren también las líneas celulares de empaquetado trans-complementante que proporcionarán funciones borradas procedentes de un virus auxiliar defectivo en la replicación, por ejemplo, células 293 u otras células E1a trans-complementantes.

En las realizaciones particulares preferidas, al menos uno de los genes rep o al menos uno de los genes cap, más preferiblemente todos los genes cap o todos los genes rep se integran de manera estable en el material genético de la célula de empaquetado y se expresan de la anterior. Normalmente, y lo más preferible, todos los genes cap de parvovirus y todos los genes rep de VAA se integran y expresan de manera estable por la célula de empaquetado.

Los genes cap y rep y las proteínas son como se describe anteriormente con respecto a los genomas de VAA híbridos. De esta manera el(los) vector(es) de empaquetado y/o la célula de empaquetado puede codificar los genes cap de cualquier parvovirus. Se prefieren los genes cap de B19, VAA de tipo 3, VAA de tipo 4 y VAA de tipo 5. Igualmente, el(los) vector(es) de empaquetado y/o la célula de empaquetado puede codificar los genes rep de cualquier parvovirus. Preferiblemente, sin embargo, los genes rep serán genes de VAA, más preferiblemente, genes rep de VAA de tipo 2, VAA de tipo 3, VAA de tipo 4, o VAA de tipo 5. Lo más preferible, los genes rep son genes rep de VAA de tipo 2. En las realizaciones particulares preferidas, las secuencias rep de VAA codifican una proteína Rep78 o Rep68 sensible a la temperatura como se describe por Gavin y col., (1999) J. Virology 73:9433.

Se puede impulsar la expresión de los genes cap y rep, si los transporta el genoma de VAAr, un vector de empaquetado, o se integran en el genoma de una célula de empaquetado por cualquier elemento promotor o potenciador conocido en la técnica, según se describe con más detalle anteriormente. Preferiblemente, los genes cap o rep (más preferiblemente ambos) se asocian de manera operable con los promotores de parvovirus. En las realizaciones más preferidas, los genes cap y los genes rep se asocian de manera operable con sus promotores auténticos (es decir, el promotor natural).

Un informe anterior indica que no se puede conseguir la expresión de los genes cap de parvovirus a partir del vector auxiliar híbrido de B19/VAA de tipo 2 usando promotores auténticos. Ponnazhagan y col., (1998) J. Virology 72:5224, intentaron generar un vector auxiliar para producir una cápsida B19 de parvovirus que empaquetaba un genoma de VAA de tipo 2. Estos investigadores informaron que el virus no se podía empaquetar cuando los genes cap en el vector auxiliar se impulsaban mediante cualquiera de los promotores p40 de VAA o p6 de B19 auténticos. Únicamente se

conseguía el empaquetado del virus satisfactoriamente cuando el promotor de CMV (un promotor fuerte) se sustituía por los promotores auténticos. Parece que la regulación natural de los genes *cap* estaba perturbada, y se restauró la expresión del gen *cap* únicamente separando las regiones de codificación de *rep* y *cap* y usando un promotor exógeno para impulsar la expresión del gen *cap*.

Igualmente, la estrategia de clonación propuesta por la Patente de los Estados Unidos N° 5.681.731 de Lebkowski y col., para generar virus híbridos que comprendían una cápsida de parvovirus autónomo que encapsidaba un genoma de VAAr (col. 15-16) fracasará en dar como resultado un virus empaquetado.

En contraste, la presente invención proporciona vectores híbridos de empaquetado y células de empaquetado en los cuales se pueden usar promotores de parvovirus, preferiblemente los promotores auténticos, para impulsar la expresión de los genes *cap* y *rep* de parvovirus par producir los parvovirus híbridos inventivos. No se han sucedido esfuerzos anteriores para crear construcciones de genes *cap/rep* de parvovirus híbridos usando promotores auténticos, al menos en parte, debido a que los investigadores fracasaron en preservar la integridad de los emplazamientos de corte y empalme requeridos para procesar apropiadamente los genes *rep*. Las presentes investigaciones han utilizado una estrategia de clonación sin soldadura (Stratagene EE.UU.) en la que se han preservado los emplazamientos de corte y empalme en el interior de los genes *rep*. Alternativamente, se puede usar la mutagénesis dirigida al emplazamiento (o técnicas similares) para restaurar los emplazamientos de corte y empalme en las construcciones de virus híbridos.

La presente invención abarca adicionalmente los procedimientos de producción de los parvovirus híbridos inventivos. Se pueden producir las partículas de parvovirus híbrido según la invención introduciendo un genoma de VAA que se va a replicar y empaquetar en una célula permisiva o de empaquetado, según los términos que se entienden en la técnica (por ejemplo, una célula "permisiva" puede estar infectada o transducida por el virus; una célula de "empaquetado" es una célula transformada de manera estable que proporciona funciones auxiliares). Preferiblemente, el genoma de VAA es un genoma de VAAr que codifica una(s) secuencia(s) heteróloga(s) de ácido nucleico que está(n) flanqueada(s) por al menos un ITR de VAA. Los genomas de VAAr, los ITR de VAA, y las secuencias heterólogas de ácido nucleico son todos como se describe con más detalle anteriormente en el presente documento. Se puede proporcionar el genoma de VAA a la célula mediante cualquier vector adecuado, según se describe anteriormente en el presente documento.

Se puede emplear cualquier procedimiento para introducir el vector que transporta el genoma de VAA en la célula permisiva, incluyendo, pero sin limitarse a, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, liposomas catiónicos o aniónicos, y liposomas en combinación con una señal de localización nuclear. En las realizaciones en las que se proporciona el genoma de VAA mediante un vector vírico, se pueden usar procedimientos normalizados para producir la infección vírica.

Se puede emplear cualquier célula permisiva o de empaquetado adecuada conocida en la técnica para producir vectores de VAA. Se prefieren las células de mamíferos. Se prefieren también las líneas celulares de empaquetado trans-complementantes que proporcionan funciones borradas a partir de un virus auxiliar defectivo en la replicación, por ejemplo, células 293 u otras células E1 a trans-complementantes.

El genoma de VAA puede contener algunos o todos los genes *cap* y *rep* de VAA, según se describe en el presente documento. Preferiblemente, sin embargo, se proporcionan algunas o todas las funciones de *cap* y *rep* *en trans* introduciendo un(os) vector(es) de empaquetado, según se describe anteriormente, en la célula. Alternativamente, la célula es una célula de empaquetado que está transformada de manera estable para expresar los genes *cap* y/o *rep*. Los vectores de empaquetado y las células de empaquetado son como se describe anteriormente en el presente documento.

Adicionalmente, se proporcionan las funciones del virus auxiliar para el vector de VAA para propagar nuevas partículas de virus. Como virus auxiliares pueden servir adenovirus y el virus del herpes simple para VAA. Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS y col., VIROLOGY, volumen 2, capítulo 69 (3ª ed., Lippincott-Raven Publishers). Los virus auxiliares a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, virus del herpes simple (VHS), varicela zoster, citomegalovirus, y virus de Epstein-Barr. La multiplicidad de la infección (MOI) y la duración de la infección dependerán del tipo de virus usado y de la línea celular de empaquetado empleada. Se puede emplear cualquier vector auxiliar adecuado. Preferiblemente, el(los) vector(es) auxiliar(es) es (son) un(os) plásmido(s), por ejemplo, según se describe por Xiao y col., (1998) J. Virology 72:2224. Se puede introducir el vector en la célula de empaquetado mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, según se describe anteriormente.

Se pueden producir vectores de VAA mediante cualquier procedimiento adecuado en la técnica. La producción tradicional de vectores de VAAr implica la transfección simultánea de un vector *rep/cap* que codifica el vector auxiliar de VAA y el de VAA en células humanas infectadas con adenovirus (Samulski y col., (1989) J. Virology 63:3822). En condiciones optimizadas, este procedimiento puede dar como resultado hasta 10⁹ unidades infecciosas de VAAr por ml. Un inconveniente de este procedimiento, sin embargo, es que esta da como resultado la producción simultánea de adenovirus natural contaminante en preparaciones de VAAr. Debido a que se conocen diversas proteínas de adenovirus (por ejemplo, fibra, hexón, etc) para producir una respuesta inmune de los linfocitos T citotóxico (CTL) en seres humanos (Yang and Wilson, (1995) J. Immunol. 155:2564; Yang y col., (1995) J. Virology 69:2004; Yang y col., (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:4407), esto representa un inconveniente significativo cuando se usan estas preparaciones de VAAr (Monahan y col., (1998) Gene Therapy 5:40).

Se puede obtener el virus auxiliar de depósitos de vectores de VAA libres de contaminantes mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, VAA y el virus auxiliar se pueden diferenciar fácilmente basándose en el tamaño. Se puede separar también VAA aparte del virus auxiliar basándose en la afinidad por un sustrato de heparina (Zolotukhin y col. (1999) *Gene Therapy* 6:973). Preferiblemente, los virus auxiliares defectivos borrados en la replicación se usan de tal manera que cualquier virus auxiliar contaminante no es competente en la replicación. Como alternativa adicional, se puede emplear una expresión génica tardía que carezca de adenovirus auxiliar, ya que únicamente se requiere la expresión génica temprana de un adenovirus para mediar en el empaquetado del virus de VAA. Se conocen en la técnica adenovirus mutantes defectivos para la expresión génica tardía (por ejemplo los adenovirus mutantes ts100K y ts149).

Un procedimiento preferido para proporcionar funciones auxiliares mediante adenovirus infeccioso emplea un miniplásmido de adenovirus no infeccioso que transporta todos los genes auxiliares requeridos para la producción eficiente de VAA (Ferrari y col., (1997) *Nature Med.* 3:1295; Xiao y col., (1998) *J. Virology* 72:2224). Esta solución obvia la necesidad de llevar a cabo transfecciones simultáneas con adenovirus (Holscher y col., (1994), *J. Virology* 68:7169; Clark y col., (1995) *Hum. Gene Ther.* 6:1329; Trempe y Yang, (1993), in, *Fifth Parvovirus Workshop*, Crystal River, FL).

Se han descrito otros Procedimientos para producir depósitos de VAAr, entre los que se incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos que dividen los genes rep y cap en casetes de expresión separados para evitar la generación de un VAA competente en la replicación (véase, por ejemplo, Allen y col., (1997) *J. Virol.* 71:6816), los procedimientos que emplean líneas celulares de empaquetado (véase, por ejemplo, Gao y col., (1998) *Human Gene Therapy* 9:2353; Inoue y col., (1998) *J. Virol.* 72:7024), y otros sistemas libres del virus auxiliar (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.945.335 de Colosi).

Según esto, se proporcionan a una célula el genoma de VAA que se va a empaquetar, los genes cap de parvovirus, los genes rep de VAA, y las funciones auxiliares (por ejemplo, una célula permisiva o de empaquetado) para producir partículas de VAA que transportan el genoma de VAA. La expresión combinada de los genes rep y cap codificados por el genoma de VAA y/o el(los) vector(es) de empaquetado y/o la célula de empaquetado transformada de manera estable da como resultado la producción de un parvovirus híbrido en el que una cápsula de parvovirus encapsida un genoma de VAA. Se permiten ensamblar las partículas de parvovirus híbrido en el interior de la célula, y se recuperan a continuación mediante cualquier procedimiento conocido por las personas expertas en la técnica.

Se pueden emplear los reactivos y procedimientos que se dan a conocer para producir depósitos de título alto de los vectores de parvovirus inventivos. Preferiblemente, el depósito de parvovirus tiene un título de al menos aproximadamente 10^5 unidades de transducción (ut)/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 10^6 ut/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 10^7 ut/ml, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 10^8 ut/ml, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 10^9 ut/ml, adicionalmente aún más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{10} ut/ml, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 10^{11} ut/ml, o más.

Dicho de otra forma, el depósito de parvovirus tiene un título de al menos aproximadamente 1 ut/célula, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 ut/célula, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 20 ut/célula, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 50 ut/célula, aún todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 100 ut/célula, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 250 ut/célula, lo más preferible al menos aproximadamente 500 ut/célula, o incluso más.

Se prefiere también que se produzca el parvovirus en títulos esencialmente naturales.

Las personas expertas en la técnica apreciarán que la presente invención abarca también los vectores de parvovirus híbrido que contienen cápsidas quiméricas y/o cápsidas que se han modificado mediante la inserción de una(s) secuencia(s) de aminoácidos en la cápsida para conferir tropismos alterados u otras características, cada una de las cuales se discute con más detalle a continuación. Las cápsidas de virus pueden incluir también otras modificaciones, por ejemplo, delección, inserción, mutaciones puntuales y/o sin sentido, y similares.

Las personas expertas en la técnica apreciarán además que se pueden introducir mutaciones incidentalmente en los genes cap y/o rep como resultado de la estrategia de clonación concreta empleada. Por ejemplo, la construcción de secuencias que codifican los genomas de parvovirus híbridos según se describe anteriormente pueden dar como resultado genes rep quiméricos (y proteínas) debido al solapamiento de las secuencias rep y cap (por ejemplo, los genes cap y el extremo 3' de los genes rep pueden ser VAA de tipo 3, y el resto de los genes rep puede ser VAA de tipo 2). Según se describe anteriormente, los genes rep quiméricos de VAA en los que la región 3' se deriva de un parvovirus autónomo que generalmente no funcionan como señales de corte y empalme no están conservados entre VAA y el parvovirus autónomo, a no ser que se emplee la mutagénesis dirigida al emplazamiento, o una técnica similar, para restaurar los emplazamientos de corte y empalme en las construcciones de virus híbrido.

II. Virus quiméricos

La presente invención proporciona además el descubrimiento de que los parvovirus quiméricos pueden ser construcciones que poseen estructuras y características de cápsida única. La estrategia descrita anteriormente se centra en alterar la estructura y la función del virus VAA mediante empaquetado cruzado de los genomas de VAA en el interior

de diferentes cápsidas de parvovirus. Se puede conseguir diversidad adicional en las partículas de virus sustituyendo una porción de la cápsida del parvovirus con una porción de una(s) cápsida(s) de un(os) parvovirus diferente(s) (es decir, otro o extraño). Alternativamente, se puede insertar una porción de una(s) cápsida(s) de parvovirus diferente(s) (es decir, más bien que sustituirse) en la cápsida del parvovirus para crear una cápsida de parvovirus quimérico. Se dan a conocer también vectores, células de empaquetado, y los procedimientos para construir partículas de parvovirus quiméricos. Los parvovirus quiméricos dados a conocer en el presente documento pueden poseer nuevas propiedades antigénicas, capacidades de empaquetado, y/o tropismos celulares. Las cápsidas y las partículas de virus quiméricos de la invención son también útiles para aumentar los anticuerpos específicos de quimeras contra las novedosas estructuras de las cápsidas.

Los parvovirus, VAA, y los genomas de VAAr son como se describe anteriormente con respecto a los parvovirus híbridos.

Según se usa en el presente documento, un parvovirus “quimérico” es un parvovirus en el que se inserta o sustituye una(s) región(es) extraña(s) de la cápsida (es decir, exógena) de diferentes parvovirus en la cápsida del parvovirus. Preferiblemente la región extraña de la cápsida se sustituye por una de las regiones naturales de la cápsida de parvovirus. En las realizaciones particulares, la región extraña de la cápsida se intercambia por la región homóloga de la cápsida en el interior de la cápsida de parvovirus. Se prefiere también que la cápsida de parvovirus sea una cápsida de VAA. Según esta realización, la cápsida de VAA puede ser de cualquier serotipo de VAA (por ejemplo, tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4, tipo 5, tipo 6, etc, según se describe anteriormente). Más preferiblemente, la cápsida de VAA es una cápsida de VAA de tipo 2, tipo 3, tipo 4, o tipo 5, lo más preferible una cápsida de VAA de tipo 2.

Las personas expertas en la técnica apreciarán que el parvovirus quimérico puede ser adicionalmente un parvovirus híbrido (como se describe anteriormente) o puede ser un parvovirus dirigido, o modificado de otra manera (como se describe a continuación). Las personas expertas en la técnica apreciarán además que debido al solapamiento en las secuencias que codifican las proteínas de la cápsida del parvovirus, una inserción o sustitución única puede afectar a más de una subunidad de la cápsida.

La región extraña de la cápsida del parvovirus puede ser de cualquier parvovirus (es decir, un parvovirus o parvovirus autónomo) según se describe anteriormente. Preferiblemente, la región extraña de la cápsida es del parvovirus B19 humano o del VAA de tipo 3, tipo 4, o tipo 5.

La región extraña de la cápsida del parvovirus puede constituir toda o sustancialmente toda de una(s) subunidad(es) de la cápsida (es decir, la región, por ejemplo de las subunidades Vp1, Vp2 y Vp3 de VAA o de las subunidades Vp1 y Vp2 del virus B19) o una porción de una subunidad de la cápsida. Inversamente, se puede insertar o sustituir más de una subunidad extraña de la cápsida en la cápsida del parvovirus. Igualmente, se puede sustituir una porción de una subunidad de la cápsida de parvovirus o una o más subunidades de la cápsida de parvovirus con una o más subunidades extrañas de la cápsida, o una porción de las mismas. Además, la cápsida quimérica de parvovirus puede contener inserciones y/o sustituciones en más de un emplazamiento en el interior de la cápsida. Según esta forma de realización, se pueden derivar múltiples inserciones/sustituciones de más de un parvovirus (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más). Generalmente, se prefiere que esté retenida al menos una subunidad procedente de la cápsida del parvovirus en la cápsida quimérica, aunque no se requiere esto.

En las realizaciones particulares, la región extraña de la cápsida de parvovirus que se inserta o sustituye en la cápsida del parvovirus natural tiene al menos aproximadamente 2, 5, 10, 12, 15, 20, 30, 50, ó 100 aminoácidos de longitud.

Los parvovirus quiméricos inventivos contienen un genoma de VAA, más preferiblemente un genoma de VAA recombinante. Se prefieren también las realizaciones en las que el genoma de VAA está empaquetado en el interior de una cápsida quimérica de VAA del mismo serotipo. Son más preferidos los genomas de VAA de tipo 2 con respecto a la composición a la cápsida quimérica de parvovirus.

En las realizaciones preferidas de la invención, el parvovirus quimérico comprende una cápsida de VAA, más preferiblemente una cápsida de VAA de tipo 2, en la que se ha sustituido una región de la cápsida procedente de un parvovirus B19 por una de las regiones de la cápsida de VAA. En otras realizaciones preferidas, el parvovirus quimérico comprende una cápsida de VAA (más preferiblemente una cápsida de VAA de tipo 2) en la que la subunidad Vp3 de la cápsida de VAA se ha sustituido por la subunidad Vp2 de B19.

En realizaciones alternativas preferidas, el parvovirus quimérico comprende una cápsida de VAA (preferiblemente de tipo 2) en la que las subunidades Vp1 y Vp2 están sustituidas por la subunidad Vp1 de un parvovirus B19.

En otras realizaciones preferidas, el parvovirus quimérico comprende una cápsida de VAA de tipo 2 en la que se ha sustituido la subunidad Vp1 de tipo 2 por la subunidad Vp1 procedente de una cápsida de VAA de tipo 1, 3, 4, 5, ó 6, preferiblemente, una cápsida de tipo 3, 4, ó 5. Alternativamente, el parvovirus quimérico tiene una cápsida de VAA de tipo 2 en la que se ha sustituido la subunidad Vp2 de tipo 2 por la subunidad Vp2 procedente de una cápsida de VAA de tipo 1, 2, 4, 5, ó 6, preferiblemente una cápsida de tipo 3, 4, ó 5. Igualmente se prefieren los parvovirus quiméricos en los que se sustituye la subunidad Vp3 procedente de un VAA de tipo 1, 3, 4, 5 ó 6 (más preferiblemente, tipo 3, 4 ó 5) por la subunidad Vp3 de una cápsida de VAA de tipo 2. Como alternativa adicional, se prefieren los parvovirus

ES 2 340 230 T3

quiméricos en los que se han sustituido dos de las subunidades de VAA de tipo 2 por las subunidades procedentes de un VAA de un serotipo diferente (por ejemplo, VAA de tipo 1, 3, 4, 5 ó 6). En los parvovirus quiméricos a modo de ejemplo según esta realización, las subunidades Vp1 y Vp2, o las Vp1 y Vp3, o las Vp2 y las Vp3 de una cápsida de VAA de tipo 2 están sustituidas por las subunidades correspondientes de un VAA de serotipo diferente (por ejemplo, VAA de tipo 1, 3, 4, 5 ó 6). Igualmente, en otras realizaciones preferidas, el parvovirus quimérico tiene una cápsida de VAA de tipo 1, 3, 4, 5 ó 6) preferiblemente, una cápsida del tipo 2, 3 ó 5) en la que una o las dos subunidades se han sustituido con aquellas procedentes de un VAA de un serotipo diferente, según se describe anteriormente para el VAA de tipo 2.

En otras realizaciones adicionalmente preferidas, se puede sustituir la subunidad menor de un parvovirus con cualquier subunidad menor de otro parvovirus (por ejemplo, se puede sustituir Vp2 de VAA de tipo 2 con Vp1 procedente de VAA de tipo 3; se puede sustituir Vp1 de B19 por Vp1 y/o Vp2 de VAA). Igualmente, se puede sustituir la subunidad mayor de la cápsida de un parvovirus con la subunidad mayor de la cápsida de otro parvovirus.

Las secuencias de nucleótidos de las cápsidas quiméricas específicas incluyen aquellas codificadas por el plásmido auxiliar que se proporcionan en el Apéndice 2 (nucleótidos 2133 a 4315 de la SEC DE ID N°: 2). Esta secuencia contiene las secuencias que codifican rep de VAA2, la mayor parte de las secuencias que codifican Vp1 y Vp3 de VAA2, y la totalidad de las secuencias que codifican Vp2 de VAA4 y algunas de las secuencias que codifican Vp1 y Vp3 de VAA4 en un esqueleto pBluescript. Preferiblemente, el parvovirus quimérico que tiene la cápsida codificada por el auxiliar que se proporciona en la SEC DE ID N°: 2 transporta un genoma de VAA2.

Alternativamente, la secuencia de nucleótidos de la cápsida quimérica es sustancialmente homóloga con la secuencia que codifica la cápsida que se proporciona como los nucleótidos 2133 a 4315 de la SEC DE ID N°: 2. Como alternativa adicional, la secuencia de nucleótidos de la cápsida quimérica codifica la misma secuencia de aminoácidos que los nucleótidos 2133 a 4315 de la SEC DE ID n°: 2. El término “sustancialmente homóloga” es como se define en el presente documento a continuación.

La presente invención proporciona también el descubrimiento de que los parvovirus quiméricos pueden generar estructuras de cápsida única que no se asemejan a las cápsidas constituyentes del parvovirus. Por ejemplo, las presentes investigaciones han descubierto que las quimeras de B19/VAA de tipo 2, en las que se ha sustituido la subunidad Vp3 de VAA de tipo 2 por la subunidad Vp2 de un virus B19 humano, dan como resultado la partícula de 23-28 nm esperada (normal para el VAA natural) y una novedosa partícula de 33-38 nm. Las partículas más grandes estuvieron presentes en la misma densidad que las partículas de 23-28 nm en un gradiente isopícnico de cesio.

Aunque no se desea mantener cualquier teoría particular de la invención, estos resultados sugieren que esta partícula se forma cambiando el número de triangulación de $T = 1$ a $T = 3$, para dar como resultado una partícula más grande que contiene 180 copias del componente mayor de la cápsida en vez de 60. Esta novedosa partícula puede empaquetar genomas más grandes que los naturales debido a su aumento de tamaño. En realizaciones particulares preferidas, la cápsida de parvovirus quimérico B19/VAA de tipo 2 (Vp2 de B19 intercambiada por Vp3 de VAA2) tiene la secuencia que se proporciona como SEC DE ID N° 3 (Apéndice 3).

La presente divulgación proporciona además cápsidas y parvovirus quiméricos de B19/VAA que tienen estructuras de cápsidas más grandes que los naturales (por ejemplo, más grandes de aproximadamente 28 nm, 30 nm, 32 nm, 34 nm, 36 nm, 38 nm, 40 nm o más de diámetro). Dicho de otra forma, la presente divulgación proporciona cápsidas y parvovirus quiméricos de B19/VAA con estructuras de cápsidas que contienen más número de subunidades de cápsida que los de los naturales (por ejemplo, mayores de aproximadamente 60 subunidades de cápsida). Como declaración alternativa adicional, la presente divulgación proporciona cápsidas y parvovirus de B19/VAA que empaquetan eficazmente más genomas que los naturales (por ejemplo, mas de aproximadamente 4,8 kb, 5,0 kb, 5,2 kb, 5,4 kb, 5,6 kb, 5,8 kb, 6,0 kb, 6,2 kb, 6,4 kb, 6,6 kb, 6,8 kb o más). Preferiblemente, los genomas más grandes se empaquetan eficazmente para producir depósitos víricos que tienen los títulos descritos anteriormente en el presente documento.

Se prefiere también que las quimeras de B19/VAA tengan propiedades antigénicas alteradas. En particular, se prefiere que las quimeras de B19/VAA se puedan administrar a un sujeto que tiene anticuerpos contra el serotipo de VAA sin aclaramiento inmune, es decir, los anticuerpos específicos del serotipo de VAA no reconocen la quimera.

En otra realización preferida, la secuencia de nucleótidos de la cápsida quimérica de B19/VAA es sustancialmente homóloga a la secuencia que se proporciona como SEC DE ID N°: 3 y codifica una cápsida quimérica de parvovirus. Se pretende que esta definición incluya los VAA de otros serotipos y los virus B19 no humanos. Según se usa en el presente documento, las secuencias que son “sustancialmente homólogas” son al menos el 75% y más preferiblemente son 80%, 85%, 90%, 95%, o incluso 99% homólogas o más.

Se conocen bien en la técnica las condiciones de hibridación con elevada restricción que permiten hibridarse a las secuencias homólogas de nucleótidos. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la hibridación de las secuencias homólogas de nucleótidos para hibridarse con la secuencia que se proporciona con la SEC DE ID N°. 3 en formamida al 25%, 5X SSC, 5X Solución de Denhardt, con 100 µg/ml de ADN de cadena única y sulfato de dextrano al 5% a 42°C, con condiciones de lavado de formamida al 25%, 5X SSC, SDS al 0,1% a 42°C durante 15 minutos, para permitir la hibridación de las secuencias de aproximadamente un 60% de homología. Se representan condiciones más restrictivas mediante un lavado restrictivo de NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M, SDS al 0,1% a 60° o incluso 70°C

usando un ensayo normalizado de hibridación *in situ*. (Véase SAMBROOK Y COL., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (2ª ed. 1989)).

En otras realizaciones particulares, se inserta o sustituye una región(es) no conservada de un parvovirus, preferiblemente se sustituye en otra cápsida de parvovirus. Preferiblemente se sustituye una región(es) no conservada por la misma (es decir, la homóloga) procedente de un parvovirus diferente. Las características específicas del parvovirus (que incluyen el serotipo específico de VAA) se asocian igualmente con dichas regiones no conservadas. Es también probable que las regiones no conservadas puedan tolerar mejor las alteraciones. En las realizaciones particulares, las regiones de bucle externo de las subunidades mayores de la cápsida del parvovirus se intercambian entre dos parvovirus, más preferiblemente un VAA y un parvovirus, aún más preferiblemente entre dos VAA de diferentes serotipos.

Con respecto particular al VAA de tipo 2, aunque no se ha resuelto la estructura cristalina de este virus, se han realizado correlaciones estructurales basadas en la secuencia de la información. Las correlaciones estructurales sugieren que la subunidad Vp3 del VAA de tipo 2 tiene 8 motivos de barril β , y que estos motivos se separan por regiones de bucles externos (Chapman y col., Virology 194:419). Recientemente, Muramatsu y col., (1996) Virology 221:208 han determinado la secuencia de VAA de tipo 3. La homología de aminoácidos entre Vp3 de VAA de tipo 2 y VAA de tipo 3 es del 89%, con la región definida como 3/4 de bucle que tiene una homología del 70% (Id.). Adicionalmente, VAA de tipo 3 no se une con el mismo receptor como VAA de tipo 2 (Mizukami y col., Virology 217:124). Las secuencias divergentes de aminoácidos en los bucles 3 y 4 pueden explicar las diferencias en los receptores celulares usados por el VAA de tipo 2 y el VAA de tipo 3, y las disparidades resultantes en el tropismo celular. Según esto, en realizaciones preferidas de la presente invención, las partículas quiméricas de las cuales está construido el bucle 3/4, o una porción de las mismas, del VAA de tipo 2, se intercambian por el bucle 3/4 del VAA de tipo 3, o viceversa.

En otras realizaciones, el parvovirus quimérico comprende una cápsida de VAA de tipo 2 en cuyo bucle 1, 2, 3 y/o 4, de la subunidad Vp3 se ha sustituido por la(s) región(es) bucle correspondiente(s) de un VAA de un serotipo diferente (por ejemplo, de tipo 1, 3, 4, 5 ó 6). En las realizaciones ilustrativas, la región del bucle 2-4 de la subunidad Vp3 del VAA de tipo 2 se sustituye por la región del bucle 2-4 de un virus de tipo 3 o tipo 4.

Igualmente, en otras realizaciones preferidas, el parvovirus quimérico comprende una cápsida de VAA de tipo 1, 3, 4, 5 ó 6 en la cual la región del bucle 1, 2, 3 y/o 4 está sustituida por la correspondiente región de un serotipo de VAA diferente. Las realizaciones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, parvovirus quiméricos que comprenden una cápsida de VAA de tipo 3 o tipo 4 en la cual, la región del bucle 2-4 de la subunidad Vp3 está sustituida por la región del bucle 2-4 del VAA de tipo 2.

La presente invención proporciona además parvovirus quiméricos que comprenden una cápsida de VAA en la cual una(s) región(es) del bucle en la subunidad Vp3 mayor está sustituida por una(s) región(es) del bucle, (preferiblemente una(s) región(es) del bucle correspondiente) procedente(s) de la subunidad mayor de un parvovirus autónomo.

La secuencia de nucleótidos de las cápsidas quiméricas específicas incluye aquellas que tienen la secuencia de la cápsida codificada por el plásmido auxiliar que se proporciona en el Apéndice 5 (nucleótidos 2133 a 4342 de la SEC DE ID N°: 5). Esta secuencia contiene las secuencias de codificación de rep de VAA2, la mayor parte de las secuencias que codifican la cápsida de VAA2, con la excepción de que se sustituyeron los bucles 2-4 procedentes de la subunidad Vp3 de VAA2 con la región correspondiente procedente de VAA3, en un esqueleto pBluescript.

Alternativamente, la secuencia de nucleótidos de la cápsida quimérica es sustancialmente homóloga a la secuencia que proporciona los nucleótidos 2133 a 4342 de la SEC DE ID N°: 5. Como alternativa adicional, la secuencia de nucleótidos de la cápsida quimérica tiene la misma secuencia de aminoácidos que la cápsida codificada por los nucleótidos 2133 a 4342 de la SEC DE ID N°: 5. El término “sustancialmente homóloga” es según se define anteriormente en el presente documento.

Se pueden construir parvovirus quiméricos como enseña el presente documento o mediante los procedimientos normalizados conocidos en la técnica. Igualmente, las personas expertas en la técnica pueden evaluar los parvovirus quiméricos generados de esta manera para el ensamblaje, empaquetado, tropismo celular, y similares, según se describe en el presente documento o mediante los procedimientos normalizados conocidos en la técnica, sin experimentación indebida.

Otro aspecto de la presente invención es una proteína quimérica de cápsida de parvovirus (preferiblemente una proteína de cápsida Vp1, Vp2 o Vp3 de VAA) con al menos una región de la cápsida procedente de otro(s) parvovirus insertados o sustituidos en la anterior (preferiblemente, sustituidos). La introducción de la proteína extraña de la cápsida en una cápsida de parvovirus proporciona características alteradas (por ejemplo, inmunógenas, tropismo, etc) a una cápsida o partícula de virus (preferiblemente una cápsida o partícula de parvovirus) que incorpora la proteína quimérica de la cápsida de parvovirus. Alternativamente, la proteína quimérica de la cápsida de parvovirus puede facilitar la detección o la purificación de una cápsida o partícula de virus (preferiblemente una cápsida o partícula de parvovirus) que incorpora quimérica de la cápsida de parvovirus. En las realizaciones particulares preferidas, se pueden alterar las propiedades antigénicas de una cápsida o partícula de VAA de un serotipo particular (por ejemplo, cambiarse o modificarse) o disminuirse (por ejemplo, reducirse o mitigarse) mediante la incorporación de la región quimérica de la cápsida de parvovirus para la región natural de la cápsida. Según esta realización, se pueden usar

proteínas quiméricas de la cápsida para obviar o reducir el aclaramiento inmune en sujetos que tienen inmunidad contra el serotipo de la cápsida o partícula de VAA (por ejemplo, para permitir múltiples administraciones de virus) Se pueden evaluar los cambios o las reducciones en las propiedades antigénicas, por ejemplo, en la comparación de una cápsida o partícula de VAA que es idéntica excepto por la presencia de la proteína quimérica de la cápsida del parvovirus.

La presente divulgación abarca también estructuras de cápsidas quiméricas vacías de parvovirus. Se pueden usar cápsidas vacías para la presentación o liberación de péptidos o proteínas (por ejemplo, antígenos para producir una respuesta inmune), ácidos nucleicos, u otros compuestos (véanse, por ejemplo, Miyamura y col., (1994) Proc. Nat. Acad. Sci USA 91:8507; Patente de los Estados Unidos N° 5.916.563 de Young y col., 5.905.040 de Mazzara y col., Patente de los Estados Unidos N° 5.882.652, Patente de los Estados Unidos N° 5.863.541 de Samulski y col.;). Se pueden producir cápsidas vacías mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (véase por ejemplo, id.).

Los parvovirus y las cápsidas quiméricas de la invención encuentran uso adicional en el aumento de anticuerpos contra las novedosas estructuras de las cápsidas. Se pueden producir los anticuerpos mediante los procedimientos que conocen las personas expertas en la técnica.

La presente divulgación proporciona también vectores de clonación, vectores de empaquetado transcomplementantes, células de empaquetado y los procedimientos para producir las partículas de parvovirus quiméricos que se dan a conocer en el presente documento. En general, los vectores, las células de empaquetado, y los procedimientos para producir parvovirus quiméricos son como se describe anteriormente con respecto a los parvovirus híbridos. Adicionalmente, al menos uno de los genes cap (codificado por el genoma de VAAr, un(os) vector(es) de empaquetado, o la célula de empaquetado) ha insertado en el anterior una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos extraña procedente de un parvovirus no homólogo (según se describe anteriormente).

III. Parvovirus dirigidos

Un aspecto adicional de la presente divulgación son los vectores de parvovirus que comprenden una cápsida de parvovirus y un genoma de VAA recombinante, en el que se ha insertado o sustituido una secuencia diana exógena en la cápsida del parvovirus. El vector del parvovirus está preferiblemente dirigido (es decir, dirigido a un tipo o tipos de células concretos) mediante la sustitución o la inserción de la secuencia diana exógena en la cápsida de parvovirus. Dicho de otra forma, la secuencia diana exógena confiere preferiblemente un tropismo alterado en el parvovirus. Como declaración alternativa adicional, la secuencia diana aumenta la eficacia de liberación del vector dirigido a una célula.

Según se describe con más detalle a continuación, la secuencia diana exógena puede ser una secuencia de cápsida de virus (por ejemplo, una secuencia de la cápsida de un parvovirus autónomo), la secuencia de la cápsida de VAA, o cualquier otra secuencia de cápsida vírica que dirige la infección del parvovirus a un(os) tipo(s) de células concretos. Como alternativa, la secuencia exógena de aminoácidos puede codificar cualquier péptido o proteína que dirija la entrada de los vectores de parvovirus en una(s) célula(s). En las realizaciones preferidas, la cápsida de parvovirus es una cápsida de VAA, más preferiblemente, una cápsida de VAA de tipo 2.

Un tropismo “alterado” según se usa en el presente documento, incluye reducciones o potenciamentos de la infectividad con respecto a un(os) tipo(s) concreto(s) de célula(s) en comparación con el parvovirus natural que carece de la(s) secuencia(s) diana. Un tropismo “alterado” abarca también la creación de un nuevo tropismo (es decir, el parvovirus no infectaría un(os) tipo(s) concreto(s) de célula(s) en una extensión significativa o, alternativamente, detectable, en ausencia de la secuencia exógena de aminoácidos). Alternativamente, un “tropismo alterado” puede dirigirse a un vector diana dirigido del parvovirus en un(os) concreto(s) tipo(s) de célula(s) en comparación con el parvovirus natural, pero se pueden infectar también normalmente las células diana mediante el parvovirus natural (por ejemplo, un tropismo restringido). Como alternativa adicional, un tropismo “alterado” se refiere a una liberación más eficiente de un parvovirus dirigido en comparación con el parvovirus natural (por ejemplo, una Multiplicidad de infección reducida, “MOI”).

El término “reducción en la infectividad”, según se usa en el presente documento, se pretende que abarque una abolición del tropismo natural, así como una disminución en el tropismo o la infectividad natural hacia un(os) tipo(s) concreto(s) de célula(s). La infectividad disminuida puede ser de un 25%, 50%, 75%, 90%, 95%, 99%, o más de disminución en la infectividad con respecto al nivel natural de infectividad. Por “potenciamiento en la infectividad”, se pretende que se aumente la infectividad con respecto a un(os) tipo(s) concreto(s) de célula(s) por encima de la observada con el parvovirus natural, por ejemplo, en al menos un 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, o 500%, o más.

La(s) secuencia(s) diana exógena(s) puede(n) sustituir o sustituye(n) parte o toda la subunidad de una cápsida, alternativamente, más de una subunidad de la cápsida. Como alternativa adicional, se puede introducir más de una secuencia diana exógena (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias) en la cápsida del parvovirus. En realizaciones alternativas, se prefieren inserciones y sustituciones en el interior de las subunidades menores de la cápsida (por ejemplo, Vp1 y Vp2 de VAA). Para las cápsidas de VAA, se prefieren también inserciones o sustituciones en Vp2 o Vp3.

Las personas expertas en la técnica apreciarán que debido al solapamiento en las secuencias que codifican las proteínas de la cápsida del parvovirus, una inserción o sustitución única puede afectar a más de una subunidad de la cápsida.

Según se describe anteriormente, en las realizaciones particulares, la presente invención proporciona partículas de parvovirus quiméricos con estructuras y propiedades únicas. La sustitución y/inserción de una o más región(es) de la cápsida del parvovirus por otra(s) para crear una cápsida quimérica de parvovirus puede dar como resultado la pérdida del tropismo del parvovirus natural y/o el desarrollo de un nuevo tropismo asociado con la(s) región(es) exógena(s) de la cápsida. Según esto, los parvovirus dirigidos pueden ser también parvovirus quiméricos según se describe con más detalle anteriormente en el presente documento. En particular, se proporcionan parvovirus quiméricos dirigidos en los que se ha sustituido una(s) subunidad(es) de la cápsida o una(s) región(es) bucle procedente(s) de la subunidad mayor de la cápsida con una(s) subunidad(es) de la cápsida o la región bucle procedente de otro parvovirus.

Según esto, en las realizaciones particulares de la presente invención se construyen partículas de parvovirus quiméricos en las que las regiones de la cápsida que codifican el tropismo del parvovirus natural se intercambian con regiones o subunidades de la cápsida procedentes de una secuencia de un parvovirus diferente, disminuyendo o incluso aboliendo completamente el tropismo natural. Estos parvovirus negativos a la infección encuentran uso como plantilla para crear parvovirus con tropismos dirigidos. De esta manera, se puede generar un parvovirus con un tropismo nuevo o dirigido, pero que carece del tropismo natural.

En otra realización preferida, una región de la cápsida del parvovirus que dirige el tropismo nativo o natural se intercambia con una región de la cápsida que dirige el tropismo de otros parvovirus, disminuyendo o suprimiendo por tanto el tropismo natural y confiriendo en paralelo un nuevo tropismo al parvovirus quimérico. En otras realizaciones, la región extraña de la cápsida se sustituye o inserta en la cápsida del parvovirus sin reducir o extinguir el tropismo natural. Como alternativa adicional, más de una región extraña de la cápsida del parvovirus (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, o más) se intercambia en la cápsida del parvovirus. Por ejemplo, una primera región extraña de la cápsida puede sustituir la región extraña de la cápsida natural dirigiendo el tropismo natural. Las regiones extrañas adicionales de la cápsida proporcionan la cápsida quimérica con un(os) nuevo(s) tropismo(s).

Se ha identificado recientemente el sulfato de heparán (SH) como un receptor primario de VAA (Summerford y Samulski, (1998) J. Virology 72:1438). De esta manera, se puede modificar la estructura de la cápsida para facilitar o potenciar la unión de VAA al receptor celular o para inhibir o evitar la unión al anterior. Para ilustrar, se puede alterar el tropismo de VAA intercambiando la región de unión a SH de la cápsida de VAA, con las secuencias de otros parvovirus que no contienen esta región de unión a SH o cualquier otra secuencia.

Se han identificado algunas secuencias consenso entre los ligandos que se unen a los receptores de SH. En general, parece que SH se une a las secuencias que incluyen agrupaciones de aminoácidos básicos. Las secuencias consenso ilustrativas incluyen, pero no se limitan a BBXB, BBBXXB, y RX₇FRKKKXXK, en las que B es un aminoácido básico, y X es cualquier aminoácido. Tres secuencias que contienen agrupaciones de aminoácidos básicos están presentes en los primeros 170 restos de aminoácidos, de la proteína Vp1 de la cápsida de VAA de tipo 2 como sigue RX₃KKE en los aminoácidos 116 a 124, KX₄KKR en los aminoácidos 137 a 144, y KX₆RKR en los aminoácidos 161 a 170 (secuencia y numeración del VAA de tipo 2 según describen Srivastava y col., (1983) J. Virology 45:555, que modificaron Ruffing y col., (1994) J. Gen. Virology 75:3385, Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97, y Cassinotti y col., (1988) Virology 167:176). Adicionalmente, la secuencia consenso (RX₇FRPKRLNFK) en la subunidad VP1 de la cápsida de VAA de tipo 2 en los aminoácidos 299 a 315.

Parece que los serotipos 4 y 5 de VAA no se unen a los receptores celulares de SH, o lo hacen con una eficacia baja. Según esto, en realizaciones particulares, se puede sustituir la región de unión a SH de los serotipos 1, 2, 3, ó 6 de VAA con la correspondiente región del serotipo 4 ó 5 de VAA para reducir o abolir la unión a SH. Igualmente, se puede conferir la unión a SH en el serotipo 4 ó 5 de VAA insertando o sustituyendo en la región de unión a SH procedente de VAA 1, 2, 3 ó 6.

Las secuencias consenso de SH están marcadas por una abundancia de aminoácidos básicos. Existe una elevada densidad de aminoácidos cargados positivamente en el interior de los primeros 170 restos de la proteína Cap de Vp1 de VAA de tipo 2, que incluyen tres cadenas de aminoácidos básicos, que pueden estar implicadas en una interacción iónica con la superficie celular. Según esto, en una realización particular de la invención, la afinidad de una cápsida de VAA por los receptores de SH está reducida o eliminada mediante la creación de un parvovirus dirigido en los que algunas o todas las secuencias básicas están sustituidas por otras secuencias, por ejemplo, a partir de otro parvovirus que no contiene la región de unión a SH.

Alternativamente, se puede insertar o sustituir la región de unión con la heparina del virus respiratorio sincitial en un virus que no se une normalmente con los receptores de SH (por ejemplo, VAA4, VAA5, B19) para conferir la unión con la heparina al mutante resultante.

B19 infecta células progenitoras eritroides primarias que usan globósido como su receptor (Brown y col., (1993) Science 262: 114). Se ha determinado la estructura de B19 con una resolución de 8 Å (Agbandje-McKenna y col., (1994) Virology 203:106). Se ha mapeado la región de la cápsida de B19 que se une al globósido entre los aminoácidos

399-406 (Chapman y col., (1993) Virology 194:419), una región de bucle externo entre las estructuras en barril β E y F (Chipman y col., (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:7502). Según esto, se puede insertar/sustituir la región de unión con el receptor globósido de la cápsida en otras cápsidas de parvovirus (preferiblemente una cápsida de VAA, más preferiblemente, la cápsida de VAA de tipo 2) para dirigir el parvovirus quimérico resultante hacia las células eritroides.

En las realizaciones más preferidas, la secuencia diana exógena puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que codifique un péptido o proteína, que se inserte o sustituya en la cápsida de parvovirus para alterar el tropismo del parvovirus. El tropismo del parvovirus natural puede estar reducido o abolido mediante la inserción o la sustitución de la secuencia de aminoácidos. Alternativamente, la inserción o la sustitución de la secuencia exógena de aminoácidos puede dirigir el parvovirus a un(os) tipo(s) concreto(s) de célula(s). En realizaciones más adicionales preferidas, se sustituye o inserta una secuencia diana exógena en la cápsida del parvovirus para suprimir concurrentemente el tropismo natural e introducir un nuevo tropismo. Por ejemplo, se puede insertar un péptido diana directamente en una región diana de la cápsida de VAA para perturbar simultáneamente el tropismo natural (por ejemplo, interfiriendo con la unión a los receptores celulares de sulfato de heparán) y para dirigir el vector de VAA dirigido hacia células concretas.

Las personas expertas en la técnica apreciarán que se puede reducir o abolir el tropismo natural de un parvovirus sin sustituir o insertar una secuencia diana exógena directamente en aquellas regiones de la cápsida del parvovirus responsables de la unión con el receptor. Los mutantes que han perdido el tropismo natural son útiles como plantillas para la creación de parvovirus con novedosos tropismos como se enseña en el presente documento. Se prefiere que las sustituciones o inserciones que dan como resultado la pérdida del tropismo natural actúen a niveles de la unión y/o la entrada del receptor en la célula. En otras palabras, se prefiere que el parvovirus infectado sea capaz de otra manera de infectar una célula si se proporciona la entrada en la célula por otros medios, por ejemplo, mediante un anticuerpo biespecífico, dirigiendo el péptido o la proteína según se da a conocer en el presente documento, o mediante cualquier otro medio conocido en la técnica.

La secuencia diana exógena puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que codifica una proteína o péptido que altera el tropismo del parvovirus. En las realizaciones particulares, el péptido o la proteína diana puede producirse naturalmente o de manera alternativa, completa o parcialmente sintética. Los péptidos y proteínas a modo de ejemplo incluyen ligandos y otros péptidos que se unen a los receptores y a las glicoproteínas superficiales celulares, tales como las secuencias de los péptidos RGD, bradiquinina, hormonas, factores de crecimiento de péptidos (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento del fibroblasto, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores I y II de crecimiento de tipo insulina, etc), citocinas, hormona estimuladora de los melanocitos (por ejemplo, α , β o γ), neuropéptidos y endorfinas, y similares, y sus fragmentos que retienen la capacidad de dirigir las células a sus receptores análogos. Otros péptidos y proteínas ilustrativos incluyen la sustancia P, el factor de crecimiento del queratinocito, el neuropéptido Y, el péptido de liberación de la gastrina, la interleucina 2, la lisozima de la clara de huevo de gallina, eritropoyetina, gonadoliberina, corticoestatina, β -endorfina, leu-enkefalina, rimorfina, α -neo-enkefalina, angiotensina, pneumadina, péptido intestinal vasoactivo, neurotensina, motilina, y sus fragmentos según se describe anteriormente. Como alternativa adicional, el péptido o proteína diana puede ser un anticuerpo o fragmento Fab que reconozca, por ejemplo, un epítipo superficial celular, tal como un anticuerpo dirigido contra el receptor. Como una alternativa más adicional, se puede usar la región de unión procedente de una toxina (por ejemplo, la toxina del tétanos o las toxinas de serpientes, tales como α -bungarotoxina, y similares) para dirigir los vectores de parvovirus inventivos hacia las células dianas particulares de interés. En una realización más adicional preferida, se pueden liberar los vectores de parvovirus a una célula usando un péptido señal de importación/exportación "no clásico" (por ejemplo, factor 1 y 2 de crecimiento del fibroblasto, interleucina 1, proteína Tat de VIH-1, proteína VP22 del virus del herpes, y similares según se describe en Cleves, (1997) Current Biology 7:R318. Se abarcan también los motivos de péptidos que dirigen la captación por células específicas, por ejemplo, un motivo del péptido FVFLP estimula la captación por las células hepáticas. Se pueden usar las técnicas de presentación de fagos, así como otras técnicas conocidas en la técnica para identificar los péptidos que reconocen, preferiblemente de manera específica, cualquier tipo de célula de interés.

El término "anticuerpo" según se usa en el presente documento se refiere a todos los tipos de inmunoglobulinas, que incluyen IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden ser de cualquier especie de origen, incluyendo (por ejemplo), ratón, rata, conejo, caballo, o ser humano, o pueden ser anticuerpos quiméricos. Abarcados también por el término "anticuerpo" están los anticuerpos biespecíficos y de "puente" como conocen las personas expertas en la técnica.

Los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂, y Fc, y los fragmentos correspondientes obtenidos diferentes de IgG. Se pueden producir dichos fragmentos mediante técnicas conocidas.

La secuencia diana puede codificar alternativamente cualquier péptido o proteína que dirija la partícula de parvovirus a un emplazamiento de unión en la superficie celular, incluyendo los receptores (por ejemplo, proteína, carbohidrato, glicoproteína o proteoglicano), así como cualquier molécula cargada de manera opuesta (en comparación con la secuencia diana o la cápsida de parvovirus), u otra molécula con la que la secuencia diana o el parvovirus dirigido interactúa para unirse a la célula, y promover por tanto la entrada celular. Los ejemplos de emplazamientos de unión a la superficie celular incluyen, pero no se limitan a, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, y otros glicosami-

noglicanos, restos de ácido siálico encontrados en mucinas, glicoproteínas, y Gangliósidos, glicoproteínas MHC I, componentes de carbohidratos que se encuentran en las glicoproteínas de membrana, que incluyen, manosa, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, fucosa, galactosa, y similares.

5 Como alternativa más adicional, la secuencia diana puede ser un péptido o proteína que se puede usar para el acoplamiento químico (por ejemplo, mediante grupos secundarios de aminoácidos de restos de arginina o lisina) con otra molécula que dirige la entrada del parvovirus en una célula.

10 En otras realizaciones, la secuencia diana exógena se sustituye o inserta en la cápsida para perturbar la unión con los receptores celulares (por ejemplo, receptor de SH) y/o la entrada en la célula. Por ejemplo, la secuencia exógena de aminoácidos se puede sustituir o insertar en la(s) región(es) de la cápsida de VAA que se unen a los receptores celulares y/o media de otra manera la entrada del virus en la célula. Preferiblemente, la secuencia diana exógena se inserta en la(s) región(es) de la cápsida que interactúan con los receptores de SH celulares (según se describe anteriormente).
15 Un mutante de inserción ilustrativo que forma viriones de VAA intactos fracasa adicionalmente en unirse a la heparina agarosa o en infectar células Hela en un mutante de VAA de tipo 2 generado mediante la inserción de una secuencia de aminoácidos en el pb 3761 del genoma de VAA de tipo 2 (en el interior de la región Vp3 del gen cap).

20 En una realización adicional alternativa, la secuencia exógena de aminoácidos insertada en la cápsida del parvovirus puede ser una que facilite la purificación del parvovirus. Según este aspecto de la invención, no es necesario que la secuencia exógena de aminoácidos altere también el tropismo del parvovirus modificado. Por ejemplo, la secuencia exógena de aminoácidos puede incluir una secuencia de poli-histidina que sea útil para purificar el parvovirus sobre una columna de níquel, como conocen las personas expertas en la técnica. Alternativamente, se puede sustituir o insertar la región de la cápsida de VAA que interactúa con la heparina y/o el sulfato de heparán en una cápsida de parvovirus de tal manera que se puede purificar el parvovirus mediante unión con la heparina, por ejemplo, según se describe por Zolotukhin y col., (1999) Gene Therapy 6:973.

30 En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos codifica un péptido o proteína antigénicos que se puede emplear para purificar el VAA mediante técnicas de inmunopurificación normalizadas. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos puede codificar un ligando del receptor o cualquier otro péptido o proteína que se pueda usar para purificar el parvovirus modificado mediante purificación por afinidad o cualquier otra técnica conocida en la técnica (por ejemplo, técnicas de purificación basadas en el tamaño, densidad, carga, o punto isoelectrónico, cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía de péptidos diferencial).

35 En otras realizaciones adicionales de la invención, se puede insertar o sustituir una secuencia de aminoácidos en una partícula de parvovirus para facilitar su detección (por ejemplo, con un anticuerpo o cualquier otro reactivo de detección, como se conoce en la técnica). Por ejemplo, se puede insertar el epítipo "flag" en la cápsida del parvovirus y detectarse usando anticuerpos comercialmente disponibles (Eastman-Kodak, Rochester, NY). Los virus detectables encuentran uso, por ejemplo, para trazar la presencia y/o persistencia del virus en una célula, tejido o sujeto.

40 En una realización más adicional, se puede expresar una secuencia exógena que codifica cualquier proteína antigénica en la cápsida modificada (por ejemplo, para uso en una vacuna).

45 Según se describe a continuación en la Tabla I, los presentes investigadores han usado la mutagénesis insercional de la secuencia de codificación de la cápsida de VAA serotipo 2 con el fin de determinar las posiciones en el interior de la cápsida que toleran las inserciones de péptidos. Se identificaron mutantes viables con las inserciones a través de cada subunidad de la cápsida. Estos mutantes de inserción encuentran uso para cualquier objetivo en el que sea deseable insertar una secuencia de péptido o proteína en la cápsida de VAA, por ejemplo, para purificar y/o detectar virus, o para insertar un péptido o proteína antigénicos en la cápsida. Las posiciones de los nucleótidos indicadas en la Tabla 1 (véanse los Ejemplos) son las posiciones en las que se hicieron los emplazamientos de restricción, por ejemplo, las nuevas secuencia comienzan en el *siguiente* nucleótido. Por ejemplo, para un mutante de inserción indicado en la Tabla 1 que tenga una inserción en el nucleótido 2285, la nueva secuencia de inserción comienza en el nucleótido 2286.

55 Se prefiere insertar la secuencia exógena de aminoácidos en el interior de las subunidades Cap menores del parvovirus, por ejemplo, en el interior de las subunidades Vp1 y Vp2 de VAA. Alternativamente, se prefieren las inserciones Vp2 o Vp3. Se prefieren también las mutaciones de inserción en los nucleótidos 2285, 2356, 2364, 2416, 2591, 2634, 2690, 2747, 2944, 3317, 3391, 3561, 3595, 3761, 4046, 4047, y/o 4160 en el interior de los genes cap de VAA de tipo 2, preferiblemente, para generar un vector de VAA de tipo 2 con un tropismo alterado según se describe en el presente documento (la numeración de VAA de tipo 2 usado en el presente documento es según se describe en Srivastava y col., (1983) J. Virology 45:555, que modificó por Ruffing y col., (1994) J. Gen. Virology 75:3385, Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158: 97, y Cassinotti y col., (1988) Virology 167:176).

65 Las inserciones en estas posiciones de nucleótidos de VAA2 proporcionarán un aumento en las inserciones de aminoácidos que siguen al aminoácido 28 (un 2285), 51 (nu 2356), 54 (nu 2364), 71 (nu 2416), 130 (nu 2591), 144 (nu 2634), 163 (nu 2690), 182 (nu 2747), 247 (nu 2944), 372 (nu 3317), 396 (nu 3391), 452 (nu 3561), 464 (nu 3595), 520 (nu 3761), 521 (nu 3766), 615 (nu 4046 y 4047), y 653 (nu 4160) en el interior de la región de codificación de la cápsida de VAA2 (usando el resto metionina de partida para Vp1 como aminoácido 1), o las regiones correspondientes

ES 2 340 230 T3

de los VAA de otros serotipos como conocen las personas expertas en la técnica Las personas expertas en la técnica apreciarán que debido al solapamiento en las regiones que codifican la cápsida de VAA, estas inserciones pueden proporcionar un aumento de las inserciones en el interior de más de una de las proteínas de la cápsida (Tabla 2).

TABLA 2

Posiciones de inserción en la cápsida de VAA2 ^{1,2}			
Emplazamiento de inserción (nucleótido)	Vp1 (aminoácido)	Vp2 (aminoácido)	Vp3 (aminoácido)
2285	28	--	--
2356	51	--	--
2364	54	--	--
2416	71	--	--
2591	130	--	--
2634	114	7	--
2690	163	26	--
2747	182	45	--
2944	247	110	45
3317	372	235	170
3391	396	259	194
3561	452	315	250
3595	464	327	262
3753	517	380	315
3761	520	383	319
3766	521	384	319
3789	529	392	327
3858	552	415	350
3960	586	449	384
3961	586	449	384
3987	595	458	393
4046	615	478	413
4047	615	478	413
4160	653	516	451
¹ El nucleótido o aminoácido indicado se refiere al nucleótido o aminoácido inmediatamente anterior a la secuencia insertada			
² Vp1 comienza en el nucleótido 2203			

ES 2 340 230 T3

Alternativamente, se inserta la secuencia exógena de aminoácidos se inserta en los emplazamiento homólogos a los descritos anteriormente en las cápsidas de VAA de otros serotipos como conocen las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Chiorini y col., (1999) J. Virology 73:1309). Las posiciones de los aminoácidos en el interior de la cápsida de VAA parecen ser muy, o incluso completamente, conservadas entre los serotipos de VAA. Según esto, en las realizaciones particulares, la secuencia exógena de aminoácidos está sustituida en las posiciones de los aminoácidos indicadas en la Tabla 2 (la nueva secuencia comienza en el siguiente aminoácido) en otro VAA diferente del serotipo 2 (por ejemplo, serotipo 1, 3, 4, 5 ó 6).

Como alternativas adicionales, se puede insertar una secuencia exógena de aminoácidos en la cápsida de VAA en las posiciones descritas anteriormente para facilitar la purificación y/o la detección del parvovirus modificado o para los objetivos de presentación del antígeno, según se describe anteriormente.

Se produce un mutante particular de VAA de tipo 2 insertando una secuencia de aminoácidos en la posición del nucleótido 2634 del genoma (en el interior de la región Vp2 del gen cap; numerando VAA2 según se describe anteriormente). Este mutante forma viriones de VAA de tipo 2 con morfología normal mediante análisis de microscopio de electrones en ausencia de expresión detectable de las subunidades Vp1 y Vp2. Más aún, este mutante protege el genoma vírico y retiene la unión con la matriz de heparina-agarosa, aunque no demuestra infectividad en células HeLa. Este mutante es útil para la administración en sujetos para evitar una respuesta inmune contra las subunidades Vp1 y Vp2. Encuentra adicionalmente uso para la inserción de péptidos o proteínas grandes en la estructura de la cápsida de VAA. Como un ejemplo ilustrativo, la proteína knob de adenovirus se inserta en este mutante para dirigir el virus al receptor del adenovirus Coxsackie (CAR).

Se produce otro mutante de inserción particular de VAA de tipo 2 mediante la inserción de una secuencia exógena de aminoácidos en el pb 3761 del genoma (en el interior de la región Vp3 que codifica la cápsida). Este mutante protege el genoma vírico y forma estructuras de cápsida morfológicamente normales, pero no se une a la heparina agarosa y fracasa en infectar a las células HeLa. Este mutante es particularmente útil como reactivo para crear vectores de VAA que carecen de tropismo natural. Por ejemplo, se puede introducir una nueva región diana en este mutante en el pb 3761 o en otro emplazamiento. Según se muestra en la Tabla 1, las presentes investigaciones han descubierto una variedad de posiciones en el interior de la cápsida de VAA que toleran la inserción de péptidos exógenos y retienen la infectividad (por ejemplo, en el pb 2356, 2591, 2690, 2944, 3595, y/o 4160 del genoma de VAA de tipo 2).

En otras realizaciones preferidas, se crean vectores de VAA con múltiples inserciones y/o sustituciones para proporcionar vectores de VAA que presenten un modelo de infectividad deseado, por ejemplo, una mutación no infecciosa mediante inserción/sustitución y se puede combinar una mutación infecciosa (por ejemplo, según se muestra en la Tabla 1) en un vector de VAA único. Como un ejemplo ilustrativo, se puede realizar una inserción peptídica en el pb 3761 del genoma de VAA de tipo 2 (en el interior de la subunidad Vp3) para crear un mutante no infeccioso negativo de unión con la heparina. Se puede hacer una segunda inserción peptídica en el pb 2356 (alternativamente pb 2591, 2690, 2944, 3595 o 4160) para dirigir el vector. El péptido insertado puede ser uno que dirija el vector de VAA de tipo 2 a las células diana de interés. En las realizaciones particulares, se puede insertar bradiquinina en cualquiera de los emplazamientos anteriores para dirigir el vector a las células epiteliales del pulmón (por ejemplo, para el tratamiento de la fibrosis quística u otras enfermedades del pulmón) o se puede insertar la proteína knob de adenovirus en los emplazamientos anteriores para producir una respuesta inmune.

En otras realizaciones, se hace la sustitución o inserción (preferiblemente la inserción) en los nucleótidos 3789 o 3961 del genoma de VAA2 (por ejemplo, la nueva secuencia comenzaría en el nu 3790 y 3962, respectivamente), o el emplazamiento correspondiente de los otros serotipos de VAA como conocen las personas expertas en la técnica. Estas posiciones corresponden a las inserciones que siguen a los aminoácidos 529 y 568, respectivamente, de la cápsida de VAA 2 (Met nº 1 de Vp1 como aminoácido 1; Tabla 2). En las realizaciones particulares, existirá una mutación sin sentido en los nucleótidos 3790-3792 (Glu → Ile) o en los nucleótidos 3960-3961 (Gly → Val), respectivamente, debido a la creación de un emplazamiento de restricción como parte de la estrategia de clonación. En las realizaciones preferidas de la invención, se combina una inserción dirigida en el nu 3789 o el 3961 con la mutación en 3761, lo que da como resultado la pérdida de la unión con la heparina, para crear una cápsida o parvovirus dirigido.

En otras realizaciones se hace una inserción o sustitución (preferiblemente, inserción) en la cápsida de VAA2 en los nucleótidos 3753, 3858, 3960, ó 3987 (la nueva secuencia que comienza en el siguiente nucleótido), o los emplazamientos correspondientes en VAA de otros serotipos. Estos emplazamientos corresponden a las inserciones o sustituciones que siguen a los aminoácidos 517, 552, 586, ó 595, respectivamente, de la cápsida de VAA2 (Met nº 1 de Vp1 como aminoácido 1; Tabla 2) o los emplazamientos correspondientes en las cápsidas de VAA de otros serotipos como conocen las personas expertas en la técnica.

En otras realizaciones preferidas, se hace la inserción o sustitución que sigue a los aminoácidos 517, 529, 552, 586 ó 595 de las cápsidas de otros serotipos, por ejemplo (1, 2, 3, 5 ó 6).

No existe límite inferior o superior particular en la longitud de la secuencia de aminoácidos que se va a insertar o sustituir en la cápsida del virus, siempre que la cápsida del parvovirus dirigida o modificada retenga las propiedades deseadas (por ejemplo, ensamblaje, empaquetado, infectividad). La secuencia exógena de aminoácidos puede ser tan corta como de 100, 50, 20, 16, 12, 8, 4 ó 2 aminoácidos de longitud. Similarmente, la secuencia exógena de aminoácidos que se va a insertar/sustituir en la cápsida del parvovirus puede ser tan larga como de 2, 5, 10, 12, 15, 20,

50, 100, 200, 300 o más aminoácidos. En las realizaciones particulares, la secuencia exógena de aminoácidos codifica una proteína completa. Preferiblemente, la secuencia exógena de aminoácidos que se inserta/sustituye en la cápsida del parvovirus se expresa en la superficie externa de la cápsida del parvovirus modificado.

5 La presente divulgación proporciona además proteínas de la cápsida del parvovirus dirigido, en el que una(s) secuencia(s) diana se inserta(n) o sustituye(n) en una proteína de la cápsida del parvovirus, según se describe anteriormente. La proteína de la cápsida del parvovirus dirigido confiere un tropismo alterado sobre un vector de virus o cápsida de virus (preferiblemente un vector o cápsida de parvovirus) que incorpora la proteína de la cápsida del parvovirus dirigido en el anterior en comparación con el tropismo del vector de virus o cápsida de virus natural en ausencia
10 de la proteína de la cápsida del parvovirus dirigido. Igualmente, las proteínas modificadas de la cápsida (modificaciones según se describen anteriormente para los parvovirus) son otro aspecto de la divulgación. Se puede incorporar la proteína modificada de la cápsida en una cápsida o partícula de parvovirus, por ejemplo, para facilitar su purificación y/o detección o para los objetivos de presentación del antígeno.

15 Se proporcionan además cápsidas de parvovirus dirigidos y/o modificados según se describe con más detalle anteriormente en conexión con cápsidas de parvovirus quiméricos. En las realizaciones particulares, la presente invención proporciona “vehículos de cápsida” de parvovirus dirigidos, según se ha descrito para las cápsidas de VAA, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 5.863.541.

20 Las moléculas que se pueden empaquetar por las cápsidas de parvovirus inventivas y transferirse en una célula incluyen genomas de VAA recombinantes, que se pueden integrar ventajosamente a continuación en el genoma de la célula diana, y otras moléculas heterólogas de ADN, ARN, proteínas y péptidos, o pequeñas moléculas orgánicas, o combinaciones de las mismas. Se definen las moléculas heterólogas como aquellas que no se encuentran naturalmente en una infección de parvovirus, es decir, aquellas no codificadas por el genoma del parvovirus. En una realización
25 preferida de la presente invención, se puede unir una secuencia de ADN que se va a encapsidar a una secuencia del ITR de VAA que contiene señales de empaquetado vírico, que pueden aumentar la eficacia de encapsidación y/o de integración dirigida en el genoma.

Esta divulgación se dirige adicionalmente a la asociación de moléculas terapéuticamente útiles con el exterior de
30 las cápsidas de parvovirus inventivas para la transferencia de las moléculas en las células huéspedes diana. Dichas moléculas asociadas pueden incluir ADN, ARN, carbohidratos, lípidos, proteínas o péptidos. Se pueden unir covalentemente las moléculas terapéuticamente útiles (es decir, conjugarse o acoplarse químicamente) con las proteínas de la cápsida. Las personas expertas en la técnica conocen los procedimientos para unir covalentemente las moléculas.

35 Las proteínas de la cápsida del parvovirus dirigido y/o modificado, las cápsidas, y las partículas de virus de la invención encuentran uso para aumentar los anticuerpos contra estas novedosas estructuras de la cápsida. Alternativamente, se puede insertar una secuencia exógena de aminoácidos en la cápsida del parvovirus para la presentación del antígeno a una célula, por ejemplo, para la administración a un sujeto para producir una respuesta inmune a la secuencia exógena de aminoácidos. Según esta última realización, no es necesario que la secuencia exógena de aminoácidos
40 altere también el tropismo del parvovirus.

Las personas expertas en la técnica apreciarán que los virus y cápsidas modificados/dirigidos según se describe anteriormente pueden ser también parvovirus quiméricos y/o híbridos según se describe en las secciones anteriores. Las
45 personas expertas en la técnica apreciarán además que los mutantes de inserción descritos en el presente documento incluyen parvovirus con otras modificaciones, por ejemplo, delección, inserción o mutaciones sin sentido. Adicionalmente, se pueden introducir mutaciones incidentalmente en la cápsida del parvovirus o el genoma del VAAr como resultado de una estrategia de clonación particular empleada.

Los genomas de parvovirus, VAA, y VAAr son según se describe anteriormente con respecto a los parvovirus
50 híbridos. La presente divulgación proporciona también vectores de clonación, vectores de empaquetado transcomplementantes, células de empaquetado, y los procedimientos para producir las partículas de VAAr modificado y/o dirigido descritas anteriormente. En general, las células de empaquetado auxiliares, y los procedimientos para producir los parvovirus dirigidos o modificados son como se describe anteriormente con respecto a los virus híbridos y quiméricos. Adicionalmente, al menos uno de los genes cap/codificado por el genoma de VAAr, un vector de empaquetado, o la
55 célula de empaquetado) ha insertado o sustituido en el anterior al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia diana exógena (según se describe anteriormente) o una secuencia exógena de aminoácidos (según se describe anteriormente, por ejemplo, para la purificación, detección o presentación del antígeno).

IV. Tecnología de transferencia de genes

60 Los procedimientos de la presente invención proporcionan un medio para liberar secuencias heterólogas de ácido nucleico en una amplia gama de células huéspedes, que incluyen células en división y en no división. Los vectores y otros reactivos, procedimientos y formulaciones farmacéuticas de la presente invención son adicionalmente útiles en un procedimiento de administración de una proteína o péptido a un sujeto que lo necesita, como un procedimiento
65 de tratamiento o de otra manera. De esta manera, se puede producir de esta manera la proteína o péptido *in vivo* en el sujeto. El sujeto puede necesitar la proteína o péptido debido a que el sujeto tiene una deficiencia de la proteína o péptido, o debido a que la producción de proteína o péptido en el sujeto puede impartir algún efecto terapéutico, como procedimiento de tratamiento o de otra manera, y se explica adicionalmente a continuación.

En general, se puede emplear la presente invención para liberar cualquier ácido nucleico extraño con un efecto biológico para tratar o mejorar los síntomas asociados con cualquier trastorno relacionado con la expresión génica. Los estados de enfermedad ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: fibrosis quística (y otras enfermedades del pulmón), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos de la sangre, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia, y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (por ejemplo, Duchenne, Becker), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina desaminasa, enfermedades de almacenamiento de glicógeno y otros defectos metabólicos, enfermedades degenerativas retinales (y otras enfermedades del ojo), enfermedades de los órganos sólidos (por ejemplo, cerebro, hígado, riñón, corazón), y similares.

La transferencia génica tiene sustancial uso potencial para comprender y proporcionar terapia para los estados de enfermedad. Existen numerosas enfermedades hereditarias en las que se conocen y se han clonado los genes defectivos. En algunos casos se conoce la función de estos genes clonados. En general, los anteriores estados de enfermedad están comprendido en dos tipos: estados de deficiencia, normalmente de enzimas, que se heredan generalmente de una manera recesiva, y estados desequilibrados, que implican al menos algunas veces proteínas reguladoras o estructurales, que se heredan de una manera dominante. Para las enfermedades de deficiencia, se podría usar la transferencia génica para llevar un gen normal en tejidos afectado por la terapia de sustitución, así como para crear modelos animales de la enfermedad usando mutaciones de sentido contrario. Para las enfermedades de desequilibrio, se podría usar la transferencia génica para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo. Según se usa en el presente documento, un estado de enfermedad se trata remediando parcial o completamente la deficiencia o desequilibrio que produce la enfermedad o hace ésta más grave. Es también posible el uso de integración específica del emplazamiento de las secuencias nucleicas para producir mutaciones o para corregir defectos.

Se puede emplear también la presente invención para proporcionar un ácido nucleico de sentido contrario a una célula *in vitro* o *in vivo*. La expresión del ácido nucleico de sentido contrario en la célula diana disminuye la expresión de una proteína particular por la célula. Según esto, se pueden administrar ácidos nucleicos de sentido contrario para disminuir la expresión de una proteína particular en un sujeto que lo necesita. Se pueden administrar ácidos nucleicos de sentido contrario a células *in vitro* para regular la fisiología celular, por ejemplo, para optimizar los sistemas de cultivo de células o tejidos. La presente invención es también útil para liberar otros ARN no traducidos, por ejemplo, ribozimas (por ejemplo, según se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.877.022), los ARN que efectúan el corte y empalme en trans mediado por el ayustosoma (Puttaraju y col., (1999) Nature Biotech. 17:246), o los ARN “guía” (véanse, por ejemplo, Gorman y col., (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:4929; Patente de los Estados Unidos N° 5.869.248 de Yuan y col.) en una célula diana.

Finalmente, la presente invención encuentra uso adicional en los procedimientos de diagnóstico y cribado, por los cuales, un gen de interés se expresa de manera transitoria o estable en un sistema de cultivo de células, o alternatively, un modelo animal transgénico no humano.

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

La presente invención encuentra uso en aplicaciones veterinarias y médicas. Los sujetos adecuados incluyen aves y mamíferos, prefiriéndose los mamíferos. El término “aviar” según se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes. El término “mamífero” según se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, seres humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos son los más preferidos. Los sujetos humanos incluyen sujetos fetales, neonatales, niños, jóvenes y adultos.

En las realizaciones particulares, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de virus de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, diluyentes, etc. Para la inyección, el vehículo será normalmente un líquido. Para otros procedimientos de administración el vehículo puede ser tanto sólido como líquido, tal como agua estéril libre de pirógeno, o disolución salina tamponada con fosfato libre de pirógeno. Como medio de inyección, se prefiere usar agua que contenga los aditivos usuales para las disoluciones en inyección, tales como agentes estabilizantes, sales o disolución salina, y/o tampones.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una células en la que e integra un provirus de VAA en el genoma en un vehículo farmacéuticamente aceptable u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, diluyentes, etc.

Por “farmacéuticamente aceptable” se entiende un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, por ejemplo, se puede administrar el material a un sujeto sin producir ningún efecto biológico indeseable. De esta manera, se puede usar dicha composición farmacéutica, por ejemplo, en la transfección de una célula *ex vivo* o en la administración de una partícula o una célula vírica directamente a un sujeto.

Se pueden administrar los vectores de parvovirus de la invención para administrar una respuesta inmunógena (por ejemplo, como una vacuna). Normalmente, las vacunas de la presente invención comprenden una cantidad inmunógena de partículas de virus infecciosas según se da a conocer en el presente documento, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una “cantidad inmunógena” es una cantidad de las partículas de virus infecciosas que

es suficiente para evocar una respuesta inmune en el sujeto al cual se administra la formulación farmacéutica. Normalmente, es adecuada una cantidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{15} partículas de virus, preferiblemente, aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} , y más preferiblemente aproximadamente 10^4 a 10^6 partículas de virus por dosis, dependiendo de la edad y especie del sujeto que se está tratando, y del inmunógeno contra el cual se desea la respuesta inmune. Los sujetos e inmunógenos son como se describe anteriormente.

La presente invención proporciona además un procedimiento para liberar ácido nucleico en una célula. Para los procedimientos *in vitro*, se puede administrar el virus en la célula mediante procedimientos normalizados de transducción vírica, según se conocen en la técnica. Preferiblemente, se añaden las partículas víricas a las células a la multiplicidad de infección apropiada según los procedimientos normalizados de transducción apropiados para las células diana particulares. Pueden variar los títulos de los virus a administrar, dependiendo del tipo de célula diana y del vector de virus particular, y las personas expertas en la técnica pueden administrarlos sin experimentación indebida. Alternativamente, se puede llevar a cabo la administración de un vector de parvovirus de la presente invención mediante cualquier otro medio conocido en la técnica.

Los vectores de virus recombinante se administran preferiblemente en la célula en una cantidad biológicamente efectiva. Una cantidad “biólogicamente efectiva” es una cantidad que es suficiente para dar como resultado una infección (o transducción) y la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico en la célula. Si el virus se administra a una célula *in vivo* (por ejemplo, se administra el virus a un sujeto según se describe a continuación), una cantidad “biólogicamente efectiva” del vector de virus es una cantidad que es suficiente para dar como resultado la transducción y expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico en una célula diana.

La célula a la que se va a administrar el vector de virus inventivo puede ser de cualquier tipo, incluyendo, pero sin limitarse a células neurales (que incluyen las células de los sistemas nerviosos periférico y central, en particular, células del cerebro), células del pulmón, células retinales, células epiteliales (por ejemplo células epiteliales del intestino y respiratorias, células musculares, células pancreáticas (que incluyen las células de los islotes), células hepáticas, células miocárdiales, células óseas (por ejemplo, células troncales de la médula ósea), células troncales hematopoyéticas, células de bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de la próstata, células germinales, y similares. Alternativamente, la célula puede ser cualquier célula progenitora. Como alternativa adicional, la célula puede ser una célula troncal (por ejemplo, célula troncal neural, célula troncal del hígado). Más aún, las células pueden ser de cualquier especie de origen, según se ha indicado anteriormente.

En las realizaciones particulares de la divulgación, las células se retiran de un sujeto, se introduce el vector de parvovirus en las anteriores, y a continuación las células se vuelven a sustituir en el sujeto. Se conocen en la técnica los procedimientos para retirar células procedentes del sujeto para el tratamiento *ex vivo*, seguidos por la reintroducción en el sujeto: Alternativamente, se introduce el vector de VAAr en las células procedente de otro sujeto, en células cultivadas, o en células procedentes de cualquier otra fuente adecuada, y se administran las células a un sujeto que lo necesita.

Las células adecuadas para la terapia génica *ex vivo* incluyen, pero no se limitan a, células de hígado, células neurales (que incluyen las células de los sistemas nerviosos central y periférico, en particular, células de cerebro), células de páncreas, células de bazo, fibroblastos (por ejemplo, fibroblastos de la piel), queratinocitos, células endoteliales, células epiteliales, mioblastos, células hematopoyéticas, células estromales de la médula ósea, células progenitoras, y células troncales.

Las dosificaciones de las células a administrar a un sujeto variarán dependiendo de la edad, dolencia y especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico que se está expresando por la célula, el modo de administración, y similar. Normalmente, se administrarán 10^2 a aproximadamente 10^8 , preferiblemente aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 células, por dosis. Preferiblemente se administrarán las células en una “cantidad terapéuticamente efectiva”.

Una cantidad “terapéuticamente efectiva” según se usa en el presente documento es una cantidad que es suficiente para aliviar (por ejemplo, mitigar, disminuir, reducir) al menos uno de los síntomas asociados con el estado de enfermedad. Dicho de otra forma, una cantidad “terapéuticamente efectiva” es una cantidad que es suficiente para proporcionar alguna mejora en la dolencia del sujeto.

Un aspecto adicional de la divulgación es un procedimiento para tratar sujetos *in vivo* con las partículas del virus inventivo. La administración de las partículas de parvovirus de la presente invención a un sujeto humano o un animal que lo necesita puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica para administrar los vectores de virus.

Los modos de administración a modo de ejemplo incluyen la administración oral, rectal, transmucosal, tópica, transdérmica, mediante inhalación, parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular, e intraarticular), y similares, así como la inyección directa al tejido u órgano, alternativamente, inyecciones intratecal, intramuscular directa, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, intraocular. Se pueden preparar inyectables en forma convencionales, tanto como disoluciones líquidas como suspensiones, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Alternativamente, se puede administrar el virus de una manera local más bien que sistémica, por ejemplo, en una formulación de depósito o de liberación mantenida.

En las realizaciones particularmente preferidas, la secuencia de nucleótidos de interés se libera en el hígado del sujeto. Se puede conseguir la administración en el hígado mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, administración intravenosa, administración intraportal, administración intrabiliar, administración intraarterial, e inyección directa en el parénquima del hígado.

Preferiblemente, las células (por ejemplo, células de hígado) se infectan mediante un vector de parvovirus recombinante que codifica un péptido o proteína, las células expresan el péptido o proteína codificados y segregan éste en el sistema circulatorio en una cantidad terapéuticamente efectiva (según se define anteriormente). Alternativamente, se libera el vector a y se expresa mediante otra célula o tejido, incluyendo pero sin limitarse a, cerebro, páncreas, bazo o músculo.

En otras realizaciones preferidas, las partículas del parvovirus inventivo se administran intramuscularmente, más preferiblemente mediante inyección intramuscular o mediante administración local (según se define anteriormente). En otras realizaciones preferidas, las partículas del parvovirus de la presente invención se administran a los pulmones.

Se pueden administrar los vectores de parvovirus que se dan a conocer en el presente documento en los pulmones de un sujeto mediante cualquier medio adecuado, pero se administran preferiblemente administrando una suspensión en aerosol de partículas respirables comprendidas por los vectores de parvovirus, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Se pueden producir aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores del parvovirus inventivo mediante cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador en aerosol impulsado a presión o un nebulizador ultrasónico, como conocen las personas expertas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 4.501.729. Se pueden producir igualmente aerosoles de partículas sólidas que comprende los vectores del virus inventivo con cualquier generador en aerosol de medicamento particulado sólido, mediante técnicas conocidas en la técnica farmacéutica.

Las dosificaciones de las partículas del parvovirus inventivo dependerán del modo de administración, la enfermedad o dolencia que se va a tratar, la dolencia del sujeto individual, el vector de virus particular, y el gen que se va a liberar, y se pueden determinar de una manera rutinaria. Las dosis a modo de ejemplo para conseguir los efectos terapéuticos son títulos de virus de al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} unidades de transducción o más, preferiblemente aproximadamente 10^8 - 10^{13} unidades de transducción, aún más preferiblemente 10^{12} unidades de transducción.

En las realizaciones particulares, se puede emplear más de una administración (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o más administraciones) para conseguir los niveles terapéuticos de expresión génica. Según esta realización, y según se describe anteriormente, se prefiere usar vectores de parvovirus que tengan diferentes propiedades antigénicas para cada administración para obviar los efectos de los anticuerpos neutralizantes. Según se describe anteriormente, los parvovirus híbridos y quiméricos de la presente invención se administran para burlar los anticuerpos neutralizantes en el sujeto que se va a tratar o para evitar el desarrollo de una respuesta inmune en el sujeto. Se puede presentar el sujeto aparentemente con nuevos vectores de virus empaquetando el genoma de VAAr en el interior de una matriz de cápsidas de parvovirus híbridos o quiméricos.

A la discusión anterior pertenecen también las formulaciones farmacéuticas que contienen las cápsidas de parvovirus y otros reactivos de la invención así como los procedimientos para administrar las mismas.

En resumen, se pueden usar los vectores de parvovirus, reactivos, y los procedimientos de la presente invención para dirigir un ácido nucleico a células tanto en división como en no división, y para expresar de manera estable el ácido nucleico heterólogo de los anteriores. Usando este sistema de vectores, es ahora posible introducir en las células, *in vitro* o *in vivo*, genes que codifican proteínas que afectan la fisiología celular. Los vectores de la presente invención pueden de esta manera ser útiles en la terapia génica de los estados de enfermedad o para la modificación experimental de la fisiología celular.

Habiendo descrito ahora la invención, se ilustrará la misma con referencia a algunos ejemplos, que se incluyen en el presente documento únicamente con objetivos de ilustración, y que no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1

Vectores de VAA

Toda la producción de vectores de VAA usados en estas investigaciones utilizó el esquema de producción del vector según se describe en Ferrari y col., (1997) Nature Med. 3:1295 y Xiao y col., (1998) J. Virology 72:2224. Utilizando un procedimiento de transfección transitoria, se ha generado VAAr derivado de adenovirus. Este protocolo utiliza un genoma de ADN de adenovirus que se ha incapacitado para la replicación vírica y la posterior expresión génica. El miniplásmido Ad incapaz a la vez de replicarse y producir progenie, es aún viable para la expresión génica de adenovirus en células 293. Usando esta construcción, se ha complementado satisfactoriamente la estrategia de empaquetado de VAA que implica un nuevo plásmido auxiliar de VAA (pVAA/AD ACG) y el ADN del vector de VAA (sub 201) (Samulski y col., (1989) J of Virology 63:3822). Esta nueva construcción ge-

ES 2 340 230 T3

nera normalmente VAAr de 10^7 - 10^9 /placa de 10 cm de células 293 (Xiao y col., (1998) J. Virology 72:2224). Se observó liberación génica eficiente en músculo, cerebro e hígado con estos vectores en ausencia completa de Ad.

Ejemplo 2

Células y virus

Se mantuvieron células 293 y HeLa humanas a 37°C con CO₂ al 5% a saturación en suero bovino fetal al 10% (Hyclone) en medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco BRL), con estreptomicina y penicilina (Lineberger Comprehensive Cancer Center, Chapel Hill, NC). Se plaquearon cuatro x 10⁶ células 293 el día antes de la transfección sobre una placa de 10 cm. Se transfectaron las células mediante fosfato de calcio (Gibco BRL) o Superfection (Qia-gene) según las especificaciones del fabricante. Se transfectaron los plásmidos inscripcionales que empaquetaban el mutante, descritos a continuación junto con PAB11 que contenía el gen Lac Z impulsado por CMV con una señal de localización nuclear. Para cada transfección, se usaron la misma cantidad de plásmido de empaquetado (12 µg) y pAB11 (8 µg) para cada placa de 10 cm. Para cada transfección se usó una placa adicional que contenía el plásmido del transgen, únicamente para evaluar las eficacias de la transformación. Tras la transfección se infectaron las células con el virus auxiliar Ad5 *dI309* a una MOI de 5, y 48 horas después se lisaron las células y se purificó el virus.

Se purificó el virus recombinante usando gradientes de cloruro de cesio isopícnico o iodixanol. En ambos casos se centrifugaron a 1500 rpm (Sorvall RT 600B) durante diez minutos a 4°C. Se precipitaron las proteínas a partir del sobrenadante usando sulfato de sodio (30% p/v) y se volvieron a suspender en una disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 7H₂O 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM). Se volvió a suspender el residuo celular en 1 x PBS que contenía 0,1 mg/ml de DNasa I (Boehringer Mannheim) lisado en tres ciclos de congelación-descongelación, combinado con la porción de proteína del sobrenadante, e incubado a 37°C durante 30 minutos. Se sometió este material a sonicación (Branson Sonifier 250, VWR Scientific), 25 cargas con un 50% de potencia, control de salida 2. Se eliminaron los desechos celulares mediante centrifugación (Sorvall RT 6000B). A cada mililitro de sobrenadante se añadieron 0,6 g de cloruro de cesio (CsCl) y se centrifugó la disolución durante 12-18 horas (ultracentrífuga Beckman Optima TLX) en un rotor TLS 55 a 55.000 rpm. Alternativamente, se extendió en capas el sobrenadante en la parte superior de un gradiente de iodixanol (OptiPrep -Nycomed Pharma As, Oslo, Noruega) de 60%, 45%, 30% y 15%. Se centrifugó este gradiente en una ultracentrífuga Beckman Optima TLX usando un rotor TLN 100 a 100.000 rpm durante una hora. Se recuperaron las fracciones procedentes de estos gradientes y se utilizaron 10 µl de cada fracción para la hibridación por transferencia con mancha para determinar qué fracción contenía el pico del virión protegido (véase el Ejemplo 5).

Ejemplo 3

Construcción de plásmidos que empaquetan VAA

Se clonó la región de la cápsida de pVAA/Ad en pBS+ (Stratagene) usando *Hind III*, dando como resultado pAV2Cap. La digestión parcial de pAV2Cap usando los enzimas de restricción *Hae III*, *Nla IV*, y *Rsa I* y la purificación en gel del fragmento de ADN de longitud unitaria dio como resultado el aislamiento del material de partida para la clonación. El gen de la aminoglicósido 3'-fosfotransferasa, que confiere resistencia a la kanamicina (kan^r), procedente de pUC4K (Pharmacia) digerido con *Sal I* se flanqueó por enzimas que contenían los emplazamientos *Nae I* y *Eco RV*, un *Sal I* sobresaliendo en un extremo y un *Eco RI* sobresaliendo en el otro extremo (superior 5'-AATTCGCCGCGGATATC-3', SEC DE ID N°: 6, inferior 5'-TCGAGATATCGCCGGC-3', SEC DE ID N°:7). Se clonó este fragmento en el emplazamiento *Eco RI* de pBluescript SK+ (Stratagene). La digestión con *Nae I* liberó el gen Kan^r, y se unió este fragmento en los parciales de pAV2Cap; Se cribaron los plásmidos resultantes para la inserción en la región de la cápsida y, a continuación, se digirieron con *Eco RV* para eliminar el gen kan^r dejando la inserción de doce pares de bases 5'-GGCGATATCGCC-3' (SEC DE ID N°: 8) en el interior de la región de la cápsida. Se usaron múltiples digestiones del enzima y la secuenciación del ADN para determinar la posición de la inserción de 12 pb en el interior de la región de codificación de la cápsida. Las digestiones del enzima incluyen *Eco RV/Ban II*, *Eco RV/Bst NI*, *Eco RV/Pst I* y *Eco RV/Hind III*. Se digirió la región de la cápsida de los plásmidos resultantes con *Asp718* y se subclonó en el plásmido que empaqueta pACG2 (Li y col., 1997 J. Virology 71:5236), con la excepción de un clon de NlaIV que solapó el emplazamiento 3'-*Asp718*. Se clonó este mutante de inserción en pVAA/Ad usando la digestión de *Hind III/Nsi I*.

Ejemplo 4

Transferencia Western

Se centrifugaron los lisados celulares tras congelación-descongelación, lisis y sonicación para eliminar los desechos celulares grandes. Se añadieron inmediatamente veinte microlitros de sobrenadante a 20 µl de tampón cargado en gel 2xSDS que contenía ditiotretol y se mantuvo en ebullición durante cinco minutos. Se analizaron las

ES 2 340 230 T3

proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de SDS y se transfirieron electroforéticamente a nitrocelulosa. Se inmunotransfirieron las membranas de nitrocelulosa usando el anticuerpo monoclonal B1 dirigido contra Vp3 un generoso obsequio de Jurgen A. Kleinschmidt). Se ensayó cada uno de los mutantes de inserción al menos dos veces mediante análisis de transferencia Western. Se usó la IgG secundaria de Peroxidasa de Rábano Picante dirigida contra ratón para visualizar indirectamente la proteína mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL-Amersham). Se escanearon las transferencias Western procedentes de película BioMax expuesta a quimioluminiscencia potenciada (Kodak) en Adobe PhotoShop y se analizaron mediante software ImageQuaNT (Molecular Dynamics Inc.).

Se visualizaron las proteínas víricas mediante transferencia Western seguida por inmunotransferencia según se describe anteriormente. Se usaron entre $1,0 \times 10^9$ y $2,5 \times 10^9$ partículas víricas para cada muestra. Se aisló el virus a partir de la fracción punta de gradiente de cesio y se determinó mediante transferencia con mancha, y se dializó frente a $0,5 \times$ PBS que contenía $MgCl_2$ antes de la electroforesis en gel de poliacrilamida.

Ejemplo 5

Valoración de virus recombinante

Se obtuvieron fracciones de gradiente de CsCl mediante aspiración con aguja. Se obtuvo el índice de refracción usando un refractómetro (LICA Mark II), y se usó el índice para determinar la densidad de las fracciones. Se ensayaron alícuotas de $10 \mu l$ procedentes de fracciones de entre $1,36 \text{ g/ml}$ y $1,45 \text{ g/ml}$ para la presencia de partículas protegidas mediante hibridación por transferencia con mancha. Se diluyeron las alícuotas 1:40 en un tampón de dilución vírica (Tris HCl 50 mM , $MgCl_2$ 1 mM , $CaCl_2$ 1 mM 10 mg/ml de RNasa, 10 mg/ml de DNasa) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Se añadieron muestras Sarcosina (concentración final $0,5\%$) y EDTA (concentración final 10 mM) y se incubaron a 70°C durante 10 minutos. Se añadió Proteinasa K (Boehringer Mannheim) a una concentración final de 1 mg/ml y se incubaron las muestras a 37°C durante dos horas. Tras esta incubación se desnaturalizaron las muestras en NaOH (350 mM final) y EDTA 25 mM final). Se aplicaron las muestras a nitran equilibrado (Gene Screen Plus, NEN Life Science Products) usando un colector para transferencia con mancha (Minifold I, Schleicher and Schuell). Se sondeó la membrana con un fragmento de ADN de Lac Z marcado con ^{32}P -dCTP cebado aleatoriamente (Boehringer Mannheim). Se expusieron las membranas a película (BioMaxMR, Kodak) o a pantallas de formación de imágenes de fósforo (Molecular Dynamics) y se llevaron a cabo estimaciones de la intensidad usando el software ImageQuant (Molecular Dynamics). A continuación se dializó la fracción punta del virus en $1 \times$ PBS para transducir el título.

Se determinaron las transducciones de los títulos mediante tinción histoquímica para la actividad de Lac Z. Se habían infectado células HeLa con Ad dI309 a una multiplicidad de infección de 5 durante una hora. A continuación se lavaron las células con $1 \times$ PBS y se añadió medio preparado recientemente. Se usaron alícuotas procedentes de las fracciones punta del virus, equivalentes a $1,75 \times 10^8$ partículas para infectar células Hela. Se lavaron las células veinte a veinticuatro horas después con $1 \times$ PBS, se fijaron (formaldehído al 2% , glutaraldehído al $0,2\%$ en $1 \times$ PBS), se lavaron, y se tiñeron con 5'-Bromo-4-cloro-3-indoli- β -D-galactopiranosido (Gold Bio Technology), se disolvieron en N,N-dimetilformamida (Sigma), se diluyeron en 1 mg/ml en $1 \times$ PBS pH 7,8, ferrocianuro de potasio 5 mM , ferrocianuro de potasio 5 mM , $MgCl_2$ 2 mM a 37°C durante 12-24 horas. Las células HeLa teñidas se contaron en diez campos de microscopio de $400\times$. Se determinó el número de transducción promediando el número de células teñidas en los diez campos y multiplicando por el número de campos en la placa y dividiendo este número por el número de nanogramos de plantilla protegida.

Ejemplo 6

Microscopio de electrones

Se dializaron las fracciones punta de VAAr con el virión natural o los viriones mutagenizados en $0,5 \times$ PBS que contenía $MgCl_2$ $0,5 \text{ mM}$. Se colocó el virus en una cuadrícula de carbono descargada de brillo de malla 400 invirtiendo una gota de $10 \mu l$ de virus durante diez minutos a temperatura ambiente. Seguido por tres lavados con $1 \times$ PBS de un minuto cada uno. Se tiñó el virus en ácido fosfotúngstico al 1% durante un minuto. Se visualizaron los especímenes usando un microscopio electrónico Zeiss EM 910.

Ejemplo 7

Ensayo de unión a la heparina agarosa

Se dializaron virus recombinantes que contenían cápsidas naturales o inserción en las cápsidas frente a $0,5 \times$ PBS que contenía $MgCl_2$ $0,5 \text{ mM}$. Se unieron cien microlitros de cada virus a $100 \mu l$ de heparina agarosa de tipo 1 (H-6508 de Sigma, preequilibrado en veinte volúmenes de $0,5 \times$ PBS que contenía $MgCl_2$ $0,5 \text{ mM}$) a temperatura ambiente durante una hora en un tubo de microfuga de $1,5 \text{ ml}$. Después de cada etapa, se centrifugaron los lavados de unión y las muestras de eluciones a 2000 rpm (Sorvall MC 12V) durante dos minutos para recoger el sobrenadante. Se lavaron

las muestras seis veces con 0,5 ml de 0,5 x PBS que contenía MgCl_2 0,5 mM y se recogió el sobrenadante. Se eluyeron las muestras en tres etapas con volúmenes de 100 μl que contenían 0,5, 1,0 y 1 M de NaCl en 0,5 x PBS que contenía MgCl_2 0,5 mM, y se recogió el sobrenadante. Se usaron 20 μl de sobrenadante para cada muestra procedente de cada etapa para la hibridación por transferencia con mancha. El 100% del control de la unión fue un patrón equivalente normalizado a un quinto de cada entrada de virus usados en la transferencia con mancha. Las mezclas de heparina agarosa vírica se lavaron seis veces con 0,5 x PBS, MgCl_2 0,5 mM en volúmenes que dieron como resultado una dilución 1:15625.

10 Ejemplo 8

Construcción de mutaciones insercionales en VAA2r

Con el fin de evaluar el papel de las proteínas estructurales de VAA en el ensamblaje y la infectividad, se generaron una colección de mutantes de inserción del enlazante de la cápsida. Se subclonó un fragmento *Hind III* de 2,8 kb de pVAA/Ad (Samulski y col., (1989) J. Virology 63:3822) que contenía las secuencias que codificaban las región de la cápsida de VAA2. Este plásmido, pAV2Cap, se usó en la digestión parcial con *Hae III*, *Nla IV*, y *Rsa I* para generar un sustrato para las inserciones específicas de la cápsida (Fig. 1). Estos tres enzimas de restricción del ADN constituyen 43 emplazamientos que se expanden a través de la secuencia de codificación de la cápsida de VAA-2 de la que únicamente solapan 4. Para identificar eficazmente los clones que contienen las inserciones, se unió un gen de resistencia a la kanamicina (Kan^r) flanqueado por un novedoso oligo (*Nae I/EcoR V*) con pAV2Cap linealizado de longitud completa, parcialmente digerido (véase el Ejemplo 3 y la Fig. 1). Usando la selección mediante ampicilina y kanamicina en *E. coli*, se identificaron los mutantes de inserción y se transportó el gen Kan^r fuera de la región de codificación de la cápsida mediante digestión y religadura con la pareja anidada de emplazamientos *Eco Rv* (véase el Ejemplo 3). Esto dio como resultado una inserción específica del enlazante de 12 pares de bases (pb) que transportan una copia única del único emplazamiento *Eco Rv* en las secuencias de codificación de la cápsida. Las posiciones exactas de inserción del enlazante se refinaron adicionalmente mediante digestiones con os enzimas de restricción, y en la secuenciación de seis casos (no se muestran los datos). Se identificaron las posiciones de los mutantes de inserción, mediante la primera letra usada en la digestión parcial seguida por la posición del nucleótido del emplazamiento de restricción en el genoma de VAA2, por ejemplo *Nla IV* 4160 sería N4160.

Se subclonaron las secuencias de codificación de la cápsida procedentes de estos mutantes de inserción mapeados en los vectores auxiliares pACG2 o pVAA/Ad para la caracterización biológica *in vivo* (Fig. 1) (Li y col., (1997) J. Virology 71:5236; Samulski y col., (1989) J. Virology 63:3822). El análisis de la secuencia predice que la inserción de estos 12 pares de bases no puede dar como resultado un codón de terminación para cualquiera de los 43 emplazamientos de inserción (Tabla 1). Debido a la naturaleza aleatoria del emplazamiento de corte para los enzimas (*Hae III*, *Nla IV*, y *Rsa I*) con respecto a la utilización del marco del codón y a la degeneración de la secuencia de reconocimiento de *Nla IV*, el enlazante de los 12 pares de bases dio como resultado la inserción de los aminoácidos GDIA en el marco 1 y AISP en el marco 3 para los tres enzimas, mientras que las inserciones en el marco 2 dieron como resultado WRYRH para *Rsa I*, GRYRP para *Hae III*, y GRYRP y GRYRH para *Nla IV*. El aminoácido en negrita en estos ejemplos representa la mutación sin sentido (Tabla 1). Las construcciones auxiliares mutantes, pACG2^{IN}, se transfectaron individualmente en células 293 junto con un vector indicado de VAA, que contenía el gen de la β -galactosidasa en células infectadas con el adenovirus dI309 (MOI = 5) (Li y col., (1997) J. Virology 71:5236). A continuación se evaluaron las células transfectadas para la expresión de la cápsida y la producción de virus recombinante (véase el Ejemplo 5; Li y col., (1997) J. Virology 71:5236).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 340 230 T3

TABLA I

Estructura física y fenotipo de los mutantes de inserción de la cápsida de VAA2

Posición ¹ Insertada	Subunidad de la cápsida	Marco	Inmunotr ansteren cia ³	Infecc iones	Heparina Agarosa ⁵	Microsc opía electró nica	Fenoti po	Aminoá cido ⁶
H2285	VP1	3	2,8 x 10 ⁷	-	+	normal	Clase II	AISP
R2356	VP1	2	1,4 x 10 ⁸	+	+	N.D.	Clase III	WRYRH
N2364	VP1	I	-	-	N.D.	N.D.	Clase I	GDIA
H2416	VP1	2	1,4 x 10 ⁷	-	+	N.D.	Clase II	GRYRP
H2591	VP1	3	1,4 x 10 ⁷	+	+	normal	Clase III	AISP
H2634	VP2	1	2,8 x 10 ⁷	-	+	normal	Clase II	GDIA
H2690	VP2	3	7,0 x 10 ⁶	+	+	normal	Clase III	AISP
R2747	VP2	3	-	-	N.D.	N.D.	Clase I	AISP
H/N2944	VP3	2	1,4 x 10 ⁶	++	N.D.	N.D.	Clase II/III	GRYRP
N3317	VP3	3	1,4 x 10 ⁵	-	N.D.	N.D.	Clase II	AISP
R3391	VP3	2	-	-	N.D.	N.D.	Clase I	WRYRH
N3561	VP3	1	-	-	N.D.	N.D.	Clase I	GDIA
H3595	VP3	2	1,4 x 10 ⁶	++	N.D.	anormal	Clase II/III	GRYRP
H/N3761	VP3	3	1,4 x 10 ⁷	-	-	normal	Clase II	AISP
H3766	VP3	2	2,8 x 10 ⁷	-	N.D.	N.D.	Clase II	GRYRP
N4046	VP3	3	-	-	N.D.	N.D.	Clase I	AISP
H/N4047	VP3	1	-	-	N.D.	N.D.	Clase I	GDIA
N/R4160	VP3	3	1,4 x 10 ⁷	+	+	normal	Clase	AISP

							III	
5	1. La letra se refiere a la enzima de restricción usada en la digestión parcial y el número se refiere al nucleótido del emplazamiento de restricción en la secuencia de AAV2.							
10	2. Marco de lectura del emplazamiento de restricción.							
	3. El número de partícula por microlitro de muestra. (-) = $<10^5$ genomas.							
15	4. Se realizaron las infecciones usando $1,75 \times 10^8$ partículas de mutantes de inserción de VAAr en células HeLa infectadas con adenovirus.							
20	5. Mediante unión discontinua y ensayo por infección de células HeLa (Clase III) o mediante inmunotransferencia (Clase II).							
25	6. Los aminoácidos se diferencian dependiendo del marco de inserción. El aminoácido en negrita es una mutación sin sentido.							

Ejemplo 9

Análisis de las proteínas de la cápsida

Antes de evaluar la producción del vector usando construcciones de cápsidas mutantes en los ensayos de complementación, se ensayo cada mutante de inserción para la expresión de las subunidades de la cápsida en células 293 tras la transfección. La capacidad para producir Vp1, Vp2, y Vp3 en la estequiometría normal sugeriría que las inserciones del enlazante no alteran la expresión de la proteína de la cápsida, o la estabilidad. Debido a que el enlazante no introduce codones de detención, se esperaba que cada inserción produjera las tres cápsidas. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se analizaron los lisados celulares mediante transferencia Western de las cápsidas de VAA. El análisis de transferencia Western en la Figura 2 es una representación de la expresión de la cápsida por el mutante de inserción en los lisados celulares. Con la excepción de H2634 (Fig. 2 banda 2), la estequiometría de las tres subunidades de la cápsida no parece significativamente diferente que la de los controles naturales (la Fig. 2 compara las bandas 1,3-7 con la banda 8). Mediante este ensayo, el mutante de inserción H2634 parece producir únicamente las subunidades Vp3 (Fig. 2; banda 2). En exposiciones más largas, fueron aparentes las subunidades menores de la cápsida en la bandas 4 y 5 de la Figura 4 (no se muestran los datos).

Ejemplo 10

Capacidad de la cápsida mutante para producir viriones estables

Para ensayar la producción de viriones estables que protejan un genoma de vector de la digestión con DNasa, se sometieron los lisados celulares a centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Se midieron las densidades de los virus mediante refractometría, y se sometieron alícuotas de fracciones apropiadas a la hibridación por transferencia con mancha (Fig. 3a). Basándose en este análisis, las partículas que empaquetan genomas recombinantes intactos deberían mostrar una densidad flotante similar a la natural y ser resistentes al tratamiento con la DNasa, con la excepción de H2944 que tiene una densidad flotante ligeramente mayor que la natural. Los resultados de este ensayo separaron los mutantes de inserción en dos tipos. Los mutantes de tipo I fueron negativos para proteger el genoma vírico, mientras que los mutantes de tipo II parecieron normales para empaquetar y proteger el sustrato del vector (Tabla I).

Todos los mutantes de tipo II tuvieron una densidad flotante comprendida en el intervalo de las cápsidas de VAA2 naturales (Fig. 3a). Mediante el análisis de la transferencia con mancha, N2944 empaquetó el genoma recombinante pero migró a una posición de densidad ligeramente mayor que la natural en gradientes isopícnicos (Fig. 3a, N2944 banda 3). Numerosos mutantes de inserción (7) no empaquetan el ADN mediante este ensayo, que tuvo una sensibilidad $< 1 \times 10^5$ partículas/ μ l (véanse los procedimientos de cuantificación) (Tabla 1). Queda sin determinar si estos mutantes fueron defectivos en el empaquetado o inestables durante la purificación.

Ejemplo 11

Infectividad de los mutantes de inserción de tipo II

- 5 Se ensayaron los viriones generados por los mutantes de inserción en el ensayo de complementación para la infectividad vigilando la transducción del gen Lac Z en células humanas. Usando títulos víricos derivados de la hibridación por transferencia con mancha, se infectaron células HeLa con depósitos de virus mutante en números de partículas equivalentes.
- 10 Veinticuatro horas después de la infección, se detectó la expresión del transgen mediante tinción con X-gal. Se muestra una figura representativa de este análisis (Fig. 3b) y todos los mutantes evaluados se presentan en la Tabla 1. En este ensayo, los viriones naturales transdujeron de $5,6 \times 10^5$ células HeLa/ $1,75 \times 10^8$ partículas protegidas (Fig. 3b). Basándose en la sensibilidad de este ensayo, el intervalo de eficacia de infección para los virus mutantes de inserción de tipo II fue de 0 a $1,6 \times 10^6$ unidades de transducción/ $1,75 \times 10^8$ partículas protegidas.
- 15 Los resultados de este análisis subdividieron adicionalmente los mutantes de inserción de la cápsida de tipo II (normal para el empaquetado y la protección del sustrato del vector) en un fenotipo de tipo II (normal para el empaquetado y la protección del sustrato del vector y de los viriones infecciosos). Dos mutantes de inserción, negativos para la infectividad e identificados inicialmente como mutantes de tipo II (N2944, H3595) basándose en la purificación con CsCl y la protección de la DNasa, se ensayaron positivos para la transducción vírica tras la purificación, usando un gradiente por etapas de iodixanol (Tabla 1) Esta técnica de purificación del virus no es tan rigurosa como la de CsCl y se ha demostrado que aumenta la recuperación del virus en diez veces (Zolotukhin y col., (1999) Gene Therapy 6:973). Sin embargo, otros mutantes de tipo II permanecieron no infecciosos tras la purificación usando un gradiente por etapas de iodixanol (no se muestran los datos). Aunque los inventores determinaron que los virus mutantes de inserción N2944 y H3595 fueron infecciosos usando el ensayo de transducción de Lac Z, debe señalarse que estos mutantes dieron como resultado títulos infecciosos bajos (1×10^2 unidades de transducción/ng) similares a los de los mutantes *lip* anteriormente publicados (Hermonat y col., (1984) J. Virology 51:329).

Ejemplo 12

Microscopio electrónico para los mutantes de tipo II y tipo III

- 35 Para caracterizar los mutantes de inserción de tipo II y III de VAA2r para las diferencias biológicas, se visualizaron las partículas mutantes mediante microscopio electrónico (ME) El análisis mediante ME desveló únicamente la morfología gruesa de los virus infecciosos de tipo III, que fueron indistinguibles de los viriones naturales (Comparar la Fig. 4a, y la 4B,c). Mientras que se observaron distintas diferencias entre el virus mutante H3595 de tipo II/III en comparación con los viriones naturales (Fig. 4a, y 4f-inferior cuatro paneles). Las imágenes de ME de H3595 desvelaron un perfil pentagonal ligeramente más rugoso, mientras que los virus naturales aparecieron uniformes en tamaño y eran hexagonales. De manera interesante, el mutante H2634 de tipo II, que era negativo para Vp1 o Vp2 mediante la transferencia Western (Fig. 2 banda 2), apareció con morfología normal mediante análisis con ME (Fig. 4d). Basándose en este análisis, la morfología del virión sola no es suficiente para distinguir los mutantes de tipo II de los de tipo III debido a que pequeñas inserciones en el interior de las cápsidas pueden dar como resultado alteraciones tanto no detectables (Figura. 4b, c, d, e) como notificables, en la estructura del virión (Fig. 4f-inferior cuatro paneles). Sin embargo, ésta solución fue capaz de proporcionar datos adicionales para la caracterización por parte de los inventores de estos mutantes de inserción enlazantes (Fig. 4, comparar a a f).

Ejemplo 13

Relación de la cápsida de los viriones de tipo II y tipo III

- 55 Rose y col. (1971) establecieron que las partículas de VAA2 están compuestas por Vp1, Vp2, y Vp3 en una relación 1:1:20 (Rose y col., (1971) J. Virology 8:766). En un esfuerzo por determinar si los viriones mutantes de tipo II y tipo II mantenían esta relación, se llevaron a cabo transferencias Western en el virus purificado con cloruro de cesio. Los virus purificados analizados mediante transferencias Western mostraron cantidades similares de Vp3 en todos los mutantes muestreados (Fig. 5, Vp3 flecha), se usaron entre 1×10^9 y $2,5 \times 10^9$ partículas víricas para cada muestra. Las cantidades de Vp2 y Vp1 son también casi equivalentes en todas las muestras de ensayo excepto H2634 en la que no se observaron componentes menores de la cápsida (Fig. 5, banda 5). La ausencia de componentes menores de la cápsida para H2634 es consistente con los resultados de transferencia Western procedentes del lisado celular (Fig. 2). Al límite de la detección en este ensayo, el mutante de inserción H2634 de tipo II parece asemejarse a viriones de VAA sin Vp1 y Vp2, incluso aunque el análisis de ME sugiere que este mutante tiene morfología normal (Fig. 4d).

65

Ejemplo 14

Unión a la heparina de los mutantes de tipo II y tipo III

Recientemente, el laboratorio de los investigadores estableció que VAA-2 usa un proteoglicano de sulfato de heparán como receptor primario para la infectividad (Summerford y Samulski, (1998) J. Virology 72:1438). Para determinar que papel tiene la unión con la heparina en la incapacidad de las partículas de tipo II de infectar células y en la capacidad del virus de tipo III de unirse a la heparina agarosa, se llevaron a cabo experimentos de unión con un lote de heparina. No sorprendentemente, los mutantes de tipo III fueron positivos para la unión con la heparina, eluyendo la mayoría de virus en la etapa del NaCl₂ 1 M (no se muestran los datos). Para determinar si la pérdida de infectividad de los virus mutantes de tipo II estaba relacionada con una ausencia de unión a la heparina, se analizaron los experimentos de unión del lote mediante hibridación por transferencia con mancha (Fig. 6). Para cada muestra vírica ensayada, se imprimió un control interno para determinar el 100% de unión en el filtro, independiente de la unión con la heparina (Fig. 6; 100% de unión). Esto permitió a los inventores determinar el porcentaje de virus retenido, en cada etapa de la purificación con heparina. Tras la unión a la heparina agarosa, se lavaron las muestras, a continuación se eluyeron usando concentraciones crecientes de sal (véase el Ejemplo 7). El VAA2 con estructuras de viriones naturales demostró un 90% de unión con un 10% liberado en el lavado seguido por un 60% recuperado en el tampón de elución, y el 20% restante unido a la heparina agarosa (Fig. 6, Banda 1). Los mutantes de tipo II H2285, H2416, y H2634 demostraron similar unión y perfiles de elución (Fig. 6, bandas 2-4). Sin embargo, el mutante de tipo III H3761 era distinto en su perfil de unión a la heparina agarosa con la mayoría del virión en el tampón de unión y los lavados (Fig. 6, banda 5). Se requiere análisis adicional para determinar la razón de la ausencia de unión a la heparina en este lote de ensayo.

De manera interesante, H2634 se une a la heparina agarosa en estas condiciones, que mediante transferencia Western no transporta subunidades Vp1 o Vp2 detectables (Fig. 5, banda 4). La ausencia de Vp1 y Vp2 en H2634 junto con su capacidad de unirse a la heparina agarosa sugiere que la región de unión con la heparina puede estar localizada en las proteínas Vp3 de la cápsida.

Ejemplo 15

Mutantes de inserción enlazantes

Se insertaron secuencias de inserción que codificaban poli-lisina, poli-histidina, un motivo RGD, o bradiquinina en los mutantes enlazantes descritos en la Tabla 1. Los inventores desarrollaron un procedimiento basado en la PCR para identificar las inserciones de diferentes enlazantes en la región de codificación del gen de la cápsida de VAA. De manera breve, se usó un cebador exterior de la región de codificación de la cápsida y uno que correspondía exactamente al enlazante. Si el enlazante está en la orientación correcta, entonces el producto de la PCR es de un tamaño que es dependiente en la posición del mutante de inserción.

Tras la transformación de las reacciones de ligadura, se repicaron colonias bacterianas con una punta de pipeta y se sumergieron 5-6 veces en un pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía medio LB con antibiótico. A continuación se colocó la punta de la pipeta en un pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía tampón de reacción de la PCR. Se hicieron avanzar los productos de la PCR en un gel de agarosa, y se identificaron los clones positivos. Esta información indicó la orientación y la posición del mutante de inserción con respecto al cebador exterior.

Se usó medio LB que está en el pocillo correspondiente como los PCR positivos, y se hizo crecer este material en un volumen más grande (5 ml). Tras una fase de crecimiento durante la noche, se aisló el plásmido de ADN y se digirió con una enzima que restringe el ADN 15 veces (Bst NI). Estos productos de la digestión se separaron en un gel de acrilamida al 5-6%. Dependiendo del tamaño de la inserción del enlazante y del tamaño del correspondiente fragmento sin insertar, se determinó el número de inserciones. De esta manera, en los dos días de ligadura del enlazante en el emplazamiento de inserción, los inventores conocen la orientación y el número de inserciones de enlazante, y los inventores tienen suficiente ADN para transfectar una placa de 10 cm para la producción del virus.

pACG2 (Li y col., 1997 J. Virology 71:5236) sin ninguna inserción cuando se digirió con Bst NI dio como resultado fragmentos de:

3900 pb
1121 pb
1112 pb
445 pb -cambios en H2944
347 pb -cambios en H2634, H2690

ES 2 340 230 T3

253 pb -cambios en H3595

215 pb -cambios en R2356, H2416

121 pb

111 pb

64 pb

63 pb -cambios en H2285

33 pb -cambios en H2591

13 pb

9 pb

Se indican también los cambios de bandas con los diferentes mutantes de inserción.

pACG2 sin ninguna inserción cuando se digirió con Ban I dio como resultado fragmento de:

2009 pb

1421 pb

168 pb

843 pb -cambios en H4047

835 pb

734 pb -cambios en H2634

464 pb

223 pb

218 pb

211 pb

50 pb

Cada una de las inserciones contiene los 12 pb originales del emplazamiento Eco RV. Adicionalmente, cada uno de los enlazantes añade pares de bases adicionales.

- RGD = $36 \text{ pb} + 12 = 48 \text{ pb}$ para una única inserción
- Bradiquinina (BRDY) = $69 \text{ pb} + 12 = 81 \text{ pb}$ para una única inserción. Nota: la inserción de BRDY contiene un emplazamiento BstNI.
- Histidina (8HIS) = $51 \text{ pb} + 12 = 63 \text{ pb}$ para una única inserción.
- Poli Lisina (PLY) = $63 \text{ pb} + 12 = 75 \text{ pb}$ para una única inserción.

El cebador exterior está próximo al emplazamiento Hind III y se denomina VAA2/4 59. Se puede usar este cebador para amplificar los serotipos 2 y 4 de VAA.

Se proporcionan a continuación las secuencias de los cebadores usados para producir epítomos enlazantes en los mutantes de inserción originales. Nota: debido a que existen tres marcos para los mutantes de inserción existen tres parejas de cebadores para cada conjunto de cebador.

ES 2 340 230 T3

Parejas de cebadores de la histidina

Marco 1

5 Un cebador superior de 48 mer (SEC DE ID N°: 9):

10 **5' -GCT AGC GGC GGA CAC CAT CAC CAC CAC CAT CAC CAC GGC
GGA AGC GCT- 3'**

Un cebador inferior de 48 mer (SEC DE ID N°: 10):

15 **5' -AGC GCT TCC GCC GTG GTG ATG GTG GTG GTG ATG GTG TCC
GCC GCT AGC- 3'**

20

Marco 2

Un cebador superior de 51 mer (SEC DE ID N°: 11):

25 **5' -AC GCT AGC GGC GGA CAC CAT CAC CAC CAC CAT CAC CAC GGC
GGA AGC GCT T- 3'**

30

Un cebador inferior de 51 mer (SEC DE ID N°: 12):

35 **5' -A AGC GCT TCC GCC GTG GTG ATG GTG GTG GTG ATG GTG TCC
GCC GCT AGC GT- 3'**

40 Marco 3

Un cebador superior de 51 mer (SEC DE ID N°: 13):

45 **5' -G GGT TCC GGA GGC CAC CAC CAT CAC CAC CAC CAT CAC GGA
GGC GCC AGC GA- 3'**

Un cebador inferior de 51 mer (SEC DE ID N°: 14):

50 **5' -TC GCT GGC GCC TCC GTG ATG GTG GTG GTG ATG GTG GTG CCC
TCC GGA ACC C- 3'**

55

Parejas de cebadores de la bradiquinina

Marco 1

60 Un cebador superior de 60 mer (SEC DE ID N°: 15):

65 **5' -GCC GGA TCC GGC GGC GGC TCC AGA CCC CCC GGC TTC AGC
CCC TTC AGA TCC GGC GGC GCC- 3'**

ES 2 340 230 T3

Un cebador inferior de 60 mer (SEC DE ID N°: 16)

5' -GGC GCC GCC GGA TCT GAA GGG GCT GAA GCC GGG GGG TCT
GGA GCC GCC GCC GGA TCC GGC- 3'

Marco 2

Un cebador superior de 69 mer (SEC DE ID N°: 17):

5' -GA GGT TCA TGT GAC TGC GGG GGA AGA CCC CCT GGC TTC AGC
CCA TTC AGA GGT GGC TGC TTC TGT GGC G- 3'

Un cebador inferior de 69 mer (SEC DE ID N°: 18):

5' -C GCC ACA GAA GCA GCC ACC TCT GAA TGG GCT GAA GCC AGG
GGG TCT TCC CCC GCA GTC ACA TGA ACC TC- 3'

Marco 3

Un cebador superior de 60 mer (SEC DE ID N°: 19):

5'-A GGT TCA TGT GAC TGC GGG GGA AGA CCC CCT GGC TTC AGC
CCA TTC AGA GGT GGC TGC TTC TGT GGC GG- 3'

Un cebador inferior de 60 mer (SEC DE ID N°: 20):

5' -CC GCC ACA GAA GCA GCC ACC TCT GAA TGG GCT GAA GCC AGG
GGG TCT TCC CCC GCA GTC ACA TGA ACC T- 3'

Las parejas de cebadores de RGD

Marco 1

Un cebador superior de 36 mer (SEC DE ID N°: 21):

5' -GGA TCC TGC GAC TGC AGG GGC GAT TGT TTC TGC GGC- 3'

Un cebador inferior de 36 mer (SEC DE ID N°: 22):

5' -GCC GCA GAA ACA ATC GCC CCT GCA GTC GCA GGA TCC- 3'

Marco 2

Un cebador superior de 36 mer (SEC DE ID N°: 23):

5' -GA TCC TCG GAC TGC AGG GGC GAT TGT TTC TGC GGC G- 3'

ES 2 340 230 T3

Un cebador inferior de 36 mer (SEC DE ID N°: 24):

5' -C GCC GCA GAA ACA ATC GCC CCT GCA GTC GCA GGA TC- 3'

Marco 3

Un cebador superior de 36 mer (SEC DE ID N°: 25):

5' -A GGA TCC TGC GAC TGC AGG GGC GAT TGT TTC TGC GG- 3'

Un cebador inferior de 36 mer (SEC DE ID N°: 26):

5' -CC GCA GAA ACA ATC GCC CCT GCA GTC GCA GGA TCC T- 3'

Pareja de cebadores de la polilisina

Nota: únicamente se llevó a cabo la pareja de cebadores del marco tres.

Marco 3

Un cebador superior de 63 mer (SEC DE ID N°: 27):

5' -A GGT TCA TGT GAC TGC GGG GGA AAG AAG AAG AAG AAG AAG
AAG GGC GGC TGC TTC TGT GGC GG- 3'

Un cebador inferior de 63 mer (SEC DE ID N°: 28):

5' -CC GCC ACA GAA GCA GCC GCC CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT
TCC CCC GCA GTC ACA TGA ACC T- 3'

Cebador exterior de VAA 2/4 5' del cebador superior (SEC DE ID N°: 29):

5' -TGC CGA GCC ATC GAC GTC AGA CGC G- 3'

Se insertó el enlazante de RGD en los mutantes H2285, R2356, H2591, H2634, H2690, H/N3761, y H/N4047 de la Tabla 1.

Se insertó el enlazante de la bradiquinina en los mutantes H2285, H2416, H2591, H2634, H2690, H/N2944, y H/N3761 de la Tabla 1.

Se insertó el enlazante de poli-Lys en los mutantes H2285, H2591, H2690, y H/N3761 de la Tabla 1.

Se insertó el enlazante poli-His en los mutantes H2285, H2416, H2591, H2634, H2690, H/N2944, N3561, H3766, y H/N4047 de la Tabla 1.

Ejemplo 16

Caracterización de los mutantes de inserción

Todos los mutantes de inserción en el emplazamiento H2690 tienen títulos similares a los de la inserción original de 12 pb. Usando el ensayo ELISA y el anticuerpo poliHis dirigido contra la histidina, se demostró que se presentaban inserciones en este emplazamiento en la superficie del virión.

ES 2 340 230 T3

Se demostró también que estaba en la superficie el epítipo de poliHis cuando se insertó en el emplazamiento H2634. De manera interesante, el análisis de transferencia Western de la inserción en H2634, no demostró que se estaba formando ninguna subunidad VP1 o VP2. Se ha determinado que esta inserción en VP2 está próxima a la señal de localización nuclear de las subunidades VP1 y VP2. Es posible que esta región estuviera perturbada por la inserción original, y que la región se reparara con la adición de 8-histidinas. Aunque la transferencia con mancha de este virus 8His demostró la presencia de partículas víricas, estas partículas no fueron infecciosas.

El emplazamiento de inserción H2591 está en VP1. La inserción de epítipos enlazantes en este emplazamiento no afecta el título mucho más que la inserción original de 12 pb en este emplazamiento (Tabla 1).

La inserción en el emplazamiento N4160 está en VP3 próxima al término carboxi. Este mutante de inserción es de interés debido a que la inserción original de 12 pb infecta la célula a un nivel equivalente al natural (Tabla 1).

El mutante R3317, que se ha descrito anteriormente en la Tabla 1, pareció proteger los viriones mediante el análisis de transferencia con mancha. Repitiendo este experimento con el transgen LacZ, se observaron los mismos resultados, es decir, no había partículas protegidas. Sin embargo, cuando se usa un clon independiente y el transgen GFP (~ 1000 pb más pequeño que LacZ), se observaron partículas protegidas. Adicionalmente, el virión de expresión de GFP transdujo células HeLa a elevados niveles, equivalentes a los naturales. No está claro qué resultados dispares se observaron con diferentes transgenes.

Adicionalmente, se insertó un enlazante que codificaba la región de unión con la heparina del virus respiratorio sincitial en el mutante H2690 en un emplazamiento que tolera las inserciones sin pérdida de viabilidad (Tabla 1) para restaurar la unión con a heparina de este mutante.

Ejemplo 17

Mutantes con emplazamiento de restricción único

Se prepararon emplazamientos de restricción únicos en la cápsida de VAA de tipo 2 para facilitar la generación de mutantes insercionales. Los emplazamientos fueron elegidos de manera que las mutaciones introducidas en la secuencia de nucleótidos de la cápsida fueron conservativas, es decir, no eran mutaciones sin sentido o daban como resultado codones de detención. Se eligieron los aminoácidos en las posiciones 586, 529, 595, 552, y 517 (metionina VP1 como aminoácido n°1). Para todas estas posiciones, excepto la 529, se construyeron emplazamientos Hpa I. Para el emplazamiento del aminoácido 529, se construyó un único emplazamiento Eco RV. Cada uno de estos emplazamientos de restricción únicos dio como resultado un producto de digestión en marco con los extremos enromados. Así, se usaron enlazantes marco 1 para inserción en estos emplazamientos. Se usaron cebadores solapantes para generar los emplazamientos únicos, y se usaron cebadores exteriores para generar los fragmentos izquierdo y derecho de la inserción.

El fragmento derecho se digirió a continuación con Nsi I y cualquiera de Eco RV o Hpa I, y el fragmento izquierdo con Hind III y cualquiera de Eco RV o Hpa I. Los autores clonaron estos productos de digestión en el vector pACG que ya se había digerido con Hind III y Nsi I. El plásmido resultante se digirió a continuación con Xcm I y Bsi WI. Estas enzimas dieron como resultado un fragmento de ~750 pb alrededor del emplazamiento de restricción único construido. Esta estrategia dará por resultado la acumulación de menos errores puesto que las secuencias generadas mediante la PCR son más pequeñas.

Los cebadores:

595 cebador superior (SEC DE ID N°:30):

5' -GCA GAT GTT AAC ACA CAA GGC GTT CTT CCA- 3'

595 cebador inferior (SEC DE ID N°:31):

5' -TTG TGT GTT AAC ATC TGC GGT AGC TGC TTG- 3'

586 cebador superior (SEC DE ID N°:32):

5' -CAG AGA GTT AAC AGA CAA GCA GCT ACC GC- 3'

ES 2 340 230 T3

586 cebador inferior (SEC DE ID N°:33):

5' -GTC TGT TAA CTC TCT GGA GGT TGG TAG ATA- 3'

Nota: esta construcción da como resultado una mutación sin sentido de Glicina a Valina.

552 cebador superior (SEC DE ID N°:34):

5' -ACA AAT GTT AAC ATT GAA AAG GTC ATG ATT- 3'

552 cebador inferior (SEC DE ID N°:35):

5' -TTC AAT GTT AAC ATT TGT TTT CTC TGA GCC- 3'

529 cebador superior (SEC DE ID N°:36):

5' -GGA CGA TAT CGA AAA GTT TTT TCC TCA G- 3'

529 cebador inferior (SEC DE ID N°:37):

5' -ACT TTT CGA TAT CGT CCT TGT GGC TTG C- 3'

Nota: Esta construcción da como resultado una mutación sin sentido de Ácido glutámico a Isoleucina.

517 cebador superior (SEC DE ID N°:38):

5' -TCT CTG GTT AAC CCG GGC CCG GCC ATG GCA- 3'

517 cebador inferior (SEC DE ID N°:39):

5' -GCC CGG GTT AAC CAG AGA GTC TCT GCC ATT- 3'

Los cebadores exteriores fueron:

cebador 5' (SEC DE ID N°:40):

5' -TGC GCA GCC ATC GAC GTC AGA CGC G- 3'

cebador 3' (SEC DE ID N°:41):

5' -CAT GAT GCA TCA AAG TTC AAC TGA AAC GAA T- 3'

También se generaron cuatro clones con los enlazantes RGD y 8His (Ejemplo 15) insertados en el emplazamiento Eco RV 529. Se generaron cinco mutantes de inserción con enlazantes 8His y uno con el enlazante RGD en el emplazamiento Hpa I 586.

Las mutaciones sin sentido con un emplazamiento de restricción único en 3790-3792 (aminoácido 529; EcoRV) infectó células HeLa, aunque con una eficacia relativamente baja (-1/100 a -1/1000 de tipo natural). Cuando la inserción del epítipo 8His se insertó en este emplazamiento, el virus resultante tuvo un fenotipo *lip* (es decir, una partícula poco infecciosa).

ES 2 340 230 T3

Ambas inserciones en el emplazamiento de restricción único en 3960-3961 (aminoácido 586; Hpa I) tanto con 8His como con RGD resultaron muy infecciosas, transduciendo células HeLa al menos también como el virus de tipo natural.

5 Ejemplo 18

Mutantes dobles

Se generaron mutantes dobles usando el mutante único H3761 (Tabla 1) como plantilla. El mutante de inserción
10 H3761 no se enlaza al sulfato de heparina evaluado en experimentos de enlace tanto discontinuos como en columna. Este mutante es interesante porque no infecta ninguna de las líneas celulares ensayadas hasta el momento, aunque los análisis mediante microscopía electrónica sugieren que este virus forma estructuras normales de parvovirus, y mediante hibridación por inmunotransferencia, este virus empaqueta eficazmente el genoma vírico.

15 La región de la cápsida que codifica la secuencia que contiene la inserción H3761 se subclonó en otros mutantes de inserción para crear mutantes dobles. Se eligió el mutante de inserción H2690 (AA n° 163) debido a que había demostrado que presentaba epítomos de inserción poli-His sobre la superficie vírica (según se evalúa usando el anticuerpo conformacional específico para unir el virus a una placa ELISA y un anticuerpo dirigido contra la histidina preconjugado con peroxidasa de rábano picante para detectar los virus que contienen histidinas).

20 Tanto el plásmido auxiliar H2690 con mutante de inserción (pACG H2690 BRDY) que contiene la inserción de bradiquinina (Ejemplo 15) como el mutante de inserción pACG H3761 se digirieron con Hind III y Bsi WI. El emplazamiento Hind III está en el gen rep, mientras que el emplazamiento Bsi WI está entre 2690 y 3761. El fragmento pequeño pACG H2690 BRDY mientras que el fragmento grande contiene pACG H3761.

25 Un mutante doble H2690 BRDY H3761, con la inserción de bradiquinina insertado en el emplazamiento H2690, demostró un aumento de la infectividad de cinco veces en células A9 que expresaban el receptor de bradiquinina en comparación con las células A9 parentales solas. Estos resultados indican (1) el defecto en la unión H3761 del se produce probablemente en el punto de unión a los receptores de SH celulares, pero este virus retiene la infectividad si
30 se dirige al interior de las células por otra ruta, y (2) el doble mutante de bradiquinina dirigió la entrada del virus a las células que expresaban el receptor de de bradiquinina.

El mutante de inserción H3761 también se clonó en las mutaciones sin sentido con un emplazamiento de restricción único (Ejemplo 17), AA n° 586 (Hpa I) y AA n° 529 (EcoRV). La enzima de restricción NcoI se ubica entre H3761
35 y las mutaciones sin sentido 529 (Glu→Ile) y 586 (Gly→Val), y esta enzima corta dentro del gen rep. Digiriendo el plásmido auxiliar pACG2 que contiene H3761 y se aislaron los emplazamientos únicos 586 y 529 con Nco I, el fragmento pequeño Nco I (3142 pbs) que contiene la mutación por inserción H3761 y el fragmento grande (5034 pbs) Nco I que contiene los emplazamientos únicos 586 y 529. Tras la ligadura, se estabilizaron las construcciones con la orientación correcta, y estos clones se usaron para preparar virus.

40 Las mutaciones sin sentido con un emplazamiento de restricción único que contenía el motivo RGD (Ejemplo 15) también se usaron en esta estrategia de clonación. De esta manera hay mutantes dobles que no contienen insertos en los emplazamientos únicos y mutantes dobles que contienen epítomos RGD en dichos emplazamientos.

45 El mutante H3761 no transduce células HeLa o CHO-K1. Por el contrario, los mutantes dobles 586-RGD presentan transducción de ambos tipos celulares. Estos resultados sugieren fuertemente que la transducción estaba mediada por el motivo RGD introducido en el emplazamiento de restricción único 586.

50 Los mutantes dobles con los emplazamientos de restricción únicos, pero sin inserciones, y el mutante doble 529-RGD no mostraron transducción eficaz en las células HeLa o CHO-K1.

Ejemplo 19

Vector de VAA dirigido por MSH

55 En una realización de la invención, se usó la hormona estimulante del melanocito (MSH) para dirigir vectores de VAA a células que expresaban receptores MSH. Los estudios han demostrado que este péptido dirigirá complejos asociados a ligando específicamente al interior de células de melanocito NEL-M1 (Murphy y col., (1986) Proc. Nat. Acad. Sci USA 83:8258), proporcionando un sistema de ensayo conveniente. Por ejemplo, la toxina diftérica unida
60 a un péptido de 12 restos que codificaba el ligando MSH resultó eficaz matando únicamente células que expresaban el receptor MSH (Morandini y col., (1994) Internat. J. Ca. 56:129). La muerte celular se atribuyó a la endocitosis mediada por el receptor de la administración específica de un ligando.

65 La MSH se insertó en el bucle 3 de la cápsida de VAA de tipo 2. En la primera etapa, se preparó un mutante de delección de VAA de tipo 2 con una delección de 12 aminoácidos en el que el fragmento Bgl II - SpH I se elimina de la secuencia que codifica el bucle 3. La secuencia que codifica el péptido MSH se insertó seguidamente en la región borrada.

ES 2 340 230 T3

Las secuencias de los cebadores para preparar las mutaciones de inserción en el bucle3 y en el bucle4 son como sigue:

Bucle 3 5' cebador superior (SEC DE ID N°:42):

5 - ' GATACTTAAGATCTAGTGGAACCACCACGCACTCAAGGCTT - 3 '

El ctttag es un emplazamiento Afl II, el agatct es un emplazamiento Bgl II. Estos dos emplazamientos se superponen en dos pares de bases. La homología con la secuencia del VAA se inicia en la posición 3556 y finaliza en la 3583.

Bucle 3 3' cebador inferior (SEC DE ID N°:43):

5 ' -CTAGCTTAAGCATGCATACAGGTACTGGTCGATGAGAGGATT - 3 '

El gcatgc es un emplazamiento SphI, y el ctttag es un emplazamiento Afl II. Estos dos emplazamientos se superponen en un par de bases. La homología con la secuencia del VAA se inicia en la posición 3505 y finaliza en la 3531 (nótese que se trata de la cadena inferior).

Estos cebadores eliminan 24 pb (es decir, 8 aminoácidos) de las secuencias de VAA tipo 2 desde 3532 a 3555. La secuencia de aminoácidos borrada es Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro desde el aminoácido 444 al 451 (siendo VP1-Met el aminoácido n°1).

Los 3'emplazamientos 5'Sph I Afl II Bgl II en la secuencia:

5'-GCATGCTTAAGATCT-3' dan como resultado la adición de 5 aminoácidos Ala Cys Leu Arg Ser.

El virus se produce mediante procedimientos convencionales de empaquetamiento. El vector VAA tipo 2 marcado con MSH se evalúa para transducción en células HeLa y receptores MSH (por ejemplo, melanocitos).

Ejemplo 20

Virus quimérico VAA2/4 - sustituciones en la proteína de la cápsida

Los viriones de los serotipos de VAA se fabricaron con tres subunidades de proteína VP1 VP2 y VP3. VP3 es la subunidad más abundante, representa entre 80-90% de las 60 subunidades que conforman el virión, representando cada una de VP1 y VP2 hasta el 5-10% del virión. Las subunidades se traducen a partir de una transcripción solapante, de manera que las secuencias de VP3 están entre ambas VP2 y VP1, y las secuencias de VP2 están dentro de VP1.

Los inventores diseñaron cebadores que permitían sustituir subunidades completas y regiones únicas de subunidades entre VAA2 y VAA4. VAA4 tiene propiedades que son significativamente diferentes de VAA2. Así, definir las regiones que representan estas propiedades diferenciadas sería valioso, por ejemplo, para diseñar vectores terapéuticos.

Los inventores han elegido una estrategia de clonación sin soldadura para clonar las subunidades o las regiones únicas de subunidades entre ambos serotipos.

cebador superior de VAA2 y VAA4 (SEC DE ID N°:44):

5 ' -TGC CGA GCC ATC GAC GTC AGA CGC G- 3 '

cebador inferior de VAA2 y VAA4 (SEC DE ID N°:45):

5 ' -CAT GAT GCA TCA AAG TTC AAC TGA AAC GAA T- 3 '

cebador superior de VAA2 VP3 (SEC DE ID N°:46):

5 ' -CGA GCT CTT CGA TGG CTA CAG GCA GTG GCG CAC- 3 '

ES 2 340 230 T3

cebador inferior de VAA2 VP3 (SEC DE ID N°:47):

5' -AGC GCT CTT CCC ATC GTA TTA GTT CCC AGA CCA GAG- 3'

cebador superior de VAA2 VP2 (SEC DE ID N°:48):

5' -CGA GCT CTT CGA CGG CTC CGG GAA AAA AGA GGC- 3'

cebador inferior de VAA2 VP2 (SEC DE ID N°:49):

5' -AGC GCT CTT CCC GTC TTA ACA GGT TCC TCA ACC AGG- 3'

cebador superior de VAA4 VP3 (SEC DE ID N°:50):

5' -CGA GCT CTT CGA TGC GTG CAG CAG CTG GAG GAG CTG- 3'

VAA4 VP3 cebador inferior (SEC DE ID N°:51):

5' -AGC GCT CTT CGC ATC TCA CTG TCA TCA GAC GAG TCG-3'

cebador superior de VAA4 VP2 (SEC DE ID N°:52):

5' -CGA GCT CTT CGA CGG CTC CTG GAA AGA AGA GAC- 3'

cebador inferior de VAA4 VP2 (SEC DE ID N°:53):

5' -AGC GCT CTT CCC GTC TCA CCC GCT TGC TCA ACC AGA- 3'

Estos cebadores darán como resultado el intercambio de subunidades que se muestra en la FIGURA 7. Se muestra en el Apéndice 2 (SEC DE ID N°:2) una secuencia representativa de una cápsida de VAA2 quimérica en la que se ha sustituido VAA4 Vp2. Esta secuencia contiene las secuencias que codifican rep de VAA2, la mayor parte de las secuencias de codificación de VAA2 Vp1 y Vp3 y la secuencia de codificación completa de VAA4 Vp2 y parte de las secuencias de codificación de VAA4 Vp1 y Vp3 en un esqueleto pBluescript.

La secuencia de codificación Rep68/78 comienza en el nu 251 de la SEC DE ID N°:2, y la secuencia de codificación Rep52/40 comienza en el nu 923. La señal de detención Rep78/52 finaliza en el nu 2114, y la detención de Rep68/40 en el nu 2180. La secuencia de codificación de la cápsida comienza en el nu 2133 y finaliza en el nu 4315 (Vp1 comienza en el nu 2133, Vp2 comienza en el nu 2544, Vp3 comienza en el 2724).

Las secuencias de VAA2 procedentes del segundo emplazamiento XhoI en el pb 2420 de Vp1 respecto del emplazamiento Bsi WI en el pb 3255 de Vp3 en los genes cap de VAA2 se sustituyeron por la región correspondiente de VAA4 (correspondiendo al nu 2350-3149 de la secuencia del plásmido). En resumen, el plásmido auxiliar de VAA2 pACG2 se digirió parcialmente con XhoI y Bsi WI liberando el fragmento de 835 pb. La misma digestión en VAA4 dio como resultado un fragmento de 799 pb que se unió a la secuencia borrada de VAA2 para producir el virus auxiliar que codifica la cápsida quimérica VAA2/4.

Se produjeron viriones que llevaban un genoma de VAA recombinante, preferiblemente un genoma de VAA2, expresando típicamente un gen indicador (por ejemplo GFP). Estos vectores víricos mutantes se caracterizan por la formación de viriones, morfología, protección del genoma, unión a heparina, e infectividad, como se describe en el Ejemplo 15.

Ejemplo 21

Construcción de vectores quiméricos B19/VAA-2

Los estudios de Dong y col., (1996) Human Gene Therapy 7:2101, determinaron las limitaciones del empaquetado usando vectores de VAAr. Usando plantillas de ADN de VAA recombinante con inserciones crecientes de ADN de

relleno, Dong y col. determinaron que la capacidad de empaquetado de los vectores de VAAr disminuía drásticamente entre el 104% y el 108% en peso (4883 vs. 5083 nucleótidos, respectivamente). Esta restricción de empaquetado impide el uso de genes importantes, incluyendo los minigenes de la distrofia muscular así como las secuencias del promotor regulado de la fibrosis cística.

Según esto, las presentes investigaciones consiguieron desarrollar un vector terapéutico derivado de B19/VAA-2 que mantiene la capacidad de empaquetado de B19, el tropismo de VAA-2, así como el funcionamiento como sustrato para vectores directores. El parvovirus humano B19 (capacidad de empaquetado de 5,6 kb) se eligió para utilizar la proteína estructural mayor Vp2 en la generación de un vector de VAA quimérico para empaquetar genomas de vectores grandes. B19 está compuesto por solo dos proteínas estructurales solapantes (Vp1 y 2). B19 infecta principalmente células progenitoras eritroides usando globósido como receptor (Brown y col., (1993) Science 262:114). Se ha determinado la estructura de B19 con una resolución de 8 Å (Agbandje-McKenna y col., (1994) Virology 203: 106).

Se construyó una partícula quimérica de VAA sustituyendo la proteína estructural mayor Vp3 por la Vp2 de B19. Se utilizó clonación sin fusión (Stratagene USA) para generar un constructo auxiliar de VAA que exprese todas las proteínas de VAA (Rep 78, 68, 52, 40 y Vp 1 y Vp2) sustituyendo B19 por la proteína mayor Cap de Vp3 (Figura 8; secuencia de nucleótidos del Apéndice 3 y la SEC DE ID N°:n; secuencia de aminoácidos del Apéndice 4 y la SEC DE ID N°:4).

El material de partida del vector quimérico fue pVAA-Ad y pYT103c. pYT103c contiene la región de codificación completa de B19 sin los duplicados terminales. La digestión con HindIII de pVAA-Ad liberó un fragmento de 2727 pb que contenía la región de codificación completa de la cápsida de VAA2 y algunas regiones flanqueantes. Este fragmento se subclonó en pBS+ (Stratagene) digerido por Hind III dando como resultado pBS+VAACap. Se usó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar la región de codificación de Vp2 procedente de pYT103c. Los cebadores fueron 5'-AGTTACTCTTCCATGACTTCAGTTAATTCTGCAGAA 3' (SEC DE ID N°:54) en la dirección 5' a 3' y 5'-AGTTACTCTTCTTTACAATGGGTGCACACGGCTTTT 3' (SEC DE ID N°:55) en la dirección 3' a 5'. Se usaron cebadores de pBS+VAACap para amplificación alrededor de Vp3 de VAA2. Los cebadores fueron 5'-AGTTACTCTTCTTAATCGTGGACTTACCGTGGATAC 3' (SEC DE ID N°:56) en la dirección 5' a 3' y 5'-AGTTACTCTTCCCATCGTATAGTTCCCAGACCAGA 3' (SEC DE ID N°:57), en la dirección 3' a 5'. Seis nucleótidos procedentes del extremo 5' de cada cebador forman un emplazamiento Eam 1104 I, este emplazamiento digiere en dirección 3' desde su emplazamiento de reconocimiento, en este caso el solapamiento es ATG y su complementario y un TAA y su complementario. Este emplazamiento se usa durante la estrategia de clonación sin fusión (Stratagene). La digestión de los productos de la PCR B19-Vp2 y VAA2 con Eam 1104-I y la clonación dieron como resultado un subclon de pBS+VAACap con Vp2 de B19 sustituido por Vp3 de VAA2. Este vector se digirió con Hind III y se volvió a clonar en pVAA-Ad y la orientación determinada resultó ser pVAA/B19-Ad (Apéndice 3; SEC DE ID N°:3). Esta secuencia codifica la región Vp1 de VAA2 (inicio en el nt 1), seguido por la región Vp2 de VAA2 (inicio en el nt 412), y a continuación la región Vp2 de B19 (inicio en el nt 607).

Ejemplo 22

Producción de virus quimérico

Se usó la construcción auxiliar pVAA/B19 en un sistema de empaquetamiento transitorio según se describe en el Ejemplo 1. En resumen, los plásmidos auxiliares pVAA/B19-Ad y pAB11 (que contienen los duplicados terminales de VAA2 y el gen de la β -galactosidasa bajo el control del promotor temprano CMV) se transfectaron simultáneamente en células 293 mediante fosfato de calcio. Doce horas después de la transfección, el medio se cambió, y se añadió el adenovirus dl309 (MOI-5). Cuarenta y ocho horas después las células se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Una parte de los residuos celulares se usó en un ensayo HIRT. El residuo celular se lisó en cloruro de cesio (1,39 g/ml), se sonicó y centrifugó a 41.000 rpm durante 72 horas. Se recuperaron las fracciones del gradiente de cesio, y se usaron muestras de cada una en hibridación por inmunotransferencia para ensayar el número de partículas de virus. Las inmunotransferencias se sondearon con el gen de la β -galactosidasa, y se determinaron los números de partículas respecto a las cantidades control del gen de la β -galactosidasa. Las fracciones punta que contenían virus se dializaron frente a PBS, glicerol al 20%.

Ejemplo 23

Infección de células por un virus quimérico

Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se generaron lisados celulares que se ensayaron para transducción en varias células dianas. Se generó un título de transducción de 2×10^6 . Se añadieron varios volúmenes de virus a líneas celulares 293, RT-2 de glioma de rata, glioma U-87, así como a dos líneas celulares de glioblastoma primario humano en pequeños volúmenes de medio. También se añadió virus a células UT7 de megacariocitos que se habían incubado en presencia de eritropoyetina (EPO) durante varias semanas. Se sabe que la exposición de las células UT7 a EPO vuelve estas células vulnerables a la infección por B19.

También se añadió adenovirus a un MOI de 5. Dos horas después de la infección, el virus se eliminó por lavado y se añadió medio fresco. Veinticuatro horas después de la infección, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron en formaldehído/glutaraldehído, y se tiñeron con X-gal. De doce a veinticuatro horas después, se determinó el número de células azules contando diez campos.

Se obtuvo transducción en células de glioma y glioblastoma primario humano. No se observó una transducción eficaz en células 293 (un tipo de células típicamente infectado por el VAA). De forma interesante, se observó transducción en células UT7. Estos resultados sugieren que la quimera había perdido el tropismo natural de VAA y había adquirido el tropismo de B19 para las células eritroides. Este virus se caracterizó para determinar si había retenido las propiedades antigénicas asociadas con el serotipo VAA2.

Se borró, modificó o sustituyó la región de enlace de globósido de B19 (bucle 4 entre los aminoácidos 399-406 de la subunidad Vp2; Brown y col. (1993) Science 262:114) de este virus quimérico para reducir o eliminar completamente el tropismo de B19 para las células eritroides.

Ejemplo 24

Caracterización de la quimera B19/VAA

Los resultados del Ejemplo 23 indican la generación con éxito de un virus quimérico para transducción. El virus quimérico fue evaluado adicionalmente para el rendimiento total de partículas y la integridad. El resto de la preparación del vector se purificó por gradiente, y el virus quimérico se analizó mediante análisis por inmunotransferencia para determinar un título de partículas de 1×10^8 y el análisis por ME (véase el Ejemplo 6) para determinar si se había formado una estructura icosaédrica correcta (Figura 9). De este análisis, se confirmó que el virión quimérico que se había generado retuvo la estructura típica del parvovirus y era estable frente a una etapa de purificación física como sonicación y la centrifugación con gradiente de CsCl_2 . Se trata de una importante observación ya que la mayoría de los parvovirus son térmicamente estables (resistentes hasta los 65 grados), resistentes a los detergentes (0,5% de SDS) y pueden tolerar cambios de pH extremos (viabiles entre pH de 2,0 - 11).

Además, el análisis por ME dio resultados inesperados (Figura 9). Se observaron partículas de virión de dos tamaños diferentes (una partícula de 23-28 nm, típica de VAA de tipo natural, y una partícula 33-38 nm, no identificada hasta el momento). El análisis adicional sugirió que la partícula de VAA de 33-38 nm estaba formada por un cambio en el número de triangulación de $T=1$ a $T=3$, dando como resultado partículas más grandes que contenían 180 copia del componente mayor de la cápsida en lugar de 60. Estos sorprendentes resultados indican la generación de una estructura del virión más grande que la del VAA de tipo natural. Este virión puede tener el potencial de transportar más que las plantillas de vector de tipo natural. La partícula más grande de 33-38 nm será útil para incrementar los límites de empaquetamiento por encima del intervalo de 6 kb (la partícula de B19 de 25 nm empaqueta 6 kb de ADN).

Ejemplo 25

Capacidad de empaquetamiento de la quimera B19/VAA-2

Para cuantificar la capacidad de empaquetamiento del virus quimérico del Ejemplo 21, Dong y colaboradores (1996) Human Gene Therapy 7:2101, desarrollaron una serie de vectores que se usó con genomas de tamaños progresivamente crecientes con insertos entre 745 y 1811 bases (para un tamaño máximo total del genoma de 6,4 kb). La producción a pequeña escala de virus quimérico recombinante se usó para ensayar la eficacia de empaquetado ensayando el contenido de ADN del virus usando el ensayo Hirt, y mediante ensayo indicador con cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

Ejemplo 26

Construcción de otras quimeras de B19/VAA

Se generaron otras cápsidas quiméricas de B19/VAA como en el Ejemplo 21 (por ejemplo, cambiando Vp1 o Vp2 de VAA por Vp1 de B19) y se caracterizaron como se ha descrito en los Ejemplos 22-25 anteriores. En particular, ambos Vp1 y Vp2 de B19 se sustituyen en una quimera Vp1 de VAA para generar para generar una cápsida quimérica novedosa que contiene Vp1 de VAA y Vp1 y Vp2 de B19.

Se ensayaron estas quimeras en células 293 (típicamente infectadas por VAA) y eritroides (el tipo celular típicamente infectado por B19) para comprobar la eficacia de la transducción y se ensayaron como vectores de empaquetamiento de VAA recombinante con insertos de tamaño creciente como se ha descrito anteriormente.

Si se desea, la región de unión a globósido del B19 (bucle 4 de Vp2 entre los aminoácidos 399-406; Brown y col. (1993) Science 262:114) se puede borrar, modificar o cambiar para eliminar el tropismo de B19.

ES 2 340 230 T3

Ejemplo 27

Cambios de bucle entre serotipos de VAA

5 El gen de la cápsida de VAA2, en el vector auxiliar pACG2, se digirió con las enzimas Asp718 y Bsi WI. Bsi WI tiene un emplazamiento único en el genoma de VAA2 en la posición 3254 pb, y Asp718 digiere el genoma dos veces en los pbs 1906 y 4158 (números de secuencia de VAA2). La región de codificación de la cápsida de VAA2 fue parcialmente digerida con Asp718 y se aisló el fragmento de longitud completa (corte simple). Este fragmento se digirió a continuación con Bsi WI y se aisló el fragmento de 7272 pb. Este fragmento eliminó el fragmento de 904 pb
10 que contenía la región de codificación del bucle de VP3 y las regiones 2, 3, y 4.

El gen de la cápsida de VAA4 se digirió con Asp718 y Bsi WI hasta la finalización, y se aisló un fragmento de 928 pb de 3284 pb (BsiWI) a 4212 pbs (Asp718) (números de secuencia de VAA4). Este fragmento de VAA4 codifica una región de VP3 que contiene los bucles 2, 3 y 4. El fragmento de 928 pb de VAA4 y el fragmento de 7272 pb
15 procedente de pACG2 se ligaron y se identificaron los clones.

Estos clones se usaron para preparar un virus quimérico que contenía principalmente VAA2 y parte de la región de VP3 de VAA4. Este virus no infectó las células HeLa según se determina mediante las células teñidas de azul (células infectadas con virus que expresan el gen marcador LacZ). Sin embargo, como VAA4, estas células infectan células
20 COS7 con un título bajo de 1×10^5 unidades de transducción/ml. Estos viriones no son reconocidos por el anticuerpo monoclonal B1 de VAA2.

También se preparó un virus quimérico en el que los bucles 2-4 de Vp3 procedente de VAA2 se sustituyeron en la región homóloga de la cápsida de VAA4.
25

La región de codificación de la cápsida de VAA3 que contenía los bucles 2-4 VP3 se clonaron en pACG2 de la misma manera que se ha descrito anteriormente para la sustitución de los bucles 2/4 de VAA2. Estos viriones quiméricos se VAA2/3 se unieron a heparina agarosa e infectaron células HeLa y 293. Adicionalmente, estos viriones fueron reconocidos por el anticuerpo monoclonal B1.
30

Igualmente, usando las técnicas enseñadas anteriormente, los bucles 2-4 de Vp3 procedentes de VAA5 se sustituyeron por bucles 2-4 de VAA2.

Adicionalmente, bucles únicos (por ejemplo bucle 2, 3 ó 4, o bucles 2-3 o 3-4) se sustituyeron por los 4 ó 5
35 procedentes de VAA3, en VAA2 o viceversa.

Estos vectores víricos mutantes se caracterizaron por formación de viriones, morfología, protección del genoma, unión a heparina e infectividad según se describe en el Ejemplo 4-7.

Se proporciona en el Apéndice 5 (SEC de ID:5) un plásmido auxiliar representativo que codifica una cápsida VAA2/3 quimérica. Esta secuencia contiene las secuencias de codificación de rep de VAA2, la mayor parte de las secuencias de codificación de la cápsida de VAA2, con la excepción de que los bucles 2-4 procedentes de la subunidad Vp3 de VAA2 se sustituyeron por la correspondiente región procedente de VAA3, en un esqueleto pBluescript. La secuencia de codificación de Rep 68/78 se inicia en el nu 251, y la secuencia de codificación de Rep52/40 se inicia en el nu 923. Las secuencias de codificación de rep finalizan en el nu 2114 para Rep78/52 y en el nu 2180 para Rep68/40. La región de codificación cap se inicia en el nu 2133 y finaliza en el nu 4342 (Vp1 se inicia en el nu 2133, Vp2 se
45 inicia en el nu 2544, Vp3 se inicia en el nu 2739).

En resumen, ambos plásmidos auxiliares de VAA2 (pACG2) y VAA3 se digirieron con Bsi WI y Asp 718. Esto elimina un fragmento de 904 pb en el genoma de VAA2 de los nu 3255 a 4159. En el genoma de VAA3, la misma digestión eliminó 907 pb de los nu 3261-4168. Este fragmento de 904 pb se ligó en el auxiliar borrado de VAA2 para dar como resultado el auxiliar dado en la SEC DE ID N°:5 (secuencias de VAA3 en los nu 3184-4092 del plásmido).
50

55 Ejemplo 28

Virus híbridos

Se prepararon cebadores para crear un emplazamiento Hind III único en el gen rep de VAA4 que solape el emplazamiento Hind III en VAA2. Además, en el extremo 3' de la secuencia de codificación de rep, se creó un emplazamiento Not I único 3' respecto del emplazamiento de poliadenilación. Un virus adquirido en la American Type Culture Collection (ATCC) fue la plantilla de la PCR.
60

La porción 5' del gen rep de VAA2 originados desde el emplazamiento Xba I hasta el emplazamiento Hind III se subclonaron en pBluescript. El producto de la digestión de PCR Hind III-Not I se clonó a continuación en el pBluescript que contenía el gen rep 5' digerido con Not I e Hind III.
65

ES 2 340 230 T3

Cebadores

Cebador Not I de VAA4 3' (SEC DE ID N°:58):

5' -AAG CGC CGC GGC CGC TGC TTA TGT ACG CA- 3'

Cebador Hind III de VAA4 5' (SEC DE ID N°:59):

10 5'-GAC GCG GAA GCT TCG GTG GAC TAC GCG- 3'

Esta estrategia de clonación dio como resultado un plásmido auxiliar que era híbrido para los genes rep de VAA2 y VAA4 y que contenía los genes de VAA4. Este auxiliar contenía el gen rep de VAA2 hasta el emplazamiento Hind 15 III y desde este hasta más allá del emplazamiento de poliadenilación, las secuencias se derivaron de VAA4.

Este virus empaquetó un genoma de VAA2 recombinante con ITR de VAA2. Este virus híbrido VAA2/4 muestra las características de unión de VAA4, por ejemplo, no se une a HS y transduce las células diana de VAA4 que no son habitualmente permisivas a la transducción con VAA2.

El plásmido auxiliar híbrido VAA 2/4 es como se proporciona en el Apéndice 1 (SEC DE ID N°:1). Esta secuencia codifica los genes rep de la cápsida de VAA2 y VAA4 en un esqueleto pBluescript. La secuencia de codificación Rep 68/78 se inicia en el nu 251, y la secuencia de codificación Rep52/40 se inicia en el nu 923. Las secuencias de codificación de rep finalizan en el nu 2120 para Rep78/52 y en nu 2183 para Rep68/40. La región de codificación cap se inicia en el nu 2123 y finaliza en el nu 4341 (Vp1 se inicia en el nu 2123, Vp2 se inicia en el nu 2547, Vp3 se inicia en el nu 2727).

Usando las mismas técnicas, se empaquetó en un virus híbrido VAA2/3 a un genoma recombinante de VAA2 (con ITR de VAA2). El virus híbrido resultante es viable y transduce de manera eficaz células permisivas para VAA3.

Además, a diferencia de un informe reciente (Chiorini y col., 1999) J. Virology 73:1309), las técnicas descritas anteriormente se han usado para producir un virus híbrido VAA2/5 en el que se ha empaquetado un genoma de VAA2 recombinante (con ITR de VAA2) dentro de una cápsida de VAA Tipo 5. Este virus se empaqueta relativamente ineficazmente, pero las partículas resultantes demostraron la transducción de las células.

Referencias citadas en la memoria descriptiva

40 Este listado de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la recopilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones, y la OEP declina cualquier responsabilidad a este respecto.

Documentos patente citados en la memoria descriptiva

- | | | |
|----|---|---|
| 45 | <ul style="list-style-type: none"> • DK 42701 [0001] | <ul style="list-style-type: none"> • US 5877022 A [0026] [0161] |
| | <ul style="list-style-type: none"> • DK 5329380110 [0001] | <ul style="list-style-type: none"> • US 5869248 A, Yuan [0026] [0161] |
| 50 | <ul style="list-style-type: none"> • US 5863541 A, Samulski [0016] [0024] [0109] [0152] | <ul style="list-style-type: none"> • US 5478745 A, Samulski [0043] |
| | <ul style="list-style-type: none"> • US 5916563 A, Young [0024] [0109] | <ul style="list-style-type: none"> • US 5681731 A, Lebkowski [0062] |
| 55 | <ul style="list-style-type: none"> • US 5905040 A, Mazzara [0024] [0109] | <ul style="list-style-type: none"> • US 5945335 A, Colosi [0072] |
| | <ul style="list-style-type: none"> • US 5882652 A [0024] [0109] | <ul style="list-style-type: none"> • US 4501729 A [0180] |

Bibliografía no de patentes citada en la memoria descriptiva

- 60 • **Munshi** y col. *J. Virology*, 1993, vol. 67, 562 [0004]
- **Parrish** y col. *Virology*, 1988, vol. 166, 293 [0004]
- 65 • **Chang** y col. *J. Virology*, 1992, vol. 66, 6858 [0004]
- **Muzyczka**. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 1992, vol. 158, 97 [0006] [0009] [0122] [0140]

ES 2 340 230 T3

- **Rolling** y col. *Molec. Biotech.*, 1995, vol. 3, 9 [0006]
- **Wistuba** y col. *J. Virology*, 1997, vol. 71, 1341 [0006]
- 5 • **Myers** y col. *J. Biological Chem.*, 1981, vol. 256, 567 [0006]
- **Myers** y col. *J. Virology*, 1980, vol. 35, 65 [0006]
- **Hermonat** y col. *J. Virology*, 1984, vol. 51, 329 [0007] [0202]
- 10 • **Ruffing** y col. *J. Virology*, 1992, vol. 66, 6922 [0007]
- **Yang** y col. *Human Gene Therapy*, 1998, vol. 9, 1929 [0007]
- 15 • **Miyamura** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 8507 [0008]
- **Brown** y col. *Virology*, 1994, vol. 198, 477 [0008]
- **Sedlik** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 7503 [0008]
- 20 • **Flotte** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 10613 [0010]
- **Kaplitt** y col. *Nature Genet.*, 1994, vol. 7, 148 [0010]
- 25 • **Xiao** y col. *J. Virol.*, 1996, vol. 70, 8098 [0010]
- **Clark** y col. *Hum. Gene Ther.*, 1996, vol. 8, 659 [0010]
- **Fisher** y col. *Nat. Med.*, 1997, vol. 3, 306 [0010]
- 30 • **Monahan** y col. *Gene Ther.*, 1998, vol. 5, 40 [0010]
- **Ferrari** y col. *J. Virology*, 1996, vol. 70, 3227-34 [0010]
- 35 • **Dong** y col. *Hum. Gene Ther.*, 1996, vol. 7, 2101 [0011]
- **BERNARD N. FIELDS** y col. *VIROLOGY. Lippincott-Raven Publishers*, vol. 2 [0017] [0018] [0068]
- **Vincent** y col. *Nature Genetics*, 1993, vol. 5, 130 [0022]
- 40 • **Tinsley** y col. *Nature*, 1996, vol. 384, 349 [0022]
- **Miyamura** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 8507 [0024] [0109]
- 45 • **Puttaraju** y col. *Nature Biotech.*, 1999, vol. 17, 246 [0026] [0161]
- **Gorman** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 4929 [0026] [0161]
- **SAMBROOK** y col. *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor*, 1989
50 [0027]
- **F. M. AUSUBEL** y col. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.*, [0027]
- 55 • **Mizukami** y col. *Virology*, 1996, vol. 217, 124 [0040]
- **Gavin** y col. *J. Virology*, 1999, vol. 73, 9433 [0051] [0059]
- **Ponnazhagan** y col. *J. Virology*, 1998, vol. 72, 5224 [0061]
- 60 • **Xiao** y col. *J. Virology*, 1998, vol. 72, 2224 [0068] [0071] [0186]
- **Samulski** y col. *J. Virology*, 1989, vol. 63, 3822 [0069] [0196] [0197]
- 65 • **Yang; Wilson.** *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 2564 [0069]
- **Yang** y col. *J. Virology*, 1995, vol. 69, 2004 [0069]

ES 2 340 230 T3

- **Yang** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 4407 [0069]
- **Monahan** y col. *Gene Therapy*, 1998, vol. 5, 40 [0069]
- 5 • **Zolotukhin** y col. *Gene Therapy*, 1999, vol. 6, 973 [0070] [0135] [0202]
- **Ferrari** y col. *Nature Med.*, 1997, vol. 3, 1295 [0071] [0186]
- **Holscher** y col. *J. Virology*, 1994, vol. 68, 7169 [0071]
- 10 • **Clark** y col. *Hum. Gene Ther.*, 1995, vol. 6, 1329 [0071]
- **Trempe; Yang**. *Fifth Parvovirus Workshop*, 1993 [0071]
- 15 • **Allen** y col. *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 6816 [0072]
- **Gao** y col. *Human Gene Therapy*, 1998, vol. 9, 2353 [0072]
- **Inoue** y col. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 7024 [0072]
- 20 • **SAMBROOK** y col. *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*. 1989 [0098]
- **Chapman** y col. *Virology*, vol. 194, 419 [0101]
- 25 • **Muramatsu**. *Virology*, 1996, vol. 221, 208 [0101]
- **Mizukami** y col. *Virology*, vol. 217, 124 [0101]
- **Summerford; Samulski**. *J. Virology*, 1998, vol. 72, 1438 [0121] [0205]
- 30 • **Srivastava** y col. *J. Virology*, 1983, vol. 45, 555 [0122] [0140]
- **Ruffing** y col. *J. Gen. Virology*, 1994, vol. 75, 3385 [0122] [0140]
- 35 • **Cassinotti** y col. *Virology*, 1988, vol. 167, 176 [0122] [0140]
- **Brown** y col. *Science*, 1993, vol. 262, 114 [0126] [0259] [0266] [0272]
- **Agbandje-McKenna** y col. *Virology*, 1994, vol. 203, 106 [0126] [0259]
- 40 • **Chapman** y col. *Virology*, 1993, vol. 194, 419 [0126]
- **Chipman** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 7502 [0126]
- 45 • **Cleves**. *Current Biology*, 1997, vol. 7, R318 [0129]
- **Chiorini** y col. *J. Virology*, 1999, vol. 73, 1309 [0142] [0289]
- **Samulski** y col. *J of Virology*, 1989, vol. 63, 3822 [0186]
- 50 • **Li** y col. *J. Virology*, 1997, vol. 71, 5236 [0189] [0197] [0210]
- **Rose** y col. *J. Virology*, 1971, vol. 8, 766 [0204]
- 55 • **Murphy** y col. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 1986, vol. 83, 8258 [0245]
- **Morandini** y col. *Internat. J. Ca.*, 1994, vol. 56, 129 [0245]
- **Dong** y col. *Human Gene Therapy*, 1996, vol. 7, 2101 [0258]
- 60 • **Dong**. *Human Gene Therapy*, 1996, vol. 7, 2101 [0269]

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de virus quimérico que comprende:

(a) una cápsida quimérica de parvovirus, en la que toda una región de al menos 5 aminoácidos de longitud de una subunidad de cápsida de parvovirus está sustituida por la región homóloga de una subunidad de cápsida procedente de un parvovirus diferente; y

(b) un genoma de VAA empaquetado dentro de la cápsida quimérica de parvovirus,

en la que dicha partícula de virus quimérico tiene una o más características alteradas seleccionadas entre el grupo constituido por: propiedades antigénicas; capacidades de empaquetado; tropismo celular; detección facilitada y propiedades de purificación.

2. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 1, en la que el genoma de VAA es recombinante y comprende al menos una secuencia heteróloga de ácido nucleico empaquetada en la cápsida quimérica de parvovirus.

3. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho genoma de VAA comprende al menos un duplicado terminal invertido de VAA y opcionalmente comprende dos duplicados terminales invertidos de VAA que flanquean dicha secuencia heteróloga de ácido nucleico.

4. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha toda o región de al menos 5 aminoácidos de longitud de una subunidad de cápsida de parvovirus es una región bucle de la subunidad mayor de la cápsida y está sustituida por una región bucle homóloga de la subunidad mayor de la cápsida procedente de un parvovirus diferente.

5. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que toda la subunidad de cápsida de parvovirus de dicha cápsida quimérica de parvovirus está sustituida por una subunidad de cápsida procedente de un parvovirus diferente.

6. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha cápsida de parvovirus es una cápsida de parvovirus autónoma.

7. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha cápsida de parvovirus es una cápsida de virus adenoasociado (VAA).

8. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 7, en la que se reduce una propiedad antigénica relacionada con el serotipo de dicha cápsida VAA en comparación con la cápsida de VAA natural.

9. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que se altera un tropismo celular de la cápsida de VAA AA en comparación con la cápsida de VAA de tipo natural.

10. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que dicha cápsida procede de un VAA seleccionado entre el grupo constituido por los serotipos de VAA 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

11. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la que dicha toda o región de al menos 5 aminoácidos de longitud de una subunidad de cápsida de parvovirus se sustituye por la región homóloga de una subunidad de cápsida procedente de un VAA.

12. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 11 en la que dicha toda o región de al menos 5 aminoácidos de longitud de una subunidad de cápsida de parvovirus se sustituye por la región homóloga de una subunidad de cápsida procedente de un VAA seleccionado entre el grupo constituido por los serotipos de VAA 1, 2, 3, 4, 5 y 6; VAA aviar, VAA bovino, VAA canino, VAA equino y VAA ovino.

13. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 12 en la que dicha cápsida de VAA es una cápsida de VAA serotipo-2.

14. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 13 en la que dicha toda o región de al menos 5 aminoácidos de longitud de una subunidad de cápsida de parvovirus se sustituye por la región homóloga de una subunidad de cápsida procedente de un dependovirus.

15. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 en la que dicha cápsida de VAA comprende una cápsida de VAA tipo 1, 2, 3, 4, 5, o 6 en la que la región bucle 1, 2, 3 y/o 4 de la subunidad VP3 se sustituye por la región homóloga de una subunidad de cápsida procedente de un serotipo diferente de VAA.

ES 2 340 230 T3

16. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha toda o región de al menos 5 aminoácidos de longitud de una subunidad de cápsida de parvovirus se sustituye por la región homóloga de una subunidad de cápsida procedente de un parvovirus autónomo.
17. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que una región bucle en la subunidad Vp3 de la cápsida mayor de VAA se sustituye por una región bucle homogénea procedente de la subunidad mayor de la cápsida de un parvovirus autónomo.
18. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, en la que dicho genoma de VAA es del mismo serotipo que dicha cápsida de VAA.
19. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 que es un parvovirus híbrido.
20. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, excepto la reivindicación 19 cuando depende de la reivindicación 13, en la que dicho genoma de VAA es un genoma de VAA serotipo-2.
21. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, excepto la reivindicación 18 cuando depende de la reivindicación 13, en la que dicho genoma de VAA es un genoma de VAA serotipo-5.
22. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 21, en la que dicha secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un péptido o proteína.
23. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 22, en la que el péptido o proteína es un péptido o proteína terapéutica o inmunogénica.
24. La partícula de virus quimérico de la reivindicación 23, en la que dicha secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un péptido o proteína terapéutico seleccionado entre el grupo constituido por proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística, distrofina, minidistrofina, utrofina, un factor de coagulación incluyendo Factor IX, eritropoyetina, receptor LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, β -glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada, una hormona, un factor de crecimiento, una citocina incluyendo β -interferón, un producto de gen suicida, y un producto génico supresor de tumores.
25. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 21, en la que la secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un ARN no traducido.
26. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 25, en la que la secuencia heteróloga de ácido nucleico está operativamente asociada con un elemento promotor o potenciador.
27. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en la que dicha toda o región de al menos 5 aminoácidos de longitud de una subunidad de cápsida(s) procedente de un parvovirus diferente tiene al menos aproximadamente 10, 12, 15, 20, 30, 50 ó 100 aminoácidos de longitud.
28. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en la que todos los genes cap de VAA y todos los genes rep de VAA se borran de dicho genoma de VAA.
29. La partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 en la que dicha cápsida de parvovirus comprende sustituciones en más de un emplazamiento en dicha cápsida de parvovirus.
30. Una formulación farmacéutica que comprende dicha partícula de virus quimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
31. Un procedimiento *in vitro* para administrar una secuencia de ácido nucleico a una célula, que comprende: introducir en una célula una partícula de virus quimérico que comprende una cápsida de parvovirus y un genoma de virus adenoasociado (VAA) empaquetado en la cápsida, en el que el genoma de VAA comprende al menos un duplicado terminal invertido de VAA y al menos una secuencia heteróloga de ácido nucleico, y adicionalmente en el que toda o una región de al menos 5 aminoácidos de longitud de una subunidad de cápsida de la cápsida de parvovirus se sustituye por la región homóloga de una subunidad de cápsida procedente de un parvovirus diferente y dicha partícula de virus quimérico tiene una o más características alteradas seleccionadas entre el grupo constituido por: propiedades antigénicas; capacidades de empaquetado; tropismo celular; detección facilitada u propiedades de purificación.
32. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que la al menos una secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica una proteína o péptido.
33. El procedimiento de la reivindicación 31 ó 32, en el que la célula se selecciona entre el grupo constituido por una célula neural, una célula de pulmón, una célula retinal, una célula epitelial, una célula muscular, una célula pancreática, una célula hepática, una célula de miocardio, una célula de hueso, una célula de bazo, heratinocito, fibroblasto, célula endotelial, célula de próstata, célula germinal, célula progenitora, y una célula troncal.

ES 2 340 230 T3

34. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, en el que la cápsida de parvovirus es una cápsida de VAA.

35. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, en la que dicho genoma de VAA es un genoma de VAA serotipo-2.

36. Un procedimiento *in vitro* para producir una partícula de virus quimérico que comprende:

- i) proporcionar una célula con genes cap de parvovirus, genes rep procedentes de un virus adenoasociado (VAA), un genoma de VAA recombinante que comprende al menos una secuencia heteróloga de ácido nucleico, y funciones auxiliares para generar una infección productora de VAA; en el que los genes cap comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico procedente de los genes cap de un parvovirus diferente que codifica toda o una región de al menos 5 aminoácidos de longitud de la región homóloga de una subunidad de cápsida; y
- ii) permitir el ensamblaje de la partícula de virus quimérico en el que dicha partícula de virus quimérico tiene una o más características alteradas seleccionadas entre el grupo constituido por: propiedades antigénicas; capacidades de empaquetamiento; tropismo celular; detección facilitada y propiedades de purificación.

37. El procedimiento de la reivindicación 36 en el que el parvovirus es un VAA.

38. El procedimiento de la reivindicación 36 ó 37, en el que el genoma de VAA recombinante codifica al menos un duplicado terminal invertido de VAA que flanquea dicha secuencia heteróloga de ácido nucleico y opcionalmente codifica dos duplicados terminales invertidos de VAA que flanquean dicha secuencia heteróloga de ácido nucleico.

39. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, en la que dichos genes cap y rep se

- (a) proporcionan en trans mediante un vector o vectores de empaquetamiento; o
- (b) transforman de manera estable en la célula.

40. El procedimiento de la reivindicación 39, en el que el vector es un vector plásmido o vírico.

41. La partícula de virus quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 para uso como medicamento, en la que el genoma de VAA es recombinante y comprende al menos una secuencia heteróloga de ácido nucleico empaquetada en la cápsida quimérica de parvovirus y adicionalmente en la que dicha secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica una proteína o péptido terapéutico o inmunogénico.

42. La partícula de virus quimérico según la reivindicación 41 para uso como composición de vacuna.

43. El uso de una partícula de virus quimérico según la reivindicación 24 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del siguiente grupo: fibrosis quística; hemofilia A; hemofilia B; talasemia; diabetes mellitus; distrofia muscular de Becker; distrofia muscular de Duchenne; enfermedad de Gaucher; enfermedad de Hurler; deficiencia en adenosina desaminasa; y enfermedades de almacenamiento del glicógeno.

44. El uso de una partícula de virus quimérico según la reivindicación 24, en la que dicho ácido nucleico heterólogo codifica la proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis quística.

45. El uso de una partícula de virus quimérico según la reivindicación 24, en la que dicho ácido nucleico heterólogo codifica el Factor IX para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de hemofilia B.

46. El uso de una partícula de virus quimérico según la reivindicación 24, en la que dicho ácido nucleico heterólogo codifica la β -globina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de talasemia.

47. El uso de una partícula de virus quimérico según la reivindicación 24, en la que dicho ácido nucleico heterólogo codifica la adenosina desaminasa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la deficiencia en adenosina desaminasa.

48. El uso de una partícula de virus quimérico según la reivindicación 24, en la que dicho ácido nucleico heterólogo codifica la β -glucocerebrosidasa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

49. El uso de una partícula de virus quimérico según la reivindicación 24, en la que dicho ácido nucleico heterólogo codifica distrofina o una minidistrofina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne o la distrofia muscular de Becker.

FIG. 1

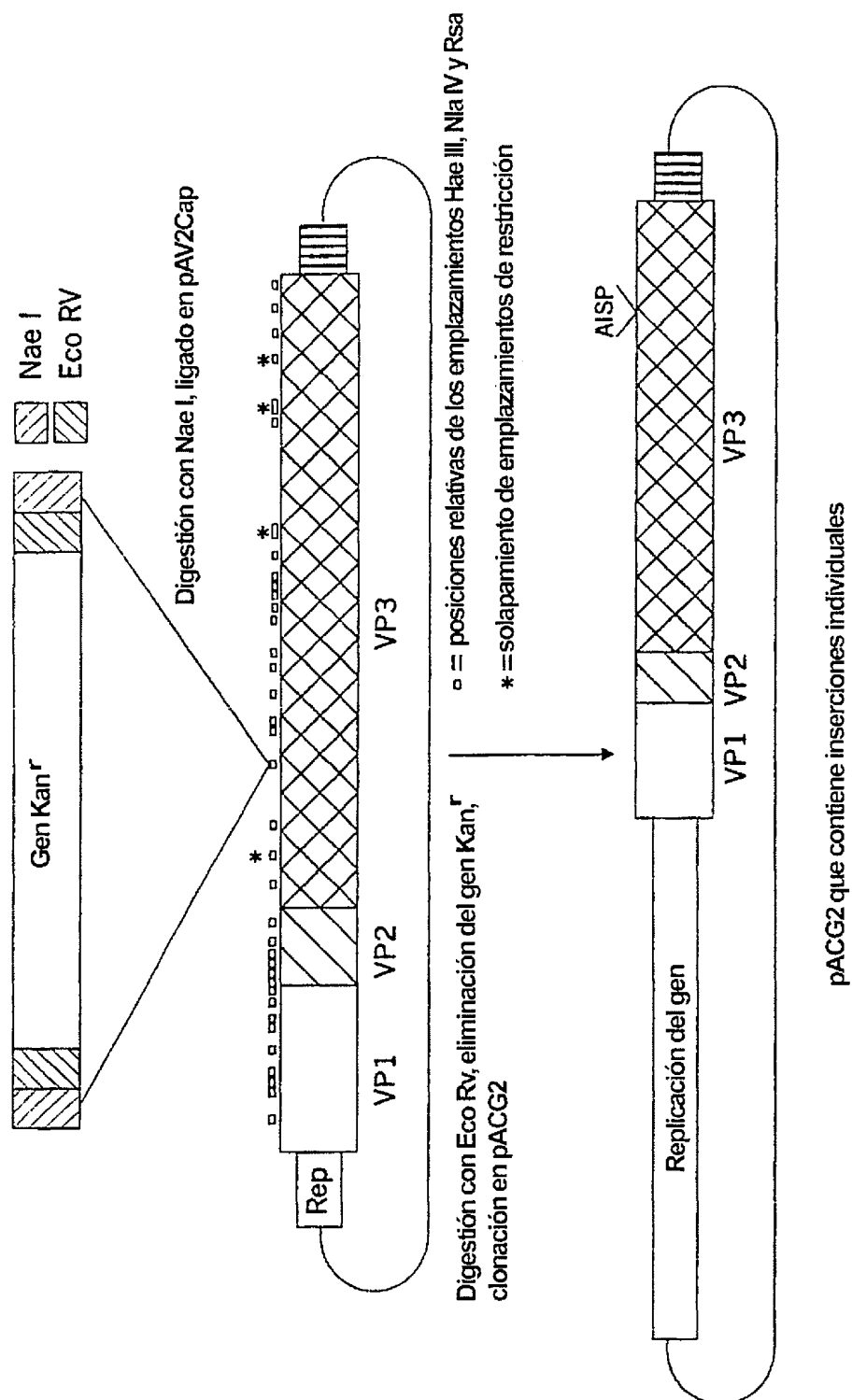


FIG. 2

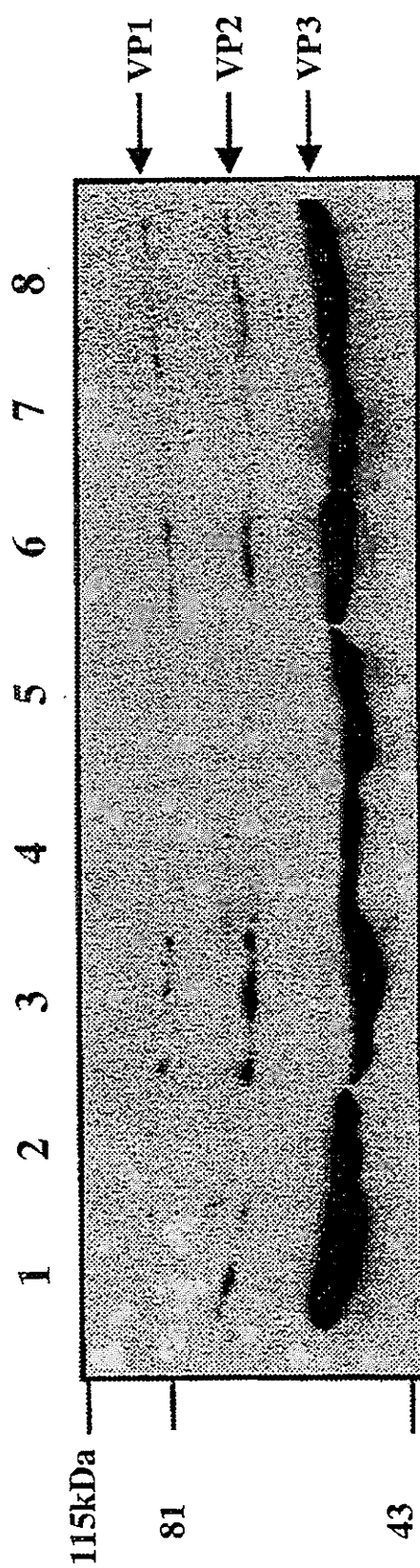


FIG. 3

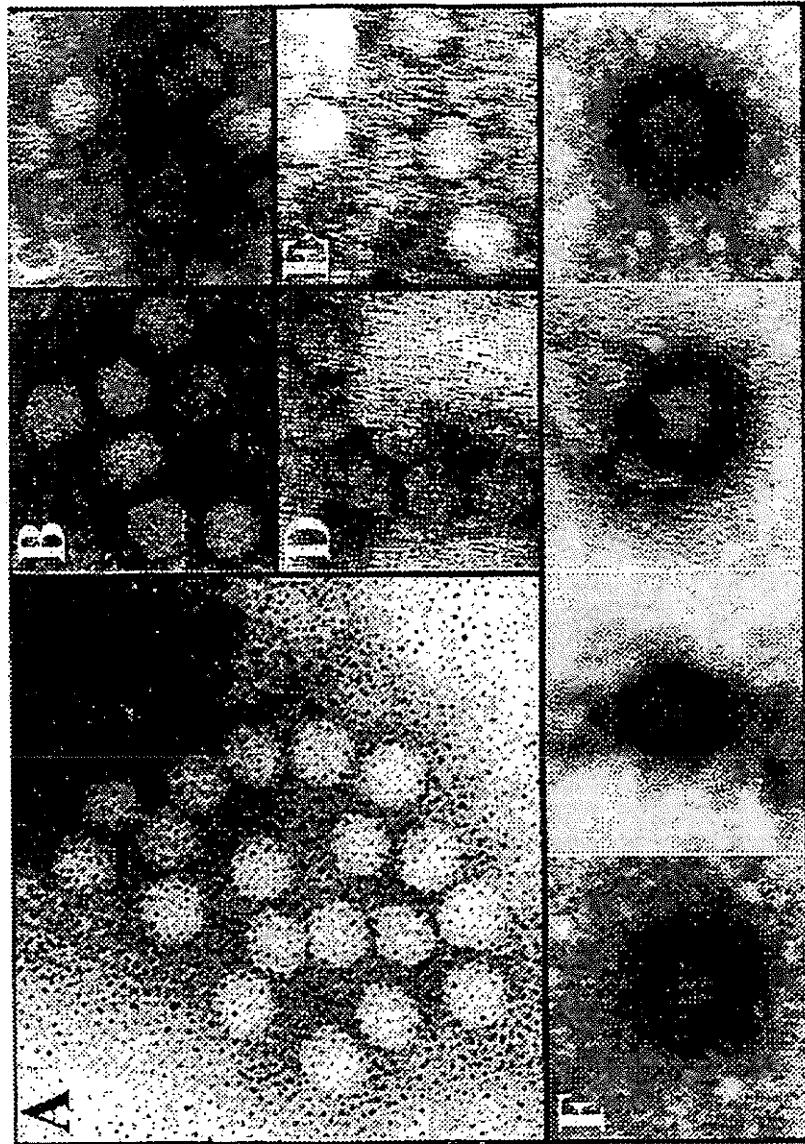


FIG. 4

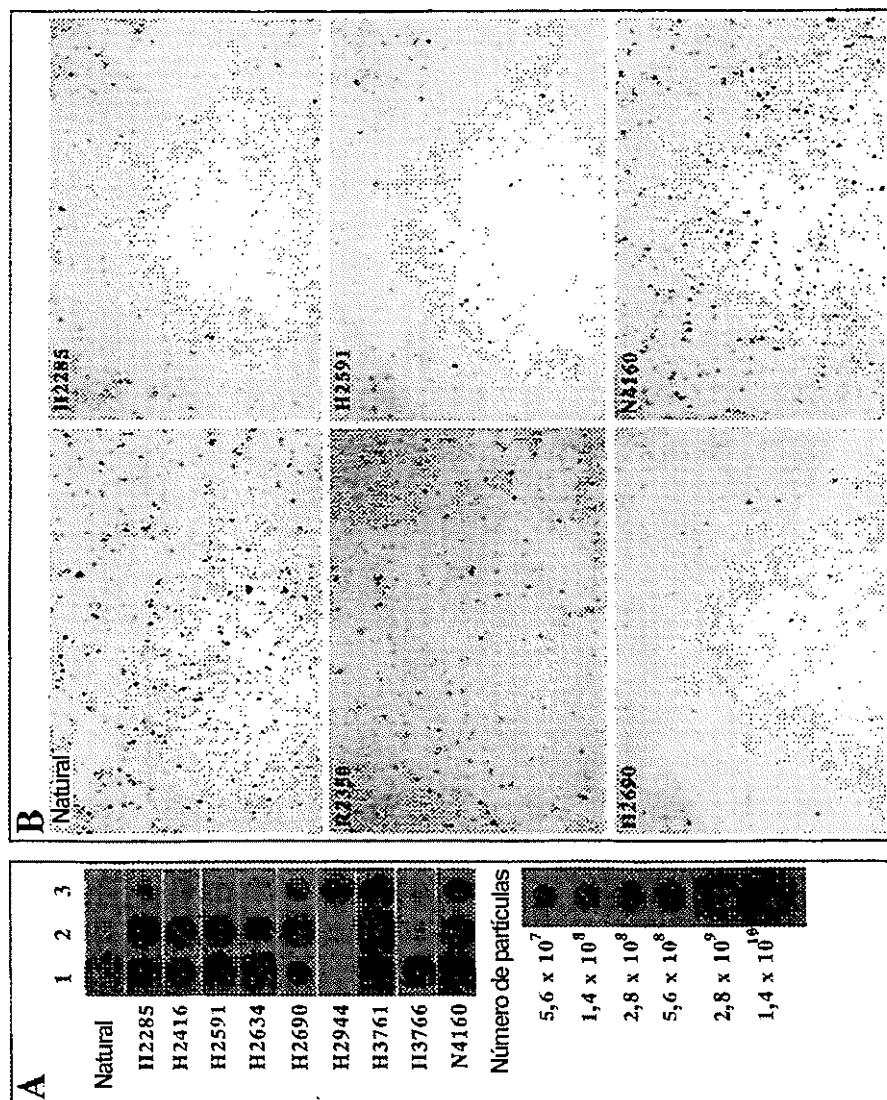
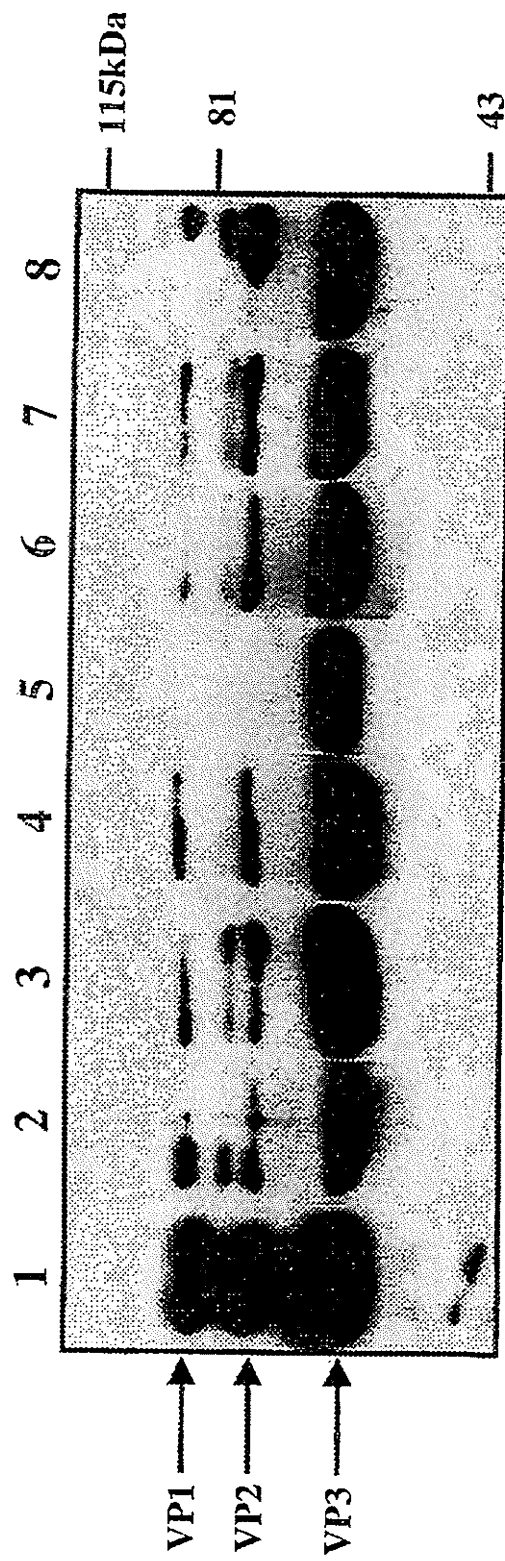


FIG. 5



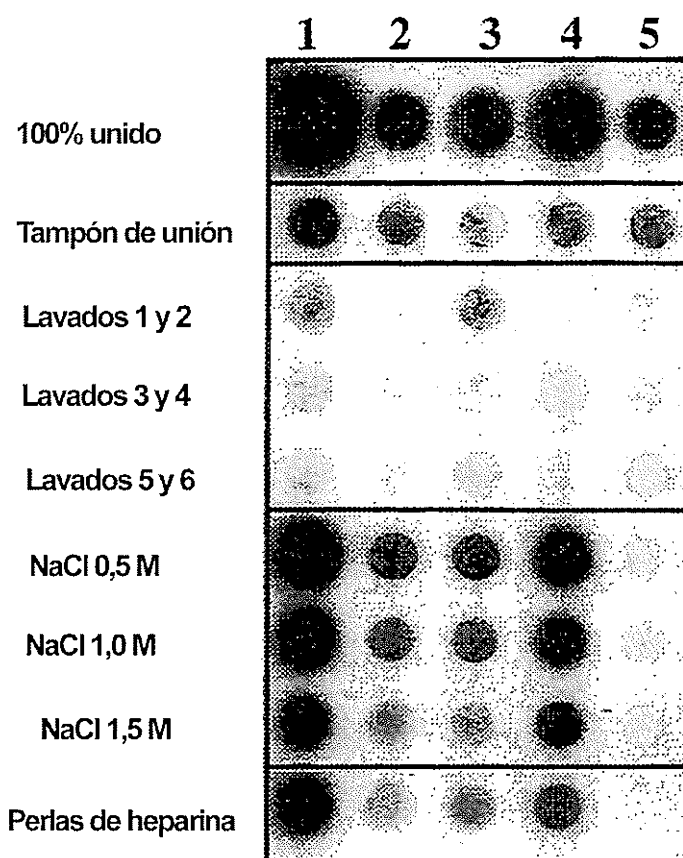


FIG. 6



FIG. 9

FIG. 7

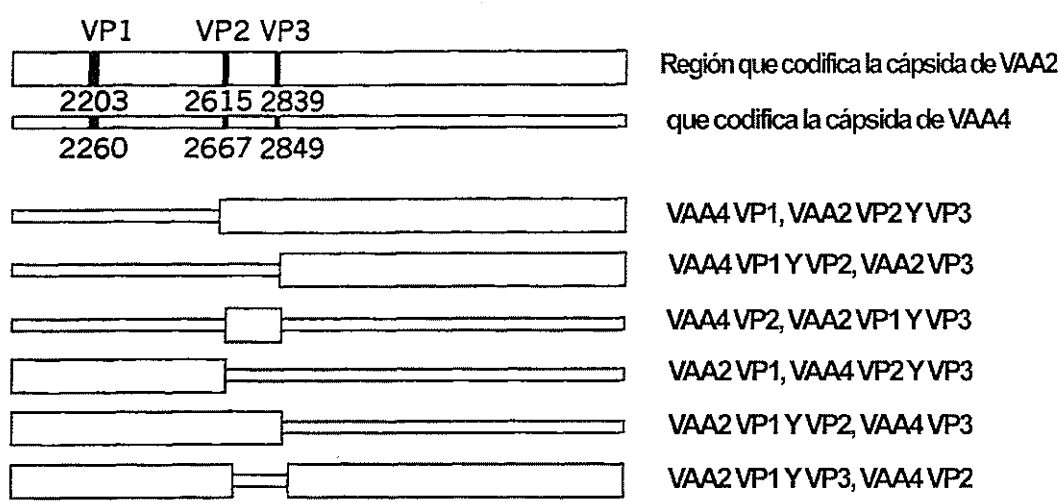
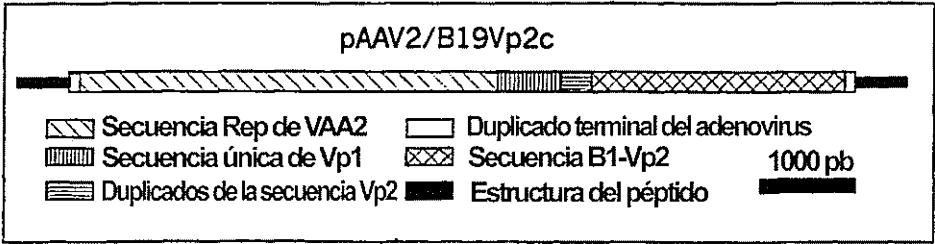


FIG. 8



CUESTIONARIO CIVIQ DOLOR

Visita Post-esclerosis ____ / ____ / 2010

- 1) Durante las cuatro últimas semanas, ¿le han **dolido** los **tobillos** o las **piernas**, y con qué *intensidad*?
(Señale con un círculo el número que corresponde a su respuesta).

Ningún dolor	Dolores leves	Dolores medianos	Dolores importantes	Dolores intensos
1	2	3	4	5

- 2) A lo largo de las cuatro últimas semanas, ¿en qué medida se sintió Vd. molesto(a) en su **trabajo** o en sus **actividades habituales diarias a causa de sus problemas de piernas**?
(Señale con un círculo el número que corresponde a su respuesta).

Ninguna molestia	Un poco molesto(a)	Moderadamente molesto(a)	Muy molesto(a)	Extremadamente molesto(a)
1	2	3	4	5

- 3) Durante las cuatro últimas semanas, ¿alguna vez durmió mal a causa de su problema de piernas, y con qué frecuencia?
(Señale con un círculo el número que corresponde a su respuesta).

Nunca	Muy de vez en cuando	A menudo	Muy a menudo	Todas las noches
1	2	3	4	5

- 4) Durante las cuatro últimas semanas, ¿en qué medida sus problemas de piernas le han molestado para poder efectuar los gestos o las actividades indicados a continuación?

(Por cada proposición que figura en la columna de la izquierda del cuadro señale con un círculo el número que indica en qué medida le afectó).

	Ninguna molestia	Un poco molesto(a)	Moderadamente molesto(a)	Muy molesto(a)
4. Estar mucho rato de pie	1	2	3	4

Paciente 1

CUESTIONARIO CIVIQ DOLOR

Visita Pre-esclerosis ____ / ____ / 2010

- 1) Durante las cuatro últimas semanas, ¿ le han **dolido** los **tobillos** o las **piernas**, y con qué *intensidad*?
(Señale con un círculo el número que corresponde a su respuesta).

Ningún dolor	Dolores leves	Dolores medianos	Dolores importantes	Dolores intensos
1	2	3	4	5

- 2) A lo largo de las cuatro últimas semanas, ¿ en qué medida se sintió Vd. molesto(a) en su **trabajo** o en sus **actividades habituales diarias a causa de sus problemas de piernas**?
(Señale con un círculo el número que corresponde a su respuesta).

Ninguna molestia	Un poco molesto(a)	Moderadamente molesto(a)	Muy molesto(a)	Extremadamente molesto(a)
1	2	3	4	5

- 3) Durante las cuatro últimas semanas, ¿ alguna vez durmió mal a causa de su problema de piernas, y con qué frecuencia?
(Señale con un círculo el número que corresponde a su respuesta).

Nunca	Muy de vez en cuando	A menudo	Muy a menudo	Todas las noches
1	2	3	4	5

- 4) Durante las cuatro últimas semanas, ¿ en qué medida sus problemas de piernas le han molestado para poder efectuar los gestos o las actividades indicados a continuación?

(Por cada proposición que figura en la columna de la izquierda del cuadro señale con un círculo el número que indica en que medida le afectó).

	Ninguna molestia	Un poco molesto(a)	Moderadamente molesto(a)	Muy molesto(a)
4. Estar mucho rato de pie	1	2	3	4

Paciente 1

ES 2 340 230 T3

LISTA DE SECUENCIAS

Apéndice 1

5 CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA
GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCT
TCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCC
10 TTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGG
TGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACC
15 CTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTT
AAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAATATTAACGCTT
ACAATTTCCATTGCGCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCG
20 GGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA
AGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTG
AGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGG
25 CCGCTGCTTATGTACGCAGTAGCCATGGAAACGAGATAAGATAAGAAGGACACGGA
GACCAAAGTTCAACTGAAACGAATAAACCGGTTTTATTGATTAACAGGTTATTACAGG
TGGTGGGTGAGGTAGCGGGTACCGATAGCCCTAGGCTCAGTGTATTTCCAGCCG
30 CATCGGGAGCCCAACAGAGAGTTTTGCTGTCCGTAGTTGGAGGTAACTGGAC
CTCGGGGTTCAGCGTTTGACCGCTCCTTCTGGATCTCCAGTCAATCTGCACCG
ACACCTGGCCAGTGCTGTACTGAGTAATGAAGGAGTTTACCGGAGTAGAGCTGAA
35 GGTGCTTGCAGGATTGCGAGGTACCGGGGTGTTCTTGATAAAAAATTTGAGGAGGC
GGGTGTTTCAGCCCAAACCCACCAATCAGCGGTGAGGGGTGAAAGTGTCCATCGG
TATGAGGAATCTTGCCCCAAATGGGACCCTGGTAGTAAATGTCTCTGTTTTGCCAG
40 ACCATTCCAGGCACGGCTCCCAAGGCTGTCAGTCTGTCCACGGTCGGCAGGTTGC
TGTTGCTCTGGTCACCGCCAGGTAGGTTGCCCCACATGTCCGTATCGGTGGCGTT
GGTGGCTGCCAGCTCCTCCTCAGAGGTGAAGATCAGAGTCCCGGGTACGGTGGCC
45 GTGTTGCCGTTCTGTTTAGGCCCGCAAAGATGAGCTGGCTGTTGCTGAACTTGCT
GTCCGCAGGTCCAGCCGTGGCCATTGGAGGTCCGGGGGTGAGGGCACTCCATCTT
CCGTCCAGAGTGCTGTGCGTCTCGTATTTGATGAGACTGTCTGACCCGGTGGCAG
50 GGATCTTGATGTTTTGATTGGCAGTCTTTGAGAAGCCCTGCTGCTTGATTGAAGGC
CCGGGCAGCCAGTTCTTTTTAAAGTTGGAAGGTTGGTAGGCCGCAGCTTGGTAAA
GTTGGTGGTGGCAGTCCCGGCATTGAGGGTGGTTCCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
55 CCCACAGGTAAGTGGTCGATGAGAGGGTTTCATCAGCCGGTCCAGGCTCTGGCTGT
GCGCGTACATCGAGTGGAAGGCACCTTCTCAAACTGTACGTAATTTCAAAGTTG

60

65

ES 2 340 230 T3

TTGCCAGTCCGCAGCATCTGCGAAGGAAAGTACTCCAGGCAGTAGAAGGCATTTCT
 GTCAGTCTGTTGCTGCGAAGTGTGCGCGGTACCCAGTCCACAGTAGCCGTAAGG
 5 GGCACCATAAAGACGTCGTTGGGAAAAGGAGGCAGGCTGCCCTCTTGACCCGCAT
 CCATCACGTACGGCAGTTTCGTACGACGAGTCCGCAAAGATCTGAACCGTGCTGGT
 AAGGTTATTAGCCACCGTTGTCTCGCCGTTGACGTCGTGACCTCCTTGACCTGGA
 10 TGTTGAAGATTTTGACCCGCATGGCTTTGGGTGCGATGCCCCAGTTGTTGTTGATG
 AGTCGCTGCCAGTCACGTGGTGAGAAAGTGGCAGTGGAAGCGGTTGAAGTCAAAGT
 ATCCCCAGGGGGTGGAGAATCCGTTGTAGGTGTTGGACTGCAGGCTCTCTCCGAG
 15 TCGCTTGTAGAGGTGGTTGTTGTAGGTGGGCAAGACCCAGGTTCTGGTGCTGGTG
 GTCGTGACGTGGCCCTCAGACCAGGTGGAATCGCAATGCCAATCACCCGAGGCAT
 TACCCACTCCATCGGCACCTTGTCGCCCTCGACTGCAGCTCCGCCAGCTGCTGC
 20 ACGCATCTCACTGTCATCAGACATGGCTCCGGAAGTTGATCCCTCAGGGGGTCCGT
 CGCCTGCTCCAGTTTCGTCTTCGAAAACGAGCTTCTTTTAGCCGGCTGCTTGCCCT
 TTTTGCCGATACCCGTGGAGGAGTCGGGCTGCTGGGGGGATTCAATCAACGGTCT
 25 CTTCTTTCCAGGAGCCGTCTCACCCGCTTGCTCAACCAGACCAAGAGGTTCAAGAA
 CCCTCTTTTTGGCCTGGAAGACTGCTCTGCCGAGGTTGCCCCCAAACGATGTGTG
 CCCTGAAGCCGCTGCTGGAACCTCCGCGTCGGCGTGGTTGTACTTGAGGTAGGGGT
 30 TGTACCCGGCCTTGAGCTGCTGGTCGTAGGCCTTGTCGTGCTCGAGGGCTGCCGC
 GTCCGCTGCGTTGACGGGTTCCCCCTTGTCGAGTCCGTTGCCGGGTCCGAGGTAT
 TTGTAACCCGGAAGCACAAAGACCCCGAGCGTTGTCCTGATGTTGTTGATTTGCCTT
 35 GGGTTTAGGGGCTCCAGGTTGCAGCGCCCACCACTCTCGAACGCCTTCAGAGAGG
 TTGTCCTCTAGCCAATCTGGAAGGTAACCGTCAGTCATATCTGGTTTGAGTCATTTA
 TTGTTCCATGTCACAGTCATCCAAGTCCACATTGGCCAGTTCCGAGGCCGAGCAGG
 40 CCACCTCGGGCGCCCTCCCCATGATGTGATGAATCGGACACAGTTTCTGATACGTC
 CGCTTCTGACGACAGACACGGGTTGAGATTCTGACACGGGGAAGCACTCGGCAC
 AGTCCATGACCCCGTGCGTGAAGCAAATGTCCACATTCTGATTCACTCTCTCGCATT
 45 GCCGGCAGGGAAAAAGCATCAGATTCATACCCACGTGACGAGAACATTTGTTTTGG
 TACCTGTCCGCGTAGTCCACCGAAGCTTCCGCGTCTGACGTGATGGCTGCGCAA
 CTGACTCGCGCACCCGTTTGGGCTCACTTATATCTGCGTCACTGGGGGCGGGTCT
 50 TTTCTTGGCTCCACCCTTTTGGACGTAGAATTCATGCTCCACCTCAACCACGTGATC
 CTTTGCCACCGGAAAAAGTCTTTGACTTCCTGCTTGGTGACCTTCCCAAAGTCATG
 ATCCAGACGGCGGGTGAGTTCAAATTTGAACATCCGGTCTTGCAACGGCTGCTGGT

ES 2 340 230 T3

GTTCGAAGGTCGTTGAGTTCCCGTCAATCACGGCGCACATGTTGGTGTGGAGGT
 GACGATCACGGGAGTCGGGTCTATCTGGGCCGAGGACTTGCAATTTCTGGTCCACG
 5 CGCACCTTGCTTCCTCCGAGAATGGCTTTGGCCGACTCCACGACCTTGCGGGTCAT
 CTTCCCTCCTCCACCAGATCACCATCTGTGACACAGTCGTTGAAGGGAAAAGT
 TCTCATTGGTCCAGTTTACGCACCCGTAGAAGGGCACAGTGTGGGCTATGGCCTCC
 10 GCGATGTTGGTCTTCCCGGTAGTTGCAGGCCCAAACAGCCAGATGGTGTTCCTCTT
 GCCGAACTTTTTCGTGGCCCATCCAGAAAGACGGAAGCCGCATATTGGGGATCG
 TACCCGTTTAGTTCCAAAATTTTATAAATCCGATTGCTGGAAATGTCCTCCACGGGC
 15 TGCTGGCCCAACCAGGTAGTCGGGGGCGGTTTTAGTCAGGCTCATAATCTTTCCCG
 CATTGTCCAAGGCAGCCTTGATTTGGGACCGCGAGTTGGAGGCCGCATTGAAGGA
 GATGTATGAGGCCTGGTCCTCCTGGATCCACTGCTTCTCCGAGGTAATCCCTTGT
 20 CCACGAGCCACCCGACCAGCTCCATGTACCTGGCTGAAGTTTTTGATCTGATCACC
 GGCGCATCAGAATTGGGATTCTGATTCTCTTTGTTCTGCTCCTGCGTCTGCGACAC
 GTGCGTCAGATGCTGCGCCACCAACCGTTTACGCTCCGTGAGATTCAAACAGGCG
 25 CTAAATACTGTTCCATATTAGTCCACGCCCACTGGAGCTCAGGCTGGGTTTTGGG
 GAGCAAGTAATTGGGGATGTAGCACTCATCCACCACCTTGTTCCCGCCTCCGGCG
 CCATTTCTGGTCTTTGTGACCGCGAACCAGTTTGGCAAAGTCGGCTCGATCCCGCG
 GTAAATTCTCTGAATCAGTTTTTCGCGAATCTGACTCAGGAAACGTCCCAAACCAT
 30 GGATTTACCCCCGGTGGTTTTCCACGAGCACGTGCATGTGGAAGTAGCTCTCTCCCT
 TCTCAAATTGCACAAAGAAAAGGGCCTCCGGGGCCTTACTCACACGGCGCCATTCC
 GTCAGAAAGTCGCGCTGCAGCTTCTCGGCCACGGTCAGGGGTGCCTGCTCAATCA
 35 GATTCAGATCCATGTCAGAATCTGGCGGCAACTCCCATTCCTTCTCGGCCACCCAG
 TTCACAAAGCTGTCAGAAATGCCGGGCAGATGCCCGTCAAGGTCGCTGGGGACCT
 TAATCACAATCTCGTAAAACCCCGGCATGGCGGGCTGCGCGTTCAAACCTCCCGCTT
 40 CAAAATGGAGACCCTGCGTGCTCACTCGGGCTTAAATACCCAGCGTGACCACATG
 GTGTCGCAAAATGTCGCAAAACACTCACGTGACCTCTAATACAGGACTCTAGCGGT
 ACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGT
 45 CATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAG
 CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA
 ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAG
 50 CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGG
 GCGCTCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCT

55

60

65

ES 2 340 230 T3

GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGA
 ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGG
 5 CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC
 CCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
 CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
 10 GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCC
 CTTCCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
 CGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTT
 15 CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG
 GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
 AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
 20 TACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCA
 GTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC
 GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
 25 AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
 GGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGAT
 CTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTAT
 30 ATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT
 ATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCG
 TGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAA
 35 TGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC
 AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCC
 TCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG
 40 TTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACCG
 CTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCG
 AGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCT
 45 CCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGG
 CAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGT
 50 GACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCAATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACC

 GAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAG
 55 AACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCA
 AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCC
 AACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAA
 60 CAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTT
 GAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA
 TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAG
 65 GGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

ES 2 340 230 T3

Apéndice 2

5 AATTCCCATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGG
 GGTGGAGTTTGTGACGTGGCGCGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAG
 TCTCTAGAGTCCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTGTTTTGCGACATTTTTCGACACCA
 TGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAG
 10 CGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAG
 GTCCCCAGCGACCTTGACGGGCATCTGCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAAGTG
 GGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTG
 15 ATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGG
 AATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAG
 GGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAACACCAGGGGTGAAATCCA
 20 TGGTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATTTCGCGAAAACTGATTCAGAGAATTTACC
 GCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACTGGTTCGCGGTCACAAAGACCAGAAA
 TGGCGCCGGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCCAATTACTTG
 25 CTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTT
 AAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACG
 CACGTGTGCGCAGACGCAGGAGCAGAACAAAGAGAATCAGAATCCCCAATTCTGATGC
 30 GCCGGTGATCAGATCAAAAACCTTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTC
 GTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTCAT
 ACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGGAC
 35 AATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCCGACTACCTGGTGGGCC
 AGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGGAACTAAAC
 GGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTT
 40 CGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAAC
 ATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCA
 ATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTGACAAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAG
 45 GGGAAAGATGACCGCCAAGGTCTGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCA
 AGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCTCGGCCCAGATAGACCCGACTCCCGT
 GATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGACCT
 50 TCGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTACCCGCCGT
 CTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTG

55

60

65

ES 2 340 230 T3

GGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGGA
 5 GCCAAGAAAAGACCCGCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGC
 GCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGC
 AGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTC
 10 CCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGGA
 CAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTCTGT
 CAAAAAGGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCCAG
 15 ACGCTTGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGATGACTGCATCTTTGAA
 CAATAAATGATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGA
 GGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCAC
 CACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCC
 20 TGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAAC
 GAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCAAG
 GCCGGTGACAACCCCTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCGGAGTTCCAGCAGC
 25 GGCTTCAGGGCGACACATCGTTTTGGGGGCAACCTCGGCAGAGCAGTCTTCCAGGC
 CAAAAAGAGGGTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGCAAGCGGGTGAGACGGCT
 CCTGGAAAGAAGAGACCGTTGATTGAATCCCCCAGCAGCCCGACTCCTCCACGG
 30 GTATCGGCAAAAAGGCAAGCAGCCGGCTAAAAAGAAGCTCGTTTTCGAAGACGAA
 ACTGGAGCAGGCGACGGACCCCTGAGGGATCAACTTCCGGAGCCATGTCTGATG
 ACAGTGAGATGCGTGACAGCTGGCGGAGCTGCAGTCGAGGGCGGACAAGGTG
 35 CCGATGGAGTGGGTAATGCCTCGGGTGATTGGCATTGCGATTCCACCTGGTCTGA
 GGGCCACGTACGACCACCAGCACCAGAACCTGGGTCTTGCCACCTACAACAAC
 CACCTCTACAAGCGACTCGGAGAGAGCCTGCAGTCCAACACCTACAACGGATTCTC
 40 CACCCCTGGGGATACTTTGACTTCAACCGCTTCCACTGCCACTTCTCACCACGTG
 ACTGGCAGCGACTCATCAACAACAACTGGGGCATGCGACCCAAAGCCATGCGGGT
 CAAAATCTTCAACATCCAGGTCAAGGAGGTACGACGTCGAACGGCGAGACAACG
 45 GTGGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGATCTTTGCGGACTCGTCGTACGAACT
 GCCGTACGTCTCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTCCCGCCGTTCCACAGCAGAC
 GTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAACAACGGGAGTCAGGCAGT
 50 AGGACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTCTTCTCAGATGCTGCGTACCG
 GAAACAACCTTACCTTCAGCTACACTTTTGAGGACGTTCTTTCCACAGCAGCTACG
 CTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTAT

ES 2 340 230 T3

TACTTGAGCAGAACAAACACTCCAAGTGGAACCACCACGCAGTCAAGGCTTCAGTT
 TTCTCAGGCCCGGAGCGAGTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAACTGGCTTCCTGGA
 5 CCCTGTTACCGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAACAACAGTGA
 ATACTCGTGGAAGTGGAGCTACCAAGTACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGA
 ATCCGGGGCCCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAAAAGTTTTTTCCTCA
 10 GAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAATGTGAACATTG
 AAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCGGAACAACCAATCCCGTGGCTACG
 GAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGCTAC
 15 CGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGAT
 GTGTACCTTCAGGGGGCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCA
 CCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTTCGGAATTAACACCCTCCTCCACAGATTCTCA
 20 TCAAGAACACCCCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGCGGGCAAAGTTT
 GCTTCCTTCATCACACAGTACTCCACGGGACAGGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGG
 AGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAATTCAGTACACTTCCAAC
 25 TACAACAAGTCTGTTAATCGTGGACTTACCGTGGATACTAATGGCGTGTATTACAGAG
 CCTCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAA
 TAAACCGTTTAATTCGTTTCAGTTGAACCTTTGGTCTCTGCGTATTTCTTTCTTATCTA
 30 GTTTCATGCTCTAGACTACTACGTCACCCGCCCCGTTCCACGCCCCGCGCCAC
 GTCACAACTCCACCCCCTCATTATCATATTGGCTTCAATCCAAAATAAGGTATATTA
 TTGATGATGCATCGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCC
 35 AACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAATTCAGACGATTGAGCGTCAAAATG
 TAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGG
 ATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTA
 40 CTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTAC
 TCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCTGT
 CTAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAA
 45 GCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
 AAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC
 CCTAGCGCCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCT
 50 TTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTA
 CGGCACCTCGACCCCCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATC
 GCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG

55

60

65

ES 2 340 230 T3

GACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTT
 ATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAA
 5 ATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTAT
 ACAATCTTCCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGAC
 ATGCTAGTTTTACGATTACCGTTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGC
 10 AATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATGA
 ATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCC
 TTTCTCACCCGTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAATATA
 15 TGAGGGTTCTAAAAATTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGT
 ATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTA
 TTGCTTAATTTTGCTAATTCTTTGCCTTGCCCTGTATGATTTATTGGATGTTGGAATTC
 20 CTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGC
 ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCC
 AACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGA
 25 CAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACC
 GAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCA
 TGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGA
 30 ACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT
 AACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTT
 CCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCCTGTTTTTGCTCACCC
 35 AGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGT
 ACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAA
 CGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
 40 ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT
 GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
 AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGA
 45 CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCAT
 GTAACGCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGA
 GCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTG
 50 GCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT
 AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGA
 TAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCA

ES 2 340 230 T3

5 GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTAT
 GGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGT
 AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAA
 TTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAAC
 10 GTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT
 CTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGC
 TACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA
 ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTT
 15 AGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAA
 TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGAC
 TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGT
 20 GCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCG
 TGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCG
 GTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
 25 GCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTT
 TTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCT
 TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTAT
 30 CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGC
 CGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGC
 CCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCA

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 340 230 T3

Apéndice 3

5 ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAAT
 AAGACAGTGGTGGAAAGCTCAAACCTGGCCCACCACCACCAAAGCCCCGCAGAGCGG
 CATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTT
 10 CAACGGACTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGA
 GCACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAG
 TACAACCACGCCGACGCGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGG
 15 GGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAAGAGGGTTCTTGAACCTCTG
 GGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAAAGAGGCCGGTAGAGC
 ACTCTCCTGTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGC
 CTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGAC
 20 CCCCAGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTCTGGGAACTAATACGA
 TGACTTCAGTTAATTCTGCAGAAGCCAGCACTGGTGCAGGAGGGGGGGGCGAGTAA
 TTCTGTCAAAAGCATGTGGAGTGAGGGGGGCCACTTTTAGTGCTAACTCTGTAACCT
 25 GTACATTTTCCAGACAGTTTTTAATTCCATATGACCCAGAGCACCATTATAAGGTGTT
 TTCTCCCGCAGCGAGTAGCTGCCACAATGCCAGTGGAAAGGAGGCAAAGGTTTGC
 ACCATCAGTCCCATAATGGGATACTCAACCCCATGGAGATATTTAGATTTTAATGCT
 30 TTAAATTTATTTTTTTCACCTTTAGAGTTTCAGCACTTAATTGAAAATTATGGAAGTAT
 AGCTCCTGATGCTTTAACTGTAACCATATCAGAAATTGCTGTTAAGGATGTTACAGA
 CAAAAGTGGAGGGGGGGGTACAGGTTACTGACAGCACTACAGGGCGCCTATGCATG
 35 TTAGTAGACCATGAATACAAGTACCCATATGTGTTAGGGCAAGGTCAGGATACTTTA
 GCCCCAGAACTTCCTATTTGGGTATACTTTCCCCCTCAATATGCTTACTTAACAGTA
 GGAGATGTTAACACACAAGGAATTTCTGGAGACAGCAAAAATTAGCAAGTGAAGA
 40 ATCAGCATTTTATGTTTTGGAACACAGTTCTTTTCAGCTTTTAGGTACAGGAGGTAC
 AGCAACTATGTCTTATAAGTTTCCTCCAGTGCCCCCAGAAAATTTAGAGGGCTGCA
 GTCAACACTTTTATGAAATGTACAATCCCTTATACGGATCCCGCTTAGGGGTTCTTG
 45 ACACATTAGGAGGTGACCCAAAATTTAGATCTTTAACACATGAAGACCATGCAATTC
 AGCCCCAAAACCTTCATGCCAGGGGCCACTAGTAACTCAGTGTCTACAAAGGAGGGA
 GACAGCTCTAATACTGGAGCTGGAAAAGCCTTAACAGGCCTTAGCACAGGTACCTC
 50 TCAAAACACTAGAATATCCTTACGCCCTGGGCCAGTGTCTCAGCCATACCACCACT
 GGGACACAGATAAATATGTCACAGGAATAAATGCCATTTCTCATGGTCAGACCACT

55

60

65

ES 2 340 230 T3

TATGGTAACGCTGAAGACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTGGGTAGATTTCCAAATGA
 AAAAGAACAGCTAAAACAGTTACAGGGTTTAAACATGCACACCTACTTTCCCAATAA
 5 AGGAACCCAGCAATATACAGATCAAATTGAGCGCCCCCTAATGGTGGGTTCTGTAT
 GGAACAGAAGAGCCCTTCACTATGAAAGCCAGCTGTGGAGTAAATTCCAAATTTA
 GATGACAGTTTTTAAACTCAGTTTGCAGCCTTAGGAGGATGGGGTTTGCATCAGCC
 10 ACCTCCTCAAATATTTTTTAAAAATATTACCACAAAAGTGGGCCAATTGGAGGTATTAAA
 TCAATGGGAATTACTACCTTAGTTCAGTATGCCGTGGGAATTATGACAGTAACTATG
 ACATTTAAATTGGGGCCCCGTAAAGCTACGGGACGGTGGGAATCCTCAACCTGGAGT
 15 ATATCCCCCGCACGCAGCAGGTCATTTACCATATGTACTATATGACCCACAGCTA
 CAGATGCAAAACAACACCACAGACATGGATATGAAAAGCCTGAAGAATTGTGGACA
 GCCAAAAGCCGTGTGCACCCATTGTAA

Apéndice 4

M A A D G Y L P D W L E D T L S E G I R Q W W K
 L K P G P P P P K P A E R H K D D S R G L V L P
 G Y K Y L G P F N G L D K G E P V N E A D A A A
 30 L E H D K A Y D R Q L D S G D N P Y L K Y N H A
 D A E F Q E R L K E D T S F G G N L G R A V
 F Q A K K R V L E P L G L V E E P V K T A P G K K
 R P V E H S P V E P D S S S G T G K A G Q Q P A
 35 R K R L N F G Q T G D A D S V P D P Q P L G Q P
 P A A P S G L G T N T M T S V N S A E A S T G A
 G G G G S N S V K S M W S E G A T F S A N S V
 T C T F S R Q F L I P Y D P E H H Y K V F S P A A
 40 S S C H N A S G K E A K V C T I S P I M G Y S T
 P W R Y L D F N A L N L F F S P L E F Q H L I E N
 Y G S I A P D A L T V T I S E I A V K D V T D K T
 G G G V Q V T D S T T G R L C M L V D H E Y K Y
 P Y V L G Q G Q D T L A P E L P I W V Y F P P Q
 45 Y A Y L T V G D V N T Q G I S G D S K K L A S E
 E S A F Y V L E H S S F Q L L G T G G T A T M S
 Y K F P P V P P E N L E G C S Q H F Y E M Y N P
 L Y G S R L G V P D T L G G D P K F R S L T H E D
 50 H A I Q P Q N F M P G P L V N S V S T K E G D S
 S N T G A G K A L T G L S T G T S Q N T R I S L R
 P G P V S Q P Y H H W D T D K Y V T G I N A I S
 H G Q T T Y G N A E D K E Y Q Q G V G R F P N
 55 E K E Q L K Q L Q G L N M H T Y F P N K G T Q Q
 Y T D Q I E R P L M V G S V W N R R A L H Y E S
 Q L W S K I P N L D D S F K T Q F A A L G G W G
 L H Q P P P Q I F L K I L P Q S G P I G G I K S M
 G I T T L V Q Y A V G I M T V T M T F K L G P
 60 R K A T G R W N P Q P G V Y P P H A A G H L P Y
 V L Y D P T A T D A K Q H H R H G Y E K P E E L
 W T A K S R V H P L *

ES 2 340 230 T3

Apéndice 5

5 AATTCCCATCATCAATAATATACCTTATTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGG
 GGTGGAGTTTGTGACGTGGCGCGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAG
 TCTCTAGAGTCCTGTATTAGAGGTCACGTGAGTGTTTTGCGACATTTTGCGACACCA
 TGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTG
 10 AAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATT
 AAGGTCCCCAGCGACCTTGACGGGCATCTGCCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAA
 CTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAAT
 15 CTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGCCGAGAAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGA
 CGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGA
 GAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGGAACACCAGGGGTGAAA
 20 TCCATGGTTTTGGGACGTTTCCTGAGTCAGATTGCGGAAAACTGATTCAGAGAATT
 TACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACTGGTTCGCGGTACAAAAGACCAGAA
 ATGGCGCCCGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCAATTACTT
 25 GCTCCCCAAAACCCAGCCTGAGCTCCAGTGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATT
 TAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGAC
 GCACGTGTGCGACAGCAGGAGCAGAACAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGAT
 30 GCGCCGGTGATCAGATCAAAAACTTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCCGGTGGC
 TCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGGATCCAGGAGGACCAGGCCTC
 ATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACTCGCGGTCCCAAATCAAGGCTGCCTTGG
 35 ACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCCGACTACCTGGTGGG
 CCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTGAACTAAA
 CGGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGT
 40 TCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCCTGCAACTACCGGGAAGACCAA
 CATCGCGGAGGCCATAGCCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACC
 AATGAGAACTTTCCCTTCAACGACTGTGTGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGA
 45 GGGGAAGATGACCGCCAAGGTGCTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAG
 CAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCC
 GTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACTCAACGAC
 50 CTTCTGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCC
 GTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACCAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGG
 TGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTG

55

60

65

ES 2 340 230 T3

GAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGT
 GCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC
 GCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTT
 5 TCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACTCACG
 GACAGAAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTCAGAATCTCAACCCGTTTCTGTC
 10 GTCAAAAAGGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCATCATATCATGGGAAAGGTGCC
 AGACGCTTGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTGGATGACTGCATCTTTG
 AACATAAATGATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTC
 GAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTGGCCAC
 15 CACCACCAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCC
 TGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGAAGCTCGACAAGGGAGAGCCGGTCAAC
 GAGGCAGACGCCGCGGCCCTCGAGCAGCAGAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGAC
 20 AGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCGGAGTTTCAGGAGC
 GCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGC
 GAAAAAGAGGGTCTTGAACCTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTC
 25 CGGGAAAAAAGAGGCCGGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGG
 AACCGGAAAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACT
 GGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCCCAGCCTCTCGGACAGCCACCAGCAGCCC
 30 CCTCTGGTCTGGGAACATAACGATGGCTACAGGCAGTGGCGCACCAATGGCAGA
 CAATAACGAGGGGCGCCGACGGAGTGGGTAAATTCCTCCGGAAATTGGCATTGCGAT
 TCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCAGAACCTGGGCCCTGC
 CCACCTACAACAACCACCTCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGAAC
 35 GACAATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTG
 CACTGCCACTTTTCACCACGTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAAGTGGGGATT
 CCGACCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTACGCG
 40 AGAATGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGTTCAGGTGTTT
 ACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGGTCGGCGCACCAAGGCTGTC
 TCCCGCCGTTTCCAGCGGACGTCTTCATGGTCCCTCAGTATGGATACCTCACCTG
 45 AACACGGAAGTCAAGCGGTGGGACGCTCATCCTTTTACTGCCTGGAGTACTTCCC
 TTCGCAGATGCTAAGGACTGGAAATAACTTCCAATTCAGCTATACCTTCGAGGATGT
 ACCTTTTCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTTTGGATCGCTTGATGAATCCTC
 50 TTATTGATCAGTATCTGTACTACCTGAACAGAACGCAAGGAACAACCTCTGGAACAA
 CCAACCAATCACGGCTGCTTTTTAGCCAGGCTGGGCCTCAGTCTATGTCTTTGC

55

60

65

ES 2 340 230 T3

AGGCCAGAAATTGGCTACCTGGGCCCTGCTACCGGCAACAGAGACTTTCAAAGACT
 GCTAACGACAACAACAACAGTAACTTTCCTTGGACAGCGGCCAGCAAATATCATCT
 5 CAATGGCCGCGACTCGCTGGTGAATCCAGGACCAGCTATGGCCAGTCACAAGGAC
 GATGAAGAAAAATTTTCCCTATGCACGGCAATCTAATATTTGGCAAAGAAGGGA
 CAACGGCAAGTAACGCAGAATTAGATAATGTAATGATTACGGATGAAGAAGAGATT
 10 CGTACCACCAATCCTGTGGCAACAGAGCAGTATGGAAGTGTGGCAAATAACTTGCA
 GAGCTCAAATACAGCTCCCACGACTGGAAGTGTCAATCATCAGGGGGCCTTACCTG
 GCATGGTGTGGCAAGATCGTGACGTGTACCTTCAAGGACCTATCTGGGCAAAGA
 15 TTCTCACACGGATGGACACTTTCATCCTTCTCCTCTGATGGGAGGCTTTGGACTG
 AAACATCCGCCTCCTCAAATCATGATCAAAAATACTCCGGTACCTGCGAATCCTTCG
 ACCACCTTCAGTGCGGCAAAGTTTGCTTCCTTCATCACACAGTACTCCACGGGACA
 GGTGAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGCAAACGCTGGA
 20 ATCCCGAAATTCAGTACACTTCCAACACTACAACAAGTCTGTTAATCGTGGACTTACCG
 TGGATACTAATGGCGTGTATTGAGAGCCTCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACT
 CGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAATAAACCGTTTAATTCGTTTCAGTTGAACTTT
 25 GGTCTCTGCGTATTTCTTCTTATCTAGTTTTCCATGCTCTAGACTACTACGTCACCC
 GCCCCGTTCCCACGCCCGCGCCACGTCAAAAACCTCCACCCCCTCATTATCATATT
 GGCTTCAATCCAAAATAAGGTATATTATTGATGATGCATCGCTGGCGTAATAGCGAA
 30 GAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGA
 ATTCCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCTGTTGC
 AATGGCTGGCGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTT
 35 CTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCGACAACGGTTA
 ATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTT
 CTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTA
 40 GCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACC
 ATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG
 CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCC
 CTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGGCTC
 45 CCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACCTTGATTAG
 GGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC
 GTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAA
 50 CCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTG
 GTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACG

55

60

65

ES 2 340 230 T3

TTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATC
 AACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCATCGATTCTCT
 5 TGTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGAGACCTCTCAAAA
 ATAGCTACCCTCTCCGGCATGAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGAT
 GGTGATTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCGTTTGAATCTTACCTACACATTAC
 10 TCAGGCATTGCATTTAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTTTATCCTTGCGTTGAAA
 TAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATT
 TAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGTAAATCTTTGCCTTGCCGTGA
 15 TGATTTATTGGATGTTGGAATTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTG
 CGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCAT
 AGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGGCTTG
 20 TCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATG
 TGTCAGAGGTTTTACCGTCTATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGA
 TACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGG
 CACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCA
 25 AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAA
 GGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCAT
 TTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAG
 30 ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
 CTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG
 CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGC
 35 GCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC
 TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGAT
 AACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCG
 40 CTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAG
 CTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGG
 CAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAA
 45 CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC
 CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTC
 GCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATC
 50 TACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA
 TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC
 TTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT

55

60

65

ES 2 340 230 T3

GATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCT
5 GCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTGCCGGATCAA
GAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAA
TACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG
10 CACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC
GATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA
GCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGAC
CTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
15 GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG
CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGT
TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAG
20 CCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGC
CTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC
CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA
25 GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAG