(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 856 090**

(51) Int. CI.:

C12N 15/864 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2015 PCT/US2015/051785**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16049230**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2015 E 15775884 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020 EP 3198018**

(54) Título: **Variantes de vectores de virus adenoasociados para la edición genómica de alta eficacia y sus métodos**

(30) Prioridad:

24.09.2014 US 201462054899 P
14.10.2014 US 201462063587 P
25.08.2015 US 201562209862 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2021

(73) Titular/es:

CITY OF HOPE (100.0%)
1500 East Duarte Road
Duarte, CA 91010, US

(72) Inventor/es:

CHATTERJEE, SASWATI;
SMITH, LAURA y
WONG, KAMEHAMEHA

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Variantes de vectores de virus adenoasociados para la edición genómica de alta eficacia y sus métodos

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental bajo la Subvención Nº HL087285 otorgada por the National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Antecedentes

El genoma de los virus adenoasociados (AAV) está formado por ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNss), de sentido bien positivo o bien negativo, que tiene una longitud de aproximadamente 4,9 kilobases. El genoma comprende repeticiones terminales invertidas (ITRs) en ambos extremos de la cadena de ADN, y dos marcos de lectura abiertos (ORFs): rep y cap. Rep está compuesto por cuatro genes solapados que codifican proteínas rep requeridas para el ciclo vital de los AAV, y cap contiene secuencias nucleotídicas solapadas de proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3, que interactúan conjuntamente para formar una cápside de una geometría icosaédrica.

Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) derivados del parvovirus AAV2 humano de replicación deficiente han resultado ser vehículos de transferencia génica seguros y eficaces que todavía se tienen que identificar definitivamente bien como patogénicos o bien como oncogénicos [3-4, 6, 18-19, 26, 31]. Los rAAV transducen células primarias que no se dividen, son de baja inmunogenicidad y dirigen la expresión génica sostenida *in vivo* [6, 10, 20]. La infección con AAV silvestres está asociada a la inhibición de la transformación oncogénica y las repeticiones terminales invertidas de AAV pueden conferir realmente oncoprotección [2, 28, 52-55]. Un estudio reciente de grupos de tejidos humanos encontró que la médula ósea y el hígado eran los lugares más comunes de aislados de AAV presentes en la naturaleza en seres humanos, sugiriendo que la infección de células de la médula ósea por AAV no es rara.

El uso de vectores virales para terapia génica se ha considerado desde hace mucho tiempo. Debido a su potencial para la corrección de larga duración y la facilidad de manipulación *ex vivo*, el sistema hematopoyético fue uno de los principales objetivos de la terapia génica. Sin embargo, a pesar del esfuerzo significativo, el éxito terapéutico real sigue siendo esquivo [5]. Esto se debe a la incapacidad reconocida de la mayoría de los vectores virales para transducir células madre hematopoyéticas (HSC) [23] latentes que no se dividen, así como a problemas de seguridad que surgen de oncogénesis de inserción [15, 22]. Sin embargo, se ha demostrado satisfactoriamente una transferencia génica estable a HSC tanto murinas como humanas mediante rAAV [8, 11-12, 24, 27, 29-30, 37].

Adicionalmente, ha sido difícil usar eficazmente vectores virales en terapia génica para tratar afecciones neurológicas, particularmente enfermedades o trastornos del sistema nervioso central debido a la dificultad de cruzar la barrera hematoencefálica, una separación celular y metabólica de la sangre circulante del fluido extracelular cerebral creada por uniones estrechas entre células endoteliales que restringen el paso de solutos.

CD34 es una glicoproteína de la superficie celular y un factor de adherencia célula-célula. La proteína CD34 se expresa en tejido hematopoyético y vascular temprano y una célula que exprese CD34 se denomina $CD34^+$. La integración cromosómica de rAAV en HSC $CD34^+$ humanas [8, 12, 16, 29] y la transducción eficaz de HSC humanas primitivas pluripotentes que se autorrenuevan capaces de soportar el injerto primario y secundario de múltiples linajes se han demostrado en ratones NOD-SCID inmunodeficientes [29]. Se observó que la transducción de HSC primitivas capaces de soportar el injerto en serie era atribuible a la propensión de rAAV a transducir eficazmente células CD34+CD38- latentes primitivas que residen en GO [24]. A pesar de varios informes de transferencia génica mediada por rAAV satisfactoria a HSC humanas *in vitro* y en HSC murinas y de primates no humanos *in vivo*, todavía persiste la controversia relativa a la utilidad de rAAV para la transducción a HSC. Estas discrepancias surgieron principalmente de estudios *in vitro* a corto plazo que determinaban la transducción al perfilar la expresión y son atribuibles a las restricciones identificadas para la expresión transgénica a partir de rAAV2, incluyendo eliminación del revestimiento viral [35], tráfico intracelular [33], transporte nuclear y síntesis de la segunda cadena [36].

Aunque AAV2 sigue siendo el virus prototípico mejor estudiado para vectores basados en AAV [1, 13, 18, 21], la identificación de un gran número de nuevos serotipos de AAV potencia significativamente el repertorio de vectores de transferencia génica potenciales [14]. AAV1, 3 y 4 se aislaron como contaminantes de materiales adenovirales, y AAV5 se aisló de una verruga condilomatosa humana. AAV6 surgió como un recombinante de laboratorio entre AAV1 y AAV2. Recientemente, se identificaron más de 100 aislados distintos de AAV presente en la naturaleza en tejidos humanos y de primate no humano. Esto condujo al uso de cápsides derivadas de algunos de estos aislados para pseudotipado, reemplazando las proteínas de envuelta de AAV2 por las nuevas envueltas, con lo que los genomas de rAAV2 se empaquetan a continuación usando AAV2 rep y nuevos genes de la cápside. El uso de nuevas cápsides, las proteínas como parte de la cubierta viral, daba como resultado la evitación de muchas limitaciones en la expresión transgénica asociada con AAV2 [32, 35-36].

En un esfuerzo para evitar estas restricciones, una investigación reciente ha mostrado que nuevas envueltas de la cápside dan como resultado una reducción en la degradación de la cápside mediada por el proteasoma, un incremento en el tráfico y la retención nucleares. Las nuevas cápsides, muchas de las cuales utilizan nuevos receptores, amplían el tropismo de rAAV permitiendo la transducción eficaz de tejidos previamente refractarios y proporciona un medio para evitar inmunidad serológica preexistente a AAV2 muy predominante, lo que planteaba importantes limitaciones clínicas en un experimento reciente. Notablemente, algunas nuevas cápsides parecen alterar el procesamiento intracelular de rAAV. Por ejemplo, la eliminación del revestimiento y la expresión transgénica se aceleran en el contexto de AAV8 en comparación con cápsides de AAV2 naturales. Recientemente, se observaba que la expresión transgénica se basaba en proteínas de la cápside, independientemente del origen del serotipo de las repeticiones terminales invertidas (ITRs).

AAV presente en la naturaleza es identificable en células madre de sangre periférica cebadas con citocina. Las secuencias de la cápside de estos AAV son únicas. Estas cápsides son capaces de pseudotipar genomas de AAV2 recombinante. La Publicación de Patente de EE. UU. Número 20130096182A1 describe AAVF1-17 de la cápside, y su uso para la transducción celular y la transferencia génica. Cualquier mejora en el área de la terapia génica relativa a la transferencia génica y la expresión tanto permanentes como reversibles con propósitos terapéuticos sería una mejora significativa en la técnica. Por otra parte, el aporte génico seguro y eficaz a células madre sigue siendo un reto significativo en el sector a pesar de décadas de investigación. Por lo tanto, la capacidad para modificar genéticamente células madre representaría una ventaja significativa.

Además, la edición genómica mediante direccionamiento o corrección génicos en un sitio específico en el genoma sin dejar una hulla, en el genoma es atractiva para la corrección precisa de enfermedades hereditarias y adquiridas. La tecnología actual realiza esto a través del uso de endonucleasas exógenas tales como nucleasas con dedos de cinc, TAL endonucleasas o sistemas de caspasa 9/CRISPR. Sin embargo, estos enfoques "tradicionales" están asociados con toxicidad y efectos de desvío de la diana de la escisión con endonucleasas. Por lo tanto, la capacidad de modificar genéticamente células madre seguramente y eficazmente a altas frecuencias sin la necesidad de escisión con endonucleasas exógenas representaría un avance significativo.

Adicionalmente, los métodos actuales de transducción genética de HSCs humanas implican la transducción *ex vivo* de células madre donantes purificadas seguido por trasplante a receptores habitualmente "acondicionados". Los procedimientos de recolección celular son invasivos e implican bien recolección de la médula ósea o bien múltiples días de cebado con factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) del donante seguido por aféresis. Los procedimientos de transducción *ex vivo* pueden afectar al potencial hematopoyético de las células madre. Adicionalmente, las células transducidas in vitro se pueden probar con respecto a la esterilidad, toxicidad, etc. antes del trasplante. Antes del trasplante a receptores, las células madre a menudo tienen que sufrir acondicionamiento con quimioterapia o radiación para asegurar el injerto. Habitualmente, el procedimiento requiere la hospitalización de los pacientes durante al menos varios días o a veces más. En general, es un procedimiento arduo, costoso y de alto riesgo que limita mucho la utilidad de la terapia con células madre. Se necesita un procedimiento que ofrezca una mejor alternativa a los métodos de transducción de células madre actuales sin la necesidad de purificación y transducción *ex vivo*.

Khan y cols. (2011; Nature Protocols; 6(4): 482-501) proporciona una visión general de vectores derivados de AAV para el direccionamiento génico de diferentes tipos de células humanas. Miller y cols. (2006; Nature Biotechnology; 24(8): 1022-1026) describe el direccionamiento génico mediado por AAV *in vivo* para corregir la mutación del gen GusB responsable de la mucopolisacaridosis murina tipo VII. El documento US2013/096182 describe aislados del clado F de AAV procedentes de células madre hematopoyéticas $CD34^+$ humanas para el uso en la transducción de alta eficacia de células madre de sangre de cordón umbilical humano.

SUMARIO

La presente invención proporciona un método *ex vivo* para editar un locus diana de un cromosoma de mamífero, en donde el método comprende transducir una célula de mamífero que comprende el cromosoma de mamífero con un virus adenoasociado (AAV) de replicación defectuosa que comprende

a) una cápside del clado F de AAV; y

b) un genoma de corrección que comprende:

(i) un elemento de edición para la inserción de uno o más nucleótidos, la eliminación de uno o más nucleótidos o la sustitución de uno o más nucleótidos con relación al locus diana, en donde el elemento de edición se selecciona de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en el locus diana;

(ii) un secuencia nucleotídica 5’ de la rama homóloga 5’ del elemento de edición, que tiene homología con una región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana; y

(iii) un secuencia nucleotídica 3’ de la rama homóloga 3’ del elemento de edición, que tiene homología con una región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana

en donde la célula se transduce sin cotransducir una nucleasa exógena o una secuencia nucleotídica que codifica una nucleasa exógena, en donde la cápside del clado F de AAV comprende:

(i) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 203 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17;

(ii) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 138 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17; y/o

(iii) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 1 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17.

La presente invención también proporciona un virus adenoasociado (AAV) de replicación defectuosa para el uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto, comprendiendo el método administrar el AAV con replicación defectuosa al sujeto sin coadministrar una nucleasa exógena o una secuencia nucleotídica que codifica una nucleasa exógena, en donde el AAV con replicación defectuosa comprende:

a) una cápside del clado F de AAV; y

b) un genoma de corrección que comprende:

(i) un elemento de edición para la inserción de uno o más nucleótidos, la eliminación de uno o más nucleótidos o la sustitución de uno o más nucleótidos con relación al locus diana, en donde el elemento de edición se selecciona de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en un locus diana de un cromosoma de mamífero;

(ii) un secuencia nucleotídica 5’ de la rama homóloga 5' del elemento de edición, que tiene homología con una región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana; y

(iii) un secuencia nucleotídica 3’ de la rama homóloga 3’ del elemento de edición, que tiene homología con una región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana

en donde la cápside del clado F de AAV comprende:

(i) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 203 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17;

(ii) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 138 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17; y/o

(iii) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 1 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17.

En algunas realizaciones, el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 1% en ausencia de una nucleasa exógena para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero en la célula.

En algunas realizaciones, el genoma de corrección comprende una secuencia nucleotídica 5’ de la repetición terminal invertida 5’ (5' ITR) de la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5', y una secuencia nucleotídica 3’ de la repetición terminal invertida 3' (3' ITR) de la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3’. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5’ ITR y la secuencia nucleotídica de 3’ ITR son sustancialmente idénticas a una 5’ITR del virus AAV2 y una 3’ ITR del virus AAV2, respectivamente. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5’ ITR y la secuencia nucleotídica de 3’ ITR son sustancialmente imágenes especulares entre sí. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5’ ITR tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:36, y la secuencia nucleotídica de 3’ ITR tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:37. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5’ ITR y la secuencia nucleotídica de 3’ ITR son sustancialmente idénticas a una 5’ITR del virus AAV5 y una 3’ ITR del virus AAV5, respectivamente. En algunas realizaciones, la secuencia

nucleotídica de 5’ ITR y la secuencia nucleotídica de 3’ ITR son sustancialmente imágenes especulares entre sí. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5’ ITR tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:38, y la secuencia nucleotídica de 3’ ITR tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:39.

En algunas realizaciones, el genoma de corrección tiene una ausencia esencial de un promotor ligado operativamente a la secuencia nucleotídica del elemento de edición. En algunas realizaciones, el genoma de corrección comprende además un promotor exógeno ligado operativamente al elemento de edición.

En algunas realizaciones, el genoma del AAV con replicación defectuosa comprende una ausencia esencial de un gen *rep* de AAV y un gen *cap* de AAV.

En algunas realizaciones, cada una de las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 3’ y 5’ tiene independientemente una longitud de nucleótidos de entre aproximadamente 500 y 1000 nucleótidos o entre aproximadamente 600 y 1000 nucleótidos. En algunas realizaciones, las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 3’ y 5’ tienen longitudes de nucleótidos sustancialmente iguales. En algunas realizaciones, las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 3’ y 5’ tienen longitudes de nucleótidos asimétricas. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5’ tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia nucleotídica con la región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3’ tiene al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia nucleotídica con la región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5’ tiene 100% de identidad de secuencia con la región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana y la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3’ tiene 100% de identidad de secuencia con la región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana.

En algunas realizaciones, el elemento de edición consiste en un nucleótido. En algunas realizaciones, el locus diana es una secuencia nucleotídica que consiste en un nucleótido, y el locus diana representa una mutación puntual del cromosoma de mamífero.

En algunas realizaciones, el locus diana puede comprender un intrón de un cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana puede comprender un exón de un cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana puede comprender una región no codificante de un cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana puede comprender una región reguladora de un cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana puede ser un locus asociado con un estado patológico según se describe en la presente.

En algunas realizaciones, el elemento de edición comprende al menos 1, 2, 10, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 o 5000 nucleótidos. En algunas realizaciones, el elemento de edición comprende de 1 a 5500, de 1 a 5000, de 1 a 4500, de 1 a 4000, de 1 a 3000, de 1 a 2000, de 1 a 1000, de 1 a 500, de 1 a 200 o de 1 a 100 nucleótidos, o de 2 a 5500, de 2 a 5000, de 2 a 4500, de 2 a 4000, de 2 a 3000, de 2 a 2000, de 2 a 1000, de 2 a 500, de 2 a 200 o de 2 a 100 nucleótidos, o de 10 a 5500, de 10 a 5000, de 10 a 4500, de 10 a 4000, de 10 a 3000, de 10 a 2000, de 10 a 1000, de 10 a 500, de 10 a 200 o de 10 a 100 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el elemento de edición comprende un exón, un intrón, una región no traducida (UTR) 5’, una UTR 3’, un promotor, un donante de empalme, un aceptor de empalme, una secuencia que codifica un ARN no codificante, un aislante, un gen, o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, el elemento de edición es un fragmento de una secuencia codificante de un gen dentro de o que abarca el locus diana.

En algunas realizaciones, el locus diana es una secuencia nucleotídica que comprende n nucleótidos donde n es un número entero mayor de o igual a uno; el elemento de edición comprende m nucleótidos donde m es un número entero igual a n; y el elemento de edición representa una sustitución para el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana es una secuencia nucleotídica que comprende n nucleótidos donde n es un número entero mayor de o igual a uno; el elemento de edición comprende m nucleótidos donde m es un número entero mayor de n; y el elemento de edición representa una adición sustitutiva para el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana es una secuencia nucleotídica que comprende n nucleótidos donde n es un número entero mayor de o igual a dos; el elemento de edición comprende m nucleótidos donde m es un número entero menor de n; y el elemento de edición representa una eliminación sustitutiva para el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana es un enlace internucleotídico; el elemento de edición comprende m nucleótidos donde m es un número entero mayor de o igual a uno; y el elemento de edición representa una adición para el locus diana del cromosoma de mamífero.

En algunas realizaciones, el elemento de edición es un enlace internucleotídico. En algunas realizaciones, el locus diana es una secuencia nucleotídica que comprende uno o más nucleótidos, y el elemento de edición comprende una eliminación para el locus diana del cromosoma de mamífero.

En algunas realizaciones, el locus diana del cromosoma de mamífero es un locus diana mutante que comprende uno o más nucleótidos mutantes, con relación a un cromosoma de mamífero silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, el locus diana mutante comprende una mutación puntual, una mutación de sentido alterado, una

mutación sin sentido, una inserción de uno o más nucleótidos, una eliminación de uno o más nucleótidos, o sus combinaciones. En algunas realizaciones, el locus diana mutante comprende una mutación amórfica, una mutación neomórfica o una mutación antimórfica. En algunas realizaciones, el locus diana mutante comprende una mutación dominante autosómica, una mutación recesiva autosómica, una mutación heterocigótica, una mutación homocigótica, o sus combinaciones. En algunas realizaciones, el locus diana mutante se selecciona de un promotor, un potenciador, una secuencia de señalización, un intrón, un exón, un sitio donante de empalme, un sitio aceptor de empalme, un sitio interno de entrada al ribosoma, un exón invertido, un aislante, un gen, una inversión cromosómica y una translocación cromosómica dentro del cromosoma de mamífero.

La cápside del clado F de AAV comprende al menos una VP3 del clado F según se indica en una cualquiera de SEQ ID Nos: 2-17. En algunas realizaciones, la cápside del clado F de AAV comprende VP2 del clado F y VP3 del clado F según se indica en una cualquiera de SEQ ID Nos: 2-17. En algunas realizaciones, la cápside del clado F de AAV comprende proteínas VP1 del clado F, VP2 del clado F y VP3 del clado F según se indica en una cualquier de SEQ ID Nos: 2-17. En algunas realizaciones, la cápside del clado F de AAV comprende una proteína de la cápside VP1 seleccionada de una proteína de la cápside VP1 de uno cualquiera de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17, que corresponde a los aminoácidos 1 a 736 según se indica en SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente. En algunas realizaciones, la cápside del clado F de AAV comprende una proteína de la cápside VP1 y una VP2 seleccionadas independientemente de una proteína de la cápside VP1 y VP2 de uno cualquiera de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17, que corresponden a los aminoácidos 1 a 736 y los aminoácidos 138 a 736 según se indica en SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente. En algunas realizaciones, la cápside del clado F de AAV comprende una proteína de la cápside VP1, una VP2 y una VP3 seleccionadas independientemente de una proteína de la cápside VP1, VP2 y VP3 de uno cualquiera de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17, que corresponden a los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 según se indica en SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente. En algunas realizaciones, la cápside del clado F de AAV comprende cada una de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de uno cualquiera de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17, que corresponden a los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 según se indica en SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente.

Según se usan en la presente, AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF10, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, y AAVF17 también se denominan AAVHSC1, AAVHSC2, AAVHSC3, AAVHSC4, AAVHSC5, AAVHSC6, AAVHSC7, AAVHSC8, AAVHSC9, AAVHSC10, AAVHSC11, AAVHSC12, AAVHSC13, AAVHSC14, AAVHSC15, AAVHSC16, y AAVHSC17, respectivamente. En otras palabras, cualquier mención a AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF10, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, o AAVF17 es equivalente a y se puede reemplazar por AAVHSC1, AAVHSC2, AAVHSC3, AAVHSC4, AAVHSC5, AAVHSC6, AAVHSC7, AAVHSC8, AAVHSC9, AAVHSC10, AAVHSC11, AAVHSC12, AAVHSC13, AAVHSC14, AAVHSC15, AAVHSC16, o AAVHSC17, respectivamente.

En algunas realizaciones, el cromosoma de mamífero se selecciona de cromosoma humano 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y. En algunas realizaciones, el cromosoma de mamífero se selecciona de cromosoma de ratón 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X y Y. En algunas realizaciones, el cromosoma de mamífero no es cromosoma 19 humano.

En algunas realizaciones, el cromosoma de mamífero es un cromosoma de células somáticas. En algunas realizaciones, la célula somática procede de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido conectivo (incluyendo sangre), tejido muscular, tejido nervioso y tejido epitelial. En algunas realizaciones, la célula somática procede de un órgano seleccionado del grupo que consiste en pulmón, corazón, hígado, riñón, músculo, cerebro, ojo, mama, hueso y cartílago. En algunas realizaciones, la célula somática es una célula CD34+.

En algunas realizaciones, la célula es una célula madre. En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre hematopoyética, una célula madre de sangre del cordón umbilical, una célula madre de médula ósea, una célula madre hepática fetal o una célula madre de sangre periférica. En algunas realizaciones, la célula se selecciona del grupo que consiste en una línea de células madre hematopoyéticas (HSC) CD34+, una línea de células de leucemia K562 CD34+, una línea de células hepáticas humanas HepG2, una célula madre de sangre periférica, una célula madre de sangre del cordón umbilical, una célula madre de sangre periférica CD34+, una línea celular de fibroblastos diploides humanos WI-38, una línea celular de cáncer de mama humano MCF7, una línea celular de retinoblastoma humano Y79, una línea de células B humanas inmortalizadas por EBV SCID-X1 LBL, un hepatocito humano primario, una célula endotelial sinusoidal hepática primaria y un mioblasto de músculo esquelético primario.

En algunas realizaciones, el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 5% para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero en la célula. En algunas realizaciones, el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 10% para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero en la célula.

Otros aspectos de la divulgación se refieren a una composición que comprende un AAV según se describe en la presente, en donde la composición es una formulación farmacéuticamente aceptable. La formulación puede estar

constituida para la administración a un mamífero. La formulación puede estar constituida para la administración a un mamífero a través de inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, transferencia de células autólogas o transferencia de células alogeneicas. La formulación farmacéuticamente aceptable puede comprender un excipiente. El excipiente se puede seleccionar de un portador, un adyuvante y un vehículo, o sus combinaciones.

Se describe adicionalmente en la presente un sistema de empaquetamiento para la preparación recombinante de un virus adenoasociado (AAV), en donde el sistema de empaquetamiento comprende una secuencia nucleotídica de Rep que codifica una o más proteínas Rep de AAV; una secuencia nucleotídica de Cap que codifica una o más proteínas Cap de AAV de una cápside del clado F de AAV; y un genoma de corrección según se describe en la presente; en donde el sistema de empaquetamiento es operativo en una célula para encerrar el genoma de corrección en la cápside para formar el virus adenoasociado. El sistema de empaquetamiento puede comprender un primer vector que comprende la secuencia nucleotídica de Rep y la secuencia nucleotídica de Cap, y un segundo vector que comprende el genoma de corrección. La cápside del clado F de AAV puede comprender al menos una proteína seleccionada de VP1 del clado F, VP2 del clado F y VP3 del clado F. La cápside del clado F de AAV puede comprender al menos dos proteínas seleccionadas de VP1 del clado F, VP2 del clado F y VP3 del clado F. La cápside del clado F de AAV puede comprender proteínas VP1 del clado F, VP2 del clado F y VP3 del clado F. La cápside del clado F de AAV puede ser cualquier cápside del clado F de AAV según se describe en la presente. La secuencia nucleotídica de Rep puede codificar una proteína Rep de AAV2. La proteína Rep de AAV2 codificada puede ser al menos una de Rep 78/68 o Rep 68/52. La secuencia nucleotídica que codifica la proteína Rep de AAV2 puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene un porcentaje de identidad de secuencia mínimo con la secuencia nucleotídica de Rep de AAV2 de SEQ ID NO:40, en donde el porcentaje de identidad de secuencia mínimo es al menos 70% a lo largo de la longitud de la secuencia nucleotídica que codifica la proteína Rep de AAV2. En uno cualquiera de los sistemas de empaquetamiento descritos, el sistema de empaquetamiento puede comprender además un tercer vector, en donde el tercer vector es un vector de virus cooperador. El vector de virus cooperador puede ser un tercer vector independiente. El vector de virus cooperador puede ser integral con el primer vector. El vector de virus cooperador puede ser integral con el segundo vector. El tercer vector puede comprender genes que codifican proteínas del virus cooperador. El virus cooperador se puede seleccionar del grupo que consiste en adenovirus, herpesvirus (incluyendo virus del herpes simple (HSV)), virus vacunal y citomegalovirus (CMV). El virus cooperador puede ser adenovirus. El genoma del adenovirus puede comprender uno o más genes de ARN adenoviral seleccionados del grupo que consiste en E1, E2, E4 y VA. El virus cooperador puede ser HSV. El genoma del HSV puede comprender uno o más de genes de HSV seleccionados del grupo que consiste en UL5/8/52, ICPO, ICP4, ICP22 y UL30/UL42. El primer vector y el tercer vector pueden estar contenidos dentro de un primer plásmido de transfección. Los nucleótidos del segundo vector y el tercer vector pueden estar contenidos dentro de un segundo plásmido de transfección. Los nucleótidos del primer vector y el tercer vector pueden estar clonados en un virus cooperador recombinante. Los nucleótidos del segundo vector y el tercer vector pueden estar clonados en un virus cooperador recombinante. La cápside del AAV puede ser la cápside de un AAV del clado F seleccionado del grupo que consiste en AAV9, AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, AAVF17, AAVHU31 y AAVHU32. Cualquiera de los sistemas de empaquetamiento descritos en la presente pueden estar comprendidos dentro de un estuche.

También se describe en la presente un método para la preparación recombinante de un virus adenoasociado (AAV), en donde el método comprende transfectar o transducir una célula con un sistema de empaquetamiento según se describe en la presente bajo condiciones operativas para encerrar el genoma de corrección en la cápside para formar el AAV.

Según se menciona anteriormente, la divulgación proporciona un método *ex vivo* para editar un locus diana de un cromosoma de mamífero, en donde el método comprende transducir una célula de mamífero que comprende el cromosoma de mamífero con un virus adenoasociado (AAV) según se describe en la presente. En algunas realizaciones, la célula es una célula madre de mamífero. En algunas realizaciones, la célula de mamífero procede de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido conectivo (incluyendo sangre), tejido muscular, tejido nervioso y tejido epitelial. En algunas realizaciones, la célula de mamífero procede de un órgano seleccionado del grupo que consiste en pulmón, corazón, hígado, riñón, músculo, cerebro, ojo, mama, hueso y cartílago. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula madre. En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre hematopoyética, una célula madre de sangre del cordón umbilical o una célula madre de sangre periférica. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es un mioblasto, una célula endotelial, una célula hepática, un fibroblasto, una célula mamaria, un linfocito o una célula retiniana. Otros aspectos de la divulgación se refieren a una célula obtenible mediante cualquier método descrito en la presente.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para editar un locus diana de un genoma de mamífero, en donde el método comprende: (a) obtener células de mamífero de un mamífero; (b) cultivar las células de mamífero *ex vivo* para formar un cultivo *ex vivo*; (c) transducir las células de mamífero con un virus adenoasociado (AAV) según se describe en la presente en el cultivo *ex vivo* para formar células de mamífero transducidas; y (d) administrar las células de mamífero transducidas al mamífero.

En otros aspectos, la divulgación se refiere a un método para editar un locus diana de un genoma de mamífero, en donde el método comprende: (a) obtener células de mamífero de un primer mamífero; (b) cultivar las células de

mamífero *ex vivo* para formar un cultivo *ex vivo*; (c) transducir las células de mamífero con un virus adenoasociado (AAV) según se describe en la presente en el cultivo *ex vivo* para formar células de mamífero transducidas; y (d) administrar las células de mamífero transducidas a un segundo mamífero. El primer mamífero y el segundo mamífero pueden ser la misma especie. En algunas realizaciones, las células de mamífero proceden de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido conectivo (incluyendo sangre), tejido muscular, tejido nervioso y tejido epitelial. En algunas realizaciones, las células de mamífero proceden de un órgano seleccionado del grupo que consiste en pulmón, corazón, hígado, riñón, músculo, cerebro, ojo, mama, hueso y cartílago. En algunas realizaciones, las células de mamífero son células madre. En algunas realizaciones, las células madre son células madre hematopoyéticas, células madre de sangre del cordón umbilical o células madre de sangre periférica. En algunas realizaciones, las células de mamífero son células CD34+. En algunas realizaciones, las células de mamífero son mioblastos, células endoteliales, células hepáticas, fibroblastos, células mamarias, linfocitos o células retinianas.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para editar un locus diana de un genoma de mamífero, en donde el método comprende administrar un AAV según se describe en la presente o una composición según se describe en la presente a un mamífero en una cantidad eficaz para transducir células del mamífero con el AAV *in vivo*.

En uno cualquiera de los métodos proporcionados, el AAV se transduce o se administra sin cotransducción o coadministración de una nucleasa exógena o una secuencia nucleotídica que codifica una nucleasa exógena.

En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 1% para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, la eficacia de integración cromosómica del AAV es al menos aproximadamente 2%, 3%, 4% o 5% para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el elemento de edición del genoma de corrección está integrado en el locus diana del cromosoma de mamífero con una eficacia de integración cromosómica de al menos 10%, 20%, 40% o 50% de las células de mamífero. En algunas realizaciones, el elemento de edición del genoma de corrección está integrado en el locus diana del cromosoma de mamífero con una eficacia de integración cromosómica que varía de 10% a 70%, de 20% a 70%, de 40% a 70% o de 50% a 70% de las células de mamífero.

En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos proporcionados, el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica caracterizada adicionalmente por una frecuencia alélica en una población de células de al menos aproximadamente 10% para el alelo que comprende el elemento de edición integrado en el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica caracterizada adicionalmente por una frecuencia alélica en una población de células de al menos aproximadamente 50% para el alelo que comprende el elemento de edición integrado en el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica caracterizada adicionalmente por una frecuencia alélica en una población de células de al menos aproximadamente 75% para el alelo que comprende el elemento de edición integrado en el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, la frecuencia alélica en una población de células es una frecuencia alélica en una población de células *in vitro*.

También se describe en la presente un método para generar un animal no humano transgénico, comprendiendo el método administrar un AAV según se describe en la presente o una composición según se describe en la presente a un animal no humano; o transducir una célula de animal no humano con el AAV según se describe en la presente o la composición según se describe en la presente e implantar la célula en un animal no humano hospedador bajo condiciones suficientes para generar un animal no humano transgénico a partir del animal no humano hospedador (p. ej., al permitir que la célula implantada forme o se convierta en parte de un embrión, que a continuación se desarrolla en el hospedador como un animal no humano transgénico). El animal no humano transgénico se puede cruzar con otro animal no humano para generar animales no humanos transgénicos adicionales. La célula del animal no humano se puede derivar de un cigoto o un embrión de un animal no humano. El animal no humano puede ser un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, un bóvido, una oveja, una cabra, un pollo, un gato, un perro, un hurón o un primate.

Se describe en la presente adicionalmente un animal no humano transgénico obtenible mediante un método descrito en la presente, tal como un método descrito anteriormente. El animal no humano transgénico puede ser un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, un bóvido, una oveja, una cabra, un pollo, un gato, un perro, un hurón o un primate.

También se describe en la presente un tejido derivado de un animal no humano transgénico según se describe en la presente. El tejido se puede seleccionar del grupo que consiste en tejido conectivo (incluyendo sangre), tejido muscular, tejido nervioso, tejido endotelial y tejido epitelial. El tejido puede proceder de un órgano seleccionado del grupo que consiste en pulmón, corazón, hígado, riñón, músculo, cerebro, ojo, mama, hueso y cartílago.

Se describe adicionalmente en la presente una célula derivada de un animal no humano transgénico según se describe en la presente. La célula puede ser una célula primaria. La célula puede ser una célula CD34+, un mioblasto, una célula endotelial, una célula hepática, un fibroblasto, una célula mamaria, un linfocito o una célula retiniana. La célula puede ser una célula madre pluripotente inducible (iPS). La célula puede proceder de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido conectivo (incluyendo sangre), tejido muscular, tejido nervioso, tejido endotelial y tejido epitelial. La célula puede proceder de un órgano seleccionado del grupo que consiste en pulmón, corazón, hígado, riñón,

músculo, cerebro, ojo, mama, hueso y cartílago. La célula puede ser una célula madre. La célula madre puede ser una célula madre hematopoyética, una célula madre de sangre del cordón umbilical o una célula madre de sangre periférica.

Se describen vectores del clado F de virus adenoasociado (AAV) (p. ej., AAVs con replicación defectuosa que comprenden genomas de corrección encerrados en una cápside del clado F) o variantes de vectores de AAV (p. ej., AAVs con replicación defectuosa que comprenden variantes de la cápside con relación a cápsides de AAV9) para editar el genoma de una célula. Un vector del clado F de AAV o una variante del vector de AAV pueden comprender una o más cápsides del clado F o una o más variantes de la cápside (con relación a una cápside de AAV9), un elemento de edición (también denominado en la presente casete de direccionamiento) que comprende una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas que se van a integrar en un locus diana (también denominado en la presente un sitio diana) del genoma, una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana) y una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana). El elemento de edición (casete de direccionamiento) puede estar contenido dentro de un genoma de corrección según se describe en la presente que comprende repeticiones terminales invertidas (ITRs) según se describen en la presente. Las una o más cápsides del clado F o variantes de la cápside pueden ser cualquiera de las cápsides o variantes de la cápside del clado F descritas en la presente. Las una o más cápsides del clado F o variantes de la cápside pueden comprender una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), sus variantes, fragmentos, mutantes y cualquiera de sus combinaciones. Las una o más cápsides del clado F o las una o más variantes de la cápside pueden comprender una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), AAVF9 (SEQ ID NO: 10), AAVF16 (SEQ ID NO: 17), sus variantes, fragmentos, mutantes y cualquiera de sus combinaciones. Las una o más cápsides del clado F o variantes de la cápside pueden comprender una secuencia polipeptídica que tiene un porcentaje de identidad de secuencia de al menos 95% con una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), sus variantes, fragmentos, mutantes y cualquiera de sus combinaciones. Las una o más cápsides del clado F o variantes de la cápside pueden comprender una secuencia polipeptídica que tiene un porcentaje de identidad de secuencia de al menos 95% con una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), AAVF9 (SEQ ID NO: 10), AAVF16 (SEQ ID NO: 17), sus variantes, fragmentos, mutantes y cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un sitio de "puerto seguro". En ciertas realizaciones, el sitio de "puerto seguro" puede ser un locus de AAVS1 en el cromosoma 19. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un locus asociado con un estado patológico según se describe en la presente. En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula madre. En ciertas realizaciones, la célula madre puede ser una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre embrionaria no humana o una célula madre mesenquimal.

Según ciertas realizaciones, se proporcionan métodos *ex vivo* para editar el genoma de una célula según se define mediante las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, los métodos para editar el genoma de una célula pueden comprender transducir la célula con uno o más vectores del clado F de AAV (p. ej., AAVs con replicación defectuosa que comprenden genomas de corrección encerrados en una cápside del clado F) según se describe en la presente. La transducción se realiza sin nucleasas exógenas adicionales. Los vectores del clado F de AAV comprenden una o más cápsides del clado F según se definen en las reivindicaciones, un elemento de edición (casete de direccionamiento) que comprende una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas que se van a integrar en un locus diana (sitio diana) del genoma, una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana), y una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana). El elemento de edición (casete de direccionamiento) puede estar contenido dentro de un genoma de corrección según se describe en la presente que comprende ITRs según se describen en la presente. En ciertas realizaciones, las cápsides del clado F pueden comprender una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF17 (SEQ ID NO: 13). En ciertas realizaciones, las cápsides del clado F pueden comprender una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), AAVF9 (SEQ ID NO: 10), AAVF16 (SEQ ID NO: 17). En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV no contiene un promotor para las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un sitio de "puerto seguro". En ciertas realizaciones, el sitio de "puerto seguro" puede ser el locus AAVS1 en el cromosoma 19. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un locus asociado con un estado patológico según se describe en la presente. En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula madre. En ciertas realizaciones, la célula madre puede ser una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre embrionaria no humana o una célula madre mesenquimal.

También se proporciona en la presente un AAV con replicación defectuosa para el uso en métodos para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto al editar un genoma de una célula del sujeto. Adicionalmente, se describen

métodos para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto al editar un genoma de una célula del sujeto, incluyendo las etapas de transducir la célula del sujeto con un vector del clado F de AAV o una variante del vector de AAV según se describe en la presente y trasplantar la célula transducida al sujeto, en donde la célula transducida trata la enfermedad o el trastorno. La transducción de la célula se realiza sin nucleasas exógenas adicionales. En ciertas realizaciones, los vectores del clado F de AAV pueden comprender una o más cápsides del clado F según se definen en las reivindicaciones, un elemento de edición (casete de direccionamiento) que comprende una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas que se van a integrar en un locus diana (sitio diana) del genoma, una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana), y una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana). El elemento de edición (casete de direccionamiento) puede estar contenido dentro de un genoma de corrección según se describe en la presente que comprende ITRs según se describen en la presente. En ciertas realizaciones, las cápsides del clado F pueden comprender una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF17 (SEQ ID NO: 13). En ciertas realizaciones, las una o más cápsides del clado F pueden comprender una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), AAVF9 (SEQ ID NO: 10), AAVF16 (SEQ ID NO: 17). En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV no contiene un promotor para las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un sitio de "puerto seguro". En ciertas realizaciones, el sitio de "puerto seguro" puede ser el locus AAVS1 en el cromosoma 19. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un locus asociado con un estado patológico según se describe en la presente. En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula madre. En ciertas realizaciones, la célula madre puede ser una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre embrionaria no humana o una célula madre mesenquimal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o el trastorno pueden estar provocados por una o más mutaciones en el genoma celular. En ciertas realizaciones, la enfermedad o el trastorno se pueden seleccionar de una enfermedad metabólica hereditaria, una enfermedad del almacenamiento lisosómico, mucopolisacaridodosis, una enfermedad de inmunodeficiencia y enfermedad e infección hemoglobinopáticas.

También se divulga en la presente un AAV con replicación defectuosa para el uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto mediante edición genómica *in vivo* al administrar directamente el vector del clado F de AAV al sujeto según las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV puede comprender una o más cápsides del clado F según se definen mediante las reivindicaciones, un elemento de edición (casete de direccionamiento) que comprende una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas que se van a integrar en un locus diana (sitio diana) del genoma, una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana), y una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana), en donde el vector transduce una célula del sujeto e integra las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas en el genoma de la célula. El elemento de edición (casete de direccionamiento) puede estar contenido dentro de un genoma de corrección según se describe en la presente que comprende ITRs según se describen en la presente. En ciertas realizaciones, las una o más cápsides del clado F pueden comprender una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF1 (SEQ ID NO: 2), AAVF2 (SEQ ID NO: 3), AAVF11 (SEQ ID NO: 4), AAVF3 (SEQ ID NO: 5), AAVF4 (SEQ ID NO: 6), AAVF6 (SEQ ID NO: 7), AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF8 (SEQ ID NO: 9), AAVF9 (SEQ ID NO: 10), AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), AAVF13 (SEQ ID NO: 14), AAVF14 (SEQ ID NO: 15), AAVF15 (SEQ ID NO: 16) y AAVF16 (SEQ ID NO: 17). En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV no contiene un promotor para las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un sitio de "puerto seguro". En ciertas realizaciones, el sitio de "puerto seguro" puede ser el locus AAVS1 en el cromosoma 19. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un locus asociado a un estado patológico según se describe en la presente. En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula madre. En ciertas realizaciones, la célula madre puede ser una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre embrionaria no humana o una célula madre mesenquimal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o el trastorno pueden estar provocados por una o más mutaciones en el genoma de la célula. En ciertas realizaciones, la enfermedad o el trastorno se pueden seleccionar de una enfermedad metabólica hereditaria, una enfermedad del almacenamiento lisosómico, mucopolisacaridodosis, una enfermedad de inmunodeficiencia y una enfermedad y una infección hemoglobinopáticas. También se describen en la presente estuches que comprenden uno o más vectores del clado F de AAV o variantes del vector de AAV para editar el genoma de una célula.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Esta solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. Copias de esta solicitud con el dibujo o los dibujos a color serán proporcionadas por la Oficina a petición y previo pago de las tasas necesarias.

La Figura 1 muestra el alineamiento de secuencias polipeptídicas de variantes de la cápside de AAV del clado F en comparación con AAV9. Un alineamiento correspondiente de secuencias polinucleotídicas de variantes de la cápside de AAV del clado F se proporciona en la Figura 1 de la Publicación de Patente de EE. UU. Número US20130096182A1.

La Figura 2 es un diagrama que lista algunas de las mutaciones nucleotídicas en la cápside de cada secuencia, incluyendo el cambio de bases, el cambio de aminoácidos y si es VP1 o VP3.

La Figura 3 muestra un esquema de una porción de un conjunto de vectores ITR-AAVS 1-FP donantes que se usaban para la edición genómica. El vector de AAV contenía ramas de homología 5' y homología 3', y elementos reguladores, que incluían una secuencia 2A, una secuencia aceptora de empalme y una secuencia de poliadenilación. Se usó como el transgén proteína fluorescente amarilla ("YFP" o "FP"). ITRs de AAV2 flanqueaban las ramas homólogas y el genoma del vector se empaquetó en cápsides de AAVF para formar los vectores donantes AAVF-AAVS 1-FP. De forma importante, el vector que contiene el gen FP no contiene un promotor para conducir la expresión. El gen FP solo se expresará si se integra correctamente en AAVS1, aguas abajo de un promotor cromosómico endógeno.

La Figura 4 muestra un mapa esquemático del locus AAVS1 cromosómico diana y el locus AAVS1 editado que era el sitio diana para la integración del transgén mediada por el vector de AAVF. El esquema superior (Figura 4A), "locus AAVS1 silvestre", ilustra el locus AAVS1 silvestre que contiene una rama de homología 5' y una rama de homología 3', pero no contiene un transgén. La amplificación con cebadores situados fuera de la región de homología usando un cebador de "región cebadora directa FUERA" y un cebador de "región cebadora inversa FUERA" da como resultado un fragmento de ~1,9 kb de longitud (véase la línea marcada "Fragmento 1"), que indica que el fragmento no contiene un transgén integrado. El esquema inferior (Figura 4B), "locus AAVS1 editado", ilustra el locus AAVS1 editado que contiene una rama de homología 5', elementos reguladores, un transgén integrado y la rama de homología 3'. La amplificación con cebadores situados fuera de la región de homología usando un cebador de "región cebadora directa FUERA" y un cebador de "región cebadora inversa FUERA" da como resultado un fragmento de -3,0 kb de longitud (véase la línea marcada "Fragmento 2"), que indica que el fragmento contiene un transgén. La amplificación de la región de conexión 5' (la conexión entre la rama de homología 5' y el transgén) usando un cebador de "región cebadora directa FUERA" y un cebador de "región cebadora inversa FUERA" da como resultado un fragmento de ~1,7 kb de longitud (véase la línea marcada "Fragmento 3"). La amplificación de la región de conexión 3' (la conexión entre el transgén y la rama de homología 3') usando un cebador de "región cebadora directa FUERA" y un cebador de "región cebadora inversa FUERA" da como resultado un fragmento de ~1,2 kb de longitud (véase la línea marcada "Fragmento 4"). Si el transgén no está integrado, no hay producto resultante tras la amplificación de la región de conexión 5' o la región de conexión 3'.

La Figura 5 muestra gráficas de dispersión representativas procedentes de análisis citométricos de flujo de la expresión de YFP en células K562 24 horas después de la transducción. Las células se transdujeron con el vector AAVF7 FP a una variedad de multiplicidades de infección (MOIs) (A) Las células no se transducían con ningún vector (no transducidas), (B) MOI 50.000, (C) MOI 100.000, (D) MOI 200.000 y (E) MOI 400.000. Los datos mostrados son de muestras representativas. Los episodios por encima de la línea de demarcación dentro de cada gráfica de dispersión representan células que expresan FP, indicando que, en estas células, el gen FP sin promotor procedente del vector ITR-AAVS 1-FP donante se integraba correctamente en AAVS1 en el cromosoma 19 humano, aguas abajo del promotor cromosómico endógeno.

La Figura 6 muestra gráficas de dispersión representativas procedentes de análisis citométricos de flujo de la expresión de YFP en células K562 72 horas después de la transducción. Las células se transdujeron con el vector AAVF7 FP a una variedad de multiplicidades de infección (MOIs) (A) Las células no se transducían con ningún vector (no transducidas), (B) MOI 50.000, (C) MOI 100.000, (D) MOI 200.000 y (E) MOI 400.000. Los episodios por encima de la línea de demarcación representan células con integración dirigida correctamente del gen FP sin promotor en el vector ITR-AAVS 1-FP donante.

La Figura 7 muestra el porcentaje medio de expresión de YFP después de la integración dirigida del transgén YFP sin promotor en el locus AAVS1 en células leucémicas K562 CD34+. (A) Un gráfico de barras que muestra la expresión de YFP 24 horas después de la transducción con vector AAVF7 en las células con MOIs de 50.000, 100.000, 150.000, 200.000, 300.000 y 400.000. (B) Un gráfico de barras que muestra la expresión de YFP 72 horas después de la transducción con vector AAVF7 en células con MOIs de 50.000, 100.000, 150.000, 200.000 y 400.000. Cada barra representa datos recopilados de hasta 7 muestras.

La Figura 8 muestra la confirmación por PCR de la integración dirigida del transgén YFP en el locus AAVS1 en células K562. A) Gel que muestra ADN amplificado procedente de muestras representativas de células K562 sin plantilla, no transducidas o transducidas con vector AAVF7 FP a una MOI de 100.000. Carril 1: escalera de ADN, carril 2: sin control de plantilla, carril 3: control no transducido y carril 4: K562 transducidas con AAVF7 FP. Las flechas apuntan bien al fragmento de -3,1 kb de AAVS1 integrado en FP o bien al fragmento de ~1,9 kb de AAVS1 no integrado. B) Gel que muestra ADN amplificado procedente de muestras representativas de células K562 sin plantilla, no transducidas o transducidas con vector AAVF7 FP con una MOI de 100.000. Carril 1: escalera de ADN, carril 2: sin control de plantilla, carril 3: control no transducido, carril 4: K562 transducidas con vector AAVF7 FP. Las flechas apuntan bien al fragmento de -3,1 kb de AAVS1 integrado en FP o bien al fragmento de ~1,9 kb de AAVS1 no integrado

La Figura 9 muestra gráficas de dispersión representativas de la expresión de YFP en células CD34+ primarias después de la integración dirigida 1 día después de la transducción con vectores AAVF FP. (A) Células no transducidas con ningún vector (no transducidas), (B) células transducidas con vector AAVF7 FP, y (C) células transducidas con vector AAVF17 FP. Las células transducidas con vector bien AAVF7 o bien AAVF17 mostraban una cantidad significativa de expresión de YFP en comparación con las células no transducidas (compárense B y C, respectivamente, con A). La expresión de YFP en (B) y (C) indica que el gen FP sin promotor aportado por el vector de AAVF se integraba exactamente en el locus AAVS1 cromosómico.

La Figura 10 muestra gráficas de dispersión representativas de la expresión de YFP en células CD34+ primarias después de la integración dirigida 4 días después de la transducción con vectores AAVF FP. (A) Células no transducidas con ningún vector (no transducidas), (B) células transducidas con vector AAVF7 FP, y (C) células transducidas con vector AAVF17 FP. Las células transducidas con vector bien AAVF7 o bien AAVF17 mostraban una cantidad significativa de expresión de YFP en comparación con las células no transducidas (compárense B y C, respectivamente, con A), indicando una integración dirigida exacta del gen aportado por el vector de AAVF.

La Figura 11 muestra gráficas de dispersión representativas de la expresión de YFP en células CD34+ primarias después de la integración dirigida 18 días después de la transducción con vectores AAVF FP a partir de muestras representativas. (A) Células no transducidas con ningún vector (no transducidas), (B) células transducidas con vector AAVF7 FP, y (C) células transducidas con vector AAVF17 FP. Las células transducidas con vector bien AAVF7 o bien AAVF17 mostraban una cantidad significativa de expresión de YFP en comparación con las células no transducidas (compárense B y C, respectivamente, con A).

La Figura 12 muestra la expresión de YFP en células CD34+ primarias después de la integración dirigida. (A) Una tabla que muestra el porcentaje de células positivas a YFP para células no transducidas y células transducidas bien con vector AAVF7 FP o bien con vector AAVF17 FP a los 4, 18, 20 y 39 días después de la transducción. (B) Un gráfico de líneas que muestran la frecuencia de células primarias CD34+ que expresan YFP a los 4, 18, 20 y 39 días después de la transducción de AAVF FP con una MOI de 100.000. La línea con diamantes representa células no transducidas, la línea con cuadrados representa células transducidas con vector AAVF7 FP y la línea con triángulos representa células transducidas con vector AAVF17 FP.

La Figura 13 muestra la confirmación por PCR de la integración dirigida en el locus AAVS 1 en células CD34+ primarias. Un gel que muestra ADN amplificado procedente de muestras representativas de células CD34+ primarias sin plantilla, no transducidas o transducidas con vector AAVF7 FP con una MOI de 150.000. Carril 1: escalera de ADN, carril 2: sin control de plantilla, carril 3: control no transducido, carril 4: marcador de ADN, y carril 5: transducidas con vector AAVF7 FP. Las flechas apuntan al AAVS1 (fragmento de ~1,7 kb) integrado en FP que muestra el producto de amplificación de la región de conexión 5'. El recuadro de la izquierda muestra la escalera de ADN que se cargaba en el carril 1.

La Figura 14 muestra la confirmación de secuencia de la integración dirigida de secuencias del gen YFP en el locus AAVS 1 empezando en la región cebadora directa FUERA. Los resultados de la secuenciación indican que el gen YFP estaba presente y estaba integrado correctamente en el locus AAVS1.

La Figura 15 muestra la confirmación de secuencia de la integración dirigida de secuencias de YFP en el locus AAVS1 empezando cerca de la rama de homología 5'. Los resultados de la secuenciación indican que el gen YFP estaba presente y estaba integrado en el locus AAVS1

La Figura 16 muestra la confirmación de secuencia de la integración dirigida de secuencias de YFP en el locus AAVS1 empezando cerca de la región 5' de los elementos reguladores. Los resultados de la secuenciación indican que el gen YFP estaba presente y estaba integrado en el locus AAVS1.

La Figura 17 muestra la confirmación de secuencia de la integración dirigida de secuencias de YFP en el locus AAVS1 empezando cerca de la región 3' de los elementos reguladores. Los resultados de la secuenciación indican que el gen YFP estaba presente y estaba integrado en el locus AAVS1.

La Figura 18 muestra la confirmación de secuencia de la integración dirigida de secuencias de YFP en el locus AAVS1 empezando cerca de la región 5' del transgén. Los resultados de la secuenciación indican que el gen YFP estaba presente y estaba integrado en el locus AAVS1.

La Figura 19 muestra la confirmación de secuencia de la integración dirigida de secuencias de YFP en el locus AAVS1 empezando cerca de la región "cebadora inversa DENTRO". Los resultados de la secuenciación indican que el gen YFP estaba presente y estaba integrado en el locus AAVS1.

La Figura 20 muestra un esquema de las etapas realizadas en los experimentos del Ejemplo 4. Se obtuvo un millón de células CD34+ de sangre del cordón umbilical humano (véase la Etapa 1) y se inyectaron en ratones adultos NOD/SCID inmunodeficientes irradiados subletalmente (véase la Etapa 2). Dos horas después de la inyección con células CD34+, se inyectó a los ratones vector de AAVF-luciferasa (es decir, vector de AAVF7-luciferasa o vector de AAVF17-luciferasa). De dos a siete días más tarde, se les inyectaron a los ratones vectores AAVF-Venus (es decir,

vector AAVF7-Venus o vectores AAVF17-Venus) (véase la Etapa 3). Finalmente, se midió la expresión de luciferasa *in vivo* 4 semanas después de la inyección y la expresión de Venus se cuantificó 6 semanas después de la inyección (véase la Etapa 4).

La Figura 21 muestra la expresión de luciferasa *in vivo* en receptores representativos. La Figura 21A muestra que ratones adultos inmunodeficientes previamente xenoinjertados con HSCs CD34+ de sangre de cordón umbilical humano que recibían inyecciones intravenosas de vector de AAVF-luciferasa exhibían expresión de luciferasa específica en vertebras, bazo, caderas y huesos largos, todas zonas de hematopoyesis después del trasplante. Las flechas indican expresión de luciferasa en vertebras, bazo, hígado, caderas y huesos largos. El flujo para el hígado y el bazo era 4,08e9 y el flujo para la cola era 1,74e9. La Figura 21B muestra que ratones adultos inmunodeficientes que no se xenoinjertaban previamente con HSCs CD34+ de sangre de cordón umbilical humano que recibían inyecciones intravenosas de vector de AAVF-luciferasa no exhibían altos niveles de expresión de luciferasa específica. El flujo para el hígado y el bazo era 1,47e8 y el flujo para la cola era 2,22e8.

La Figura 22 muestra histogramas que ilustran datos de citometría de flujo procedentes de células CD34+ o CD45+ humanas que expresan Venus en ratones adultos inmunodeficientes previamente xenoinjertados con HSCs CD34+ de sangre de cordón umbilical humano que recibían inyecciones intravenosas de vectores bien AAVF7-Venus o bien AAVF17-Venus. La Figura 22A muestra datos de citometría de flujo procedentes de células CD34+ femorales de ratones xenoinjertados inyectados con el vector AAVF7-Venus vector. El 9,23% de las células hematopoyéticas humanas injertadas expresaban Venus. La Figura 22B muestra datos de citometría de flujo procedentes de células CD45+ femorales de ratones xenoinjertados inyectados con el vector AAVF7-Venus. El 8,35% de las células hematopoyéticas humanas injertadas expresaban Venus. La Figura 22C muestra datos de citometría de flujo procedentes de células CD34+ femorales de ratones xenoinjertados inyectados con el vector AAVF17-Venus. El 8,92% de las células hematopoyéticas humanas injertadas expresaban Venus. La Figura 22D muestra datos de citometría de flujo procedentes de células CD45+ femorales de ratones xenoinjertados inyectados con el vector AAVF17-Venus. El 8,59% de las células hematopoyéticas humanas injertadas expresaban Venus. La Figura 22E muestra datos de citometría de flujo procedentes de células CD45+ vertebrales de ratones xenoinjertados inyectados con el vector AAVF7-Venus. El 15,3% de las células hematopoyéticas humanas injertadas expresaban Venus. La Figura 22F muestra datos de citometría de flujo procedentes de células CD45+ vertebrales de ratones xenoinjertados inyectados con el vector AAVF17-Venus. El 70,2% de las células hematopoyéticas humanas injertadas expresaban Venus. La Figura 22G muestra datos de citometría de flujo procedentes de esplenocitos CD45+ de ratones xenoinjertados inyectados con el vector AAVF7-Venus. El 10,3% de las células hematopoyéticas humanas injertadas expresaban Venus. La Figura 22H muestra datos de citometría de flujo procedentes de esplenocitos CD45+ de ratones xenoinjertados inyectados con el vector AAVF17-Venus. El 9,90% de las células hematopoyéticas humanas injertadas expresaban Venus. Los resultados de la Figura 22 también se proporcionan en la Tabla 5.

La Figura 23 muestra un filograma de la relación de virus del clado F de AAV unos en relación a otros y a otras cepas de AAV. El filograma se basa en la homología de secuencias nucleotídicas de los genes de la cápside de virus de AAVF (Smith y cols, Mol Ther. 2014 Sep;22(9):1625-34).

La Figura 24 muestra un mapa de un genoma de vector de AAV monocatenario para la inserción de un inserto de ADN largo. El genoma de AAV2 monocatenario contenía ITRs de AAV2, ramas de homología, secuencias reguladoras y el marco de lectura abierto (ORF) de Venus sin promotor. Venus es una proteína indicadora fluorescente. La Venus sin promotor que contiene el ORF de Venus está aguas abajo de un aceptor de empalme y una secuencia 2A. El ORF de Venus está seguido por una señal de poliadenilación. Cada una de las ramas de homología tiene una longitud de 800 pb y se dirige al Intrón 1 del gen PPP1R12C en el Cromosoma 19

La Figura 25 muestra un esquema de un sitio de inserción de un resto de edición en AAVS1. El casete transgénico que consiste en el marco de lectura abierto de Venus y un sitio aceptor de empalme seguido por la secuencia 2A está flanqueado por ramas de homología. Las ramas de homología son complementarias al Intrón 1 del gen PPP1R12C humano dentro del locus AAVS1 en el cromosoma 19 y median en la inserción de Venus en el sitio entre las dos ramas de homología.

Las Figuras 26A-F muestran la inserción genómica dirigida de una secuencia codificante de proteína grande mediante vectores de AAVF recombinantes en líneas celulares y células primarias humanas que demuestra que la edición genómica mediada por AAVF es robusta y que hay una edición eficaz en células y líneas celulares CD34+ humanas. Figura 26A: CD34+ representa células madre de sangre periférica cebadas con citocina CD34+ humanas. Figura 26B: K562 es una línea celular de eritroleucemia CD34+ humana. Figura 26C: HepG2 es una línea celular hepática humana. El porcentaje de células que exhiben expresión de Venus, indicativo de una inserción precisa, se muestra para las Figuras 26A-C. La Figura 26D muestra perfiles de flujo representativos que muestran una población que expresa Venus distinta de células CD34+ después de la transducción con virus AAVF recombinantes, en comparación con células no transducidas. La Figura 26E muestra la actividad de edición de AAVF7, AAVF12, AAVF15, AAVF17 y AAV9 en comparación con AAV6 y AAV8 en una línea de eritroleucemia K562. La Figura 26F muestra la actividad de edición del mismo virus en HepG2, una línea celular hepática. Los datos muestran el porcentaje de células que exhiben edición y expresión de Venus.

La Figura 27 muestra un ensayo de integración dirigida para la detección de insertos grandes y pequeños en el locus AAVS1 en el cromosoma 19 humano. Los mapas esquemáticos muestran la localización de cebadores. El cebador 5' es complementario a secuencias cromosómicas. El cebador 3' es específico para el inserto. Se predice que el amplicón específico tiene 1,7 kb para el inserto grande y 1 kb para el inserto pequeño. El par de cebadores dividido (cromosómico y específico del inserto) conduce a especificidad para el ensayo de integración dirigida.

Las Figuras 28A-E muestran que los vectores de AAVF median en la sustitución de nucleótidos en sitios genómicos especificados. La Figura 28A muestra mapas de genomas de vectores de AAV monocatenarios para la inserción de un inserto de 10 pb en el intrón 1 del gen PPP1R12C humano. Este vector codifica una rama de homología izquierda silvestre (HA-L) que contiene un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Nhe1 (GCTAGC). El vector NS mut se diseño para cambiar la secuencia TA en la rama de homología izquierda en el cromosoma 19 por AT. Este cambio da como resultado la conversión de un sitio Nhe1 en un sitio Sph1, cambiando la secuencia de GCTAGC a GCATGC. La Figura 28B muestra que la rama de homología izquierda se amplificaba usando un cebador directo situado en secuencias cromosómicas aguas arriba y un cebador inverso situado en el inserto de 10 pb en el Intrón 1 del gen PPP1R12C en el cromosoma 19. El esquema superior indica los tamaños relativos de los fragmentos esperados creados cuando se edita ADN genómico procedente de células K562 usando los vectores de AAVF bien silvestre o bien NS Mut. La Figura 28C es un gel que muestra los amplicones reales derivados de ADN genómico de células K562 editadas con un vector de AAVF silvestre. Los carriles muestran el amplicón no cortado (Un), el amplicón cortado con la Nhe 1 (Nhe1) y con Sph 1 (Sph 1). La Figura 28D muestra la electroforesis en gel de ADN de K562 después de la edición con vectores AAVF7 o uno AAVF17 que codifican genomas bien silvestres o bien NS Mut. La Figura 28E muestra la electroforesis en gel de una línea celular de carcinoma hepatocelular, HepG2, después de la edición con vectores AAVF7 o uno AAVF17 que codifican genomas bien silvestres o bien NS Mut.

La Figura 29 muestra un análisis de secuencia de ADN procedente de células editadas con vectores silvestres o NS Mut de AAVF7 y AAVF17.

La Figura 30 es una tabla que muestra que vectores de AAVF median en la edición en células que se dividen y que no se dividen y que la edición génica mediada por AAVF no requiere la síntesis de ADN. La figura muestra la frecuencia de células editadas que expresan Venus en los subgrupos que se dividen y que no se dividen de células CD34+ humanas primarias. El porcentaje de todas las células CD34+ que eran positivas a Venus y bien positivas o bien negativas a BrdU se determinó mediante citometría de flujo. Las células positivas a BrdU representan células que se dividen y las células negativas a BrdU representan células que no se dividen.

Las Figuras 31A-C muestran una edición eficaz de células madre hematopoyéticas humanas injertadas *in vivo* mediante vectores de AAVF aportados sistémicamente. La Figura 31A muestra un diagrama del diseño experimental. Ratones NOD/SCID inmunodeficientes se injertaron con células madre hematopoyéticas CD34+ de sangre de cordón umbilical humano. Se dejó que las células se injertarán durante 7 semanas antes de la inyección intravenosa de AAVF17-Venus. Las células hematopoyéticas se recolectaron de la médula ósea vertebral y femoral y el bazo de ratones xenoinjertados 12,5 semanas después de la inyección de AAVF. Las células se analizaron mediante citometría de flujo multicromática con respecto a la expresión de Venus, así como la presencia de marcadores superficiales específicos de ser humano. Específicamente, la expresión de Venus se analizó en las células madre/progenitoras hematopoyéticas humanas CD34+ primitivas, células hematopoyéticas mononucleares diferenciadas humanas CD45+ y células glicoforina A+ del linaje eritroide. La Figura 31B muestra un esquema de la ruta de diferenciación del linaje eritroide humano, desde células progenitoras CD34+ hasta los glóbulos rojos glicoforina A+. La Figura 31C muestra perfiles de citometría de flujo de células humanas injertadas a largo plazo en las células de la médula ósea y el bazo de ratones xenoinjertados, 20 semanas después del trasplante. Las células se analizaron con respecto tanto a la expresión de Venus, un marcador de la edición, así como a marcadores de la superficie celular humanos específicos.

Las Figuras 32A y B son un sumario de datos *in vivo* después de la inyección intravenosa de vectores de AAVF en ratones inmunodeficientes xenoinjertados con células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+ de sangre de cordón umbilical humano. La expresión de Venus refleja la inserción dirigida del casete de Venus sin promotor en el Intrón 1 del gen PPP1R12C humano en células madre hematopoyéticas humanas injertadas *in vivo* y su descendencia. La Figura 32B es un sumario de los datos de la Figura 32A. Las Figuras 32A y B muestran que la edición es a largo plazo, que la edición se hereda establemente (el inserto se expresa eficazmente en células de la descendencia diferenciadas), que la edición *in vivo* puede ser mucho más eficaz que la transducción *ex vivo* seguida por trasplante y que la descendencia de células CD34+ editadas retiene la expresión de Venus a largo plazo.

La Figura 33 muestra un análisis de secuencia de la inserción cromosómica dirigida de un ORF de SA/2A sin promotor en una línea celular de eritroleucemia K562, células CD34+ de sangre periférica (PBSC) cebadas con citocina humanas primarias y la línea celular hepática humana HepG2. Secuencias integradas específicamente en un sitio se amplificaron usando un cebador específico del cromosoma y un cebador específico del inserto. El producto amplificado se clonó en un vector TOPO-TA y se secuenció usando secuenciación de Sanger.

La Figura 34 muestra un análisis de secuencia de la inserción cromosómica dirigida de un inserto de 10 pb en células CD34+ de sangre periférica cebadas con citocina humanas primarias y la línea celular hepática humana HepG2. Secuencias integradas específicamente en un sitio se amplificaron usando un cebador específico del cromosoma y un

cebador específico del inserto. El producto amplificado se clonó en un vector TOPO-TA y se secuenció usando secuenciación de Sanger.

La Figura 35 muestra que AAVF dirige la integración de insertos pequeños en AAVS1 – células CD34+.

La Figura 36 muestra el direccionamiento por AAV de Venus y RFLP sin promotor en una línea celular de HepG2 (hepatoma).

La Figura 37 muestra gráficos de citometría de flujo de médula ósea femoral representativos que muestran la población total clasificada, el retroacotamiento ("backgating") de células positivas a CD34 y glycoA sobre poblaciones positivas a Venus y negativas a Venus, células positivas a CD34/GlycoA en poblaciones negativas a Venus y poblaciones positivas a glycoA y positivas a CD34.

La Figura 38 muestra gráficos de citometría de flujo del bazo representativos que muestran la población total clasificada, el retroacotamiento de células positivas a CD34 y glycoA sobre poblaciones positivas a Venus y negativas a Venus, células positivas a CD34/GlycoA en poblaciones negativas a Venus y poblaciones positivas a glycoA y positivas a CD34.

La Figura 39 muestra mapas de genomas de los vectores CBA-mCherry y AAS 1-Venus usados para determinar la transducción relativa frente a las eficacias de edición de vectores de AAV.

Las Figuras 40A y 40B muestran perfiles de citometría de flujo de la expresión de mCherry (Figura 40A) y Venus (Figura 40B) en células de sangre del cordón umbilical CD34+ humanas. La Figura 40C muestra la cuantificación de la expresión de mCherry y Venus en células CD34+ 48 horas después de la transducción. La Figura 40D muestra una comparación de la expresión relativa de Venus con mCherry (relación de edición). Las barras indican la relación de la proporción de células que expresan Venus como una relación de las que expresan mCherry con la cápside correspondiente. La barra horizontal negra indica una relación de 1, que indicaría eficacias iguales de expresión de Venus:mCherry.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Ciertas realizaciones de la invención se describen con detalle, usando ejemplos, secuencias y dibujos específicos. Un experto en la técnica identificará muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, que se podrían usar en la práctica de la presente invención. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que normalmente es entendido por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

La invención se refiere a vectores del clado F de virus adenoasociados (AAV) (p. ej., AAVs con replicación defectuosa que comprenden genomas de corrección encerrados en una cápside del clado F) o variantes de vectores de AAV (p. ej., AAVs con replicación defectuosa que comprenden variantes de la cápside con relación a cápsides de AAV9) y sus métodos relacionados, según se definen en las reivindicaciones, que se desarrollaron para la edición precisa del genoma de una célula usando recombinación homóloga sin la necesidad de adición de nucleasas exógenas. En ciertas realizaciones, la edición genómica puede incluir, sin limitación, introducir inserciones, eliminaciones, mutaciones puntuales o cualquiera de sus combinaciones en la secuencia genómica de una célula (p. ej., un locus diana de un cromosoma de mamífero). En ciertas realizaciones, los vectores del clado F de AAV y sus métodos relacionados proporcionados en la presente se pueden usar para insertar una o más secuencias nucleotídicas en una localización específica de un genoma celular sin la necesidad de adición de nucleasas exógenas antes de la integración de las una o más secuencias nucleotídicas. En ciertas realizaciones, los vectores del clado F y sus métodos relacionados proporcionados en la presente se pueden usar para insertar un enlace internucleotídico en una localización específica de un genoma celular sin la necesidad de adición de nucleasas exógenas antes de la integración del enlace internucleotídico. También se describe un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto al editar *ex vivo* el genoma de una célula del sujeto a través de la transducción de la célula con un vector del clado F o una variante de vector de AAV según se describe en la presente y adicionalmente trasplantar la célula transducida en el sujeto para tratar la enfermedad o el trastorno del sujeto. También se proporciona en la presente un AAV con replicación defectuosa para el uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto mediante edición genómica *in vivo* al administrar directamente al sujeto el vector del clado F según las reivindicaciones. También se describen en la presente estuches para la edición genómica de una célula que comprenden uno o más de los vectores del clado F o las variantes de vectores de AAV descritos en la presente.

La recombinación homóloga usando diversos vectores de AAV (p. ej., AAV2, AAV6, y AAV8) se ha presentado previamente; sin embargo, las eficacias presentadas eran muy bajas – aproximadamente 1 en un millón de células. Según se muestra en los Ejemplos 1 y 2 posteriores, se usaron vectores del clado F de AAV (o variantes de vectores de AAV) para dirigir reproduciblemente la inserción génica a localizaciones cromosómicas especificadas a frecuencias significativamente mayores a las observadas previamente. Por ejemplo, la edición genómica dirigida se alcanzó al transducir células primarias con vectores del clado F de AAV (o variantes de vectores de AAV) dando como resultado

la inserción del transgén en el genoma de las células primarias a frecuencias sorprendentemente altas, exhibiendo aproximadamente 10% de las células primarias inserción del transgén seis semanas después de la transducción. Esta frecuencia es de 1.000 a 100.000 veces más eficaz que las presentadas previamente (véase, p. ej., Khan, 2011). Según se muestra en los Ejemplos 1 y 2 posteriores, se alcanzó una edición genómica de alto nivel usando células madre hematopoyéticas CD34+ humanas primarias (K562) y células madre hematopoyéticas humanas derivadas de sangre periférica primarias (PBSCs) CD34+. La inserción génica dirigida se observó en cultivos CD34+ tanto a corto plazo (un día) como a largo plazo (hasta casi seis meses) y se verificó mediante expresión transgénica y análisis de secuencia. Por otra parte, la recombinación dirigida por el vector del clado F o la variante del vector de AAV según se describe en la presente permite la manipulación genómica específica sin toxicidad asociada. Según se muestra en el Ejemplo 3 posterior, la inyección intravenosa de vectores de AAV pseudotipados con AAVF7 o AAVF17 daba como resultado la transducción de células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ humanas *in vivo*. Según se muestra en el Ejemplo 4 posterior, la edición genómica se alcanzó tanto en cultivo celular como *in vivo* para insertos tanto pequeños (~10 bps) como grandes (~800 bps) y se mostraba por secuenciación que estaba precisamente integrada en el locus diana. Según se muestra en el Ejemplo 5 posterior, se alcanzaba la edición genómica de diversas líneas celulares humanas (p. ej., fibroblastos, células de carcinoma hepatocelular, células de cáncer de mama, células de retinoblastoma, células de leucemia y células B), demostrando que los vectores del clado F se podían usar para editar genomas en varios tipos de células distintos, tales como fibroblastos, células hepáticas, células mamarias, células retinianas y células B. Como tal, esta técnica tiene un tremendo potencial para la edición genómica dirigida en células *ex vivo,* así como *in vivo* en órganos específicos.

Se proporcionan en la presente vectores del clado F según se definen por las reivindicaciones (p. ej., AAVs con replicación defectuosa que comprenden genomas de corrección encerrados en una cápside del clado F) para editar un genoma de una célula y sus métodos según se definen en las reivindicaciones (a través de recombinación, y sin el uso de nucleasas exógenas). En ciertas realizaciones, la edición genómica incluye la corrección o inserción de una o más mutaciones en el genoma, la eliminación de uno o más nucleótidos en el genoma, la alteración de secuencias genómicas que incluyen secuencias reguladoras, la inserción de uno o más nucleótidos que incluyen transgenes en sitios de “puerto seguro” u otras localizaciones específicas en el genoma, o cualquiera de sus combinaciones según se definen en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la edición genómica usando los vectores del clado F o y sus métodos según se describen en la presente pueden dar como resultado la inducción de alteraciones precisas de una o más secuencias genómicas sin insertar secuencias virales exógenas u otras huellas.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método *ex vivo* para editar un locus diana de un cromosoma de mamífero que implica un virus adenoasociado (AAV) de replicación defectuosa que comprende un genoma de corrección encerrado en una cápside según se describe en la presente, p. ej., una cápside del clado F de AAV. En algunas realizaciones, un "genoma de corrección" es una molécula de ácido nucleico según se define en las reivindicaciones, es decir que contiene un elemento de edición según se describe en la presente junto con un elemento o elementos adicionales (p. ej., una secuencia nucleotídica de una repetición terminal invertida 5’ (5' ITR), o uno de sus fragmentos, y una secuencia nucleotídica de una repetición terminal invertida 3’ (3' ITR), o uno de sus fragmentos) suficientes para la encapsidación dentro de una cápside según se describe en la presente. Se entiende que el término "genoma de corrección" no necesariamente requiere que un elemento de edición contenido dentro del genoma de corrección "corrija" un locus diana en un genoma, una vez integrado en el locus diana (p. ej., corrección del locus diana que contiene una mutación mediante sustitución con una secuencia silvestre). Según esto, en algunas realizaciones, un genoma de corrección puede contener un elemento de edición que puede comprender una secuencia nucleotídica que es aditiva al locus diana (p. ej., el locus diana es el extremo 3' de un primer marco de lectura abierto y el elemento de edición es un segundo marco de lectura abierto que, cuando está integrado en el locus diana, creará un gen que codifica una proteína de fusión).

En algunas realizaciones, el virus adenoasociado (AAV) de replicación defectuosa comprende un genoma de corrección, comprendiendo el genoma de corrección (a) un elemento de edición seleccionado de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en un locus diana de un cromosoma de mamífero, (b) una secuencia nucleotídica 5’ de la rama homóloga 5' del elemento de edición, que tiene homología con una región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana y (c) una secuencia nucleotídica 3’ de la rama homóloga 3’ del elemento de edición, que tiene homología con una región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana. En algunas realizaciones, el AAV con replicación defectuosa comprende un genoma de corrección, comprendiendo el genoma de corrección una secuencia nucleotídica de un elemento de edición para la integración en un locus diana de un cromosoma de mamífero, teniendo el genoma de corrección una ausencia esencial de un promotor ligado operativamente a la secuencia nucleotídica del elemento de edición. En algunas realizaciones, el AAV con replicación defectuosa comprende un genoma de corrección, comprendiendo el genoma de corrección un elemento de edición seleccionado de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en un locus diana de un cromosoma de mamífero en una célula; teniendo el AAV una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 1% (p. ej., al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80% o al menos aproximadamente 90%) para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero en la célula. En algunas realizaciones, el AAV con replicación defectuosa comprende un genoma de corrección, comprendiendo el genoma de corrección un elemento de edición

seleccionado de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en un locus diana de un cromosoma de mamífero en una célula; teniendo el AAV una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 1% (p. ej., al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90%) en ausencia de una nucleasa exógena para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero en la célula. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los genomas de corrección, el genoma de corrección tiene una ausencia esencial de un promotor ligado operativamente a la secuencia nucleotídica del elemento de edición. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los genomas de corrección, el genoma de corrección comprende además un promotor exógeno ligado operativamente al elemento de edición. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los AAVs con replicación defectuosa, el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 3%, al menos aproximadamente 4%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80% o al menos aproximadamente 90% para integrar un elemento de edición en un locus diana de un cromosoma de mamífero en una célula.

Otros aspectos de la divulgación se refieren a un vector de edición génica que comprende un virus adenoasociado (AAV) de replicación defectuosa que comprende un genoma de corrección encerrado en una cápside de AAV, el genoma de corrección según se describe en la presente (p. ej., que comprende un elemento de edición seleccionado de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en un locus diana de un cromosoma de célula de mamífero; una secuencia nucleotídica 5' de la rama homóloga 5' del elemento de edición que tiene homología con una región 5' del cromosoma con relación al locus diana; una secuencia nucleotídica 3' de la rama homóloga 3' del elemento de edición que tiene homología con una región 3' del cromosoma con relación al locus diana); en donde el AAV tiene una eficacia de integración cromosómica de al menos 10% (p. ej., al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90%) para integrar un elemento de edición según se describe en la presente en un locus diana según se describe en la presente. En algunas realizaciones, la eficacia de integración cromosómica es al menos 10% (p. ej., al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90%) para integrar un elemento de edición según se describe en la presente en un locus diana según se describe en la presente en ausencia de una nucleasa exógena.

Un genoma de corrección según se describe en la presente puede comprender una secuencia nucleotídica 5' de una repetición terminal invertida 5' (5' ITR) de la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5', y una secuencia nucleotídica 3' de una repetición terminal invertida 3' (3' ITR) de la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3'. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5' ITR y la secuencia nucleotídica de 3' ITR son sustancialmente idénticas (p. ej., al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% idénticas o 100% idénticas) a una 5'ITR del virus AAV2 y una 3' ITR del virus AAV2, respectivamente. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5' ITR tiene al menos 95% (p. ej., al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia con SEQ ID NO:36, y la secuencia nucleotídica de 3' ITR tiene al menos 95% (p. ej., al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia con SEQ ID NO:37. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5' ITR y la secuencia nucleotídica de 3' ITR son sustancialmente idénticas (p. ej., al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% idénticas o 100% idénticas) a una 5'ITR del virus AAV 5% y una 3' ITR del virus AAV5, respectivamente. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5' ITR tiene al menos 95% (p. ej., al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia con SEQ ID NO:38, y la secuencia nucleotídica de 3' ITR tiene al menos 95% (p. ej., al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia con SEQ ID NO:39. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de 5' ITR y la secuencia nucleotídica de 3' ITR son imágenes sustancialmente especulares entre sí (p. ej., son imágenes especulares entre sí excepto para las posiciones de los nucleótidos 1, 2, 3, 4 o 5 en la ITR 5' o 3').

5' ITR de AAV2 ejemplar (SEQ ID NO: 36) –

ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggc

ctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggttcct

3' ITR de AAV2 ejemplar (SEQ ID NO: 37) -

aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgc

ccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaa

5' ITR de AAV5 ejemplar (SEQ ID NO: 38) -

ctctcccccctgtcgcgttcgctcgctcgctggctcgtttgggggggtggcagctcaaagagctgccagacgacggccctctggccgt

cgccccccccaaacgagccagcgagcgagcgaacgcgacaggggggagagtgccacactctcaagcaagggggttttgta

3' ITR de AAV5 ejemplar (SEQ ID NO: 39) -

tacaaaacctccttgcttgagagtgtggcactctcccccctgtcgcgttcgctcgctcgctggctcgtttgggggggtggcagctcaaa

gagctgccagacgacggccctctggccgtcgccccccccaaacgagccagcgagcgagcgaacgcgacaggggggagag

En algunas realizaciones, un genoma de corrección según se describe en la presente tiene un tamaño de no más de 7 kb (kilobases), no más de 6 kb, no más de 5 kb, o no más de 4 kb. En algunas realizaciones, un genoma de corrección según se describe en la presente tiene entre 4 kb y 7 kb, 4 kb y 6 kb, 4 kb y 5 kb o 4,1 kb y 4,9 kb.

En ciertas realizaciones, los vectores del clado F de AAV para editar un genoma de una célula comprenden una o más cápsides del clado F según se definen en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, un vector donante se puede empaquetar en las cápsides del clado F descritas en la presente según un método de empaquetamiento de AAV estándar dando como resultado la formación del vector del clado F de AAV (véase, p. ej., Chatterjee, 1992). En ciertas realizaciones, las una o más cápsides del clado F según se definen en las reivindicaciones pueden influir en el tropismo del vector del clado F de AAV para una célula particular.

Según ciertas realizaciones, las una o más cápsides del clado F se derivan de AAV derivado de células madre humanas. Previamente, se ha mostrado que esas células madre CD34+ de sangre periférica cebadas con citocina procedentes de donantes sanos alojan secuencias de AAV naturales endógenas en su genoma (véase, p. ej., las Publicaciones de Patente de EE. UU. Número US20130096182A1 y US20110294218A1). La eficacia de las variantes de aislados de AAV (variante relativa a AAV9) se ha demostrado previamente, incluyendo la eficacia de nucleótidos y proteínas de la cápside individuales para el uso en la transducción celular (véanse, p. ej., las Publicaciones de Patente de EE. UU. Número US20130096182A1 y US20110294218A1).

Se aislaron y secuenciaron genes de variantes de la cápside de AAV de longitud completa (variante relativa a AAV9) procedentes de los donantes que alojan secuencias de AAV naturales endógenas en su genoma. Las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas de las variantes de la cápside se proporcionan en la Figura 1 y en la Publicación de Patente de EE. UU. Número US20130096182A1 y la Publicación de Patente de EE. UU. Nº US20110294218A1. Los vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV descritos en la presente pueden comprender una o más cápsides del clado F o variantes de la cápside que comprenden una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo de AAVF1 (SEQ ID NO: 20), AAVF2 (SEQ ID NO: 21), AAVF3 (SEQ ID NO: 22), AAVF4 (SEQ ID NO: 23), AAVF5 (SEQ ID NO: 25), AAVF11 (SEQ ID NO: 26), AAVF7 (SEQ ID NO: 27), AAVF8 (SEQ ID NO: 28), AAVF9 (SEQ ID NO: 29), AAVF12 (SEQ ID NO: 30), AAVF13 (SEQ ID NO: 31), AAVF14 (SEQ ID NO: 32), AAVF15 (SEQ ID NO: 33), AAVF16 (SEQ ID NO: 34), AAVF17 (SEQ ID NO: 35), sus variantes, fragmentos, mutantes y cualquiera de sus combinaciones. Los vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV pueden comprender una o más cápsides del clado F o variantes de la cápside que comprenden una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF1 (SEQ ID NO: 2), AAVF2 (SEQ ID NO: 3), AAVF11 (SEQ ID NO: 4), AAVF3 (SEQ ID NO: 5), AAVF4 (SEQ ID NO: 6), AAVF6 (SEQ ID NO: 7), AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF8 (SEQ ID NO: 9), AAVF9 (SEQ ID NO: 10), AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), AAVF13 (SEQ ID NO: 14), AAVF14 (SEQ ID NO: 15), AAVF15 (SEQ ID NO: 16), AAVF16 (SEQ ID NO: 17), sus variantes, fragmentos, mutantes y cualquiera de sus combinaciones (véase, p. ej., la Figura 1).

Las secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas de las cápsides del clado F o variantes de la cápside descritas en la presente pueden tener al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, más preferiblemente aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente aproximadamente 99% de identidad de secuencia con las secuencias mostradas en la presente memoria descriptiva. El porcentaje de identidad se puede calcular usando cualquiera de un número de programas o métodos de comparación de secuencias tales como the Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988), y programas que ejecutan algoritmos de comparación tales como GAP, BESTFIT, FASTA o TFASTA (de the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), o BLAST, disponible a través del cibersitio de the National Center for Biotechnology Information.

Las cápsides del clado F o secuencias de variantes de cápsides se pueden modificar en una o más posiciones en los genes cap V1 y/o V3, estos genes o porciones funcionales de los genes se pueden usar separadamente o conjuntamente en cualquiera de los vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV y métodos descritos en la presente. Los genes cap, V1, V2, y V3, se pueden sustituir de múltiples secuencias mutadas, y se usan típicamente de un modo colineal V1-V2-V3. Sin embargo, las secuencias pueden estar truncadas, tales como V1-V2-V3 o V1-V3 o V1-V1-V2-V3 parciales. Por ejemplo, una secuencia podría ser V1 de (AAVF8)-V2 de (AAVF4)-V3 de AAVF14. Preferiblemente, las cápsides del clado F o las variantes de cápside transducen las células diana a un nivel de o superior al de AAV2.

También se describen variantes de cápside que comprenden una combinación de una o más secuencias polinucleotídicas V1, V2, y V3 de variantes de cápside (p. ej., SEQ ID NOs: 20-35, variante relativa la la cápside de AAV9), la cápside de AAV9 (SEQ ID NO: 18), la cápside de AAV2 (SEQ ID NO: 19), sus variantes, fragmentos o mutantes. También se describen variantes de cápside que comprenden una combinación de una o más secuencias polinucleotídicas V1, V2, y V3 de variantes de cápside (SEQ ID NOs: 20-35, variante relativa a la cápside de AAV9), cualesquiera otros de sus cápsides, variantes, fragmentos o mutantes de AAV conocidos.

En ciertas realizaciones, las una o más cápsides usadas en los métodos reivindicados pueden comprender una combinación de secuencias polipeptídicas V1, V2 y/o V3 de las cápsides del clado F (SEQ ID NOs: 2-17, variante relativa a AAV9).

En algunas realizaciones, un vector del clado F de AAV para editar un genoma de una célula comprende una cápside del clado F de AAV según las reivindicaciones. Una "cápside del clado F de AAV" descrita en la presente se puede referir a una cápside que tiene una secuencia VP1, VP2 y/o VP3 de AAV que tiene al menos 86% (p. ej., al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%) de identidad de secuencia con la secuencia VP1, VP2 y/o VP3 de AAV de AAV9, respectivamente. Cápsides del clado F ejemplares incluyen AAVF1-17 (también denominadas en la presente AAVHSC1-17), AAV9, AAVHU31, AAVHU32 y AAVAnc110 (véase, p. ej., Zinn y cols. In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector (2015) Cell Reports, Vol 12, pp. 1056-1068).

En algunas realizaciones, una cápside del clado F de AAV comprende al menos una o al menos dos proteínas seleccionadas de VP1 del clado F, VP2 del clado F y VP3 del clado F según se definen por las reivindicaciones. En algunas realizaciones, una cápside del clado F de AAV comprende proteínas VP1 del clado F, VP2 del clado F y VP3 del clado F según se definen por las reivindicaciones.

Secuencias proteínicas de VP1, VP2 y VP3 de AAV ejemplares de cápsides del clado F de AAV se proporcionan en la tabla posterior.

Cápside de AAV	VP1	VP2	VP3
AAV9	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 1	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 1	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 1
AAVF1	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 2	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 2	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 2
AAVF2	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 3	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 3	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 3
AAVF3	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 5	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 5	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 5
AAVF4	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 6	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 6	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 6
AAVF5	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 11	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 11	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 11
AAVF6	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 7	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 7	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 7
AAVF7	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 8	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 8	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 8
AAVF8	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 9	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 9	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 9
AAVF9	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 10	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 10	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 10
AAVF10	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 3	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 3	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 3
AAVF11	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 4	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 4	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 4
AAVF12	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 12	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 12	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 12

AAVF13	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 14	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 14	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 14
AAVF14	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 15	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 15	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 15
AAVF15	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 16	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 16	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 16
AAVF16	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 17	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 17	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 17
AAVF17	Aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 13	Aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 13	Aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 13

Una cápside del clado F de AAV descrita en la presente puede comprender una proteína VP1, VP2 o VP3 que tiene al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 o los aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO:1, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside de AAV9 VP1, VP2 y VP3, respectivamente. Una cápside del clado F de AAV descrita en la presente puede comprender las proteínas VP1 y VP2 que tienen al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 736 y aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO:1, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de proteínas de la cápside AAV9 VP1 y VP2, respectivamente; proteínas VP1 y VP3 que tienen al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 736 y aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO:1, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de proteínas de la cápside de AAV9 VP1 y VP3, respectivamente; o proteínas VP2 y VP3 que tienen al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 138 a 736 y aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO:1, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de proteínas de la cápside de AAV9 VP2 y VP3, respectivamente. Una cápside del clado F de AAV descrita en la presente puede comprender proteínas VP1, VP2, y VP3 que tienen al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO:1, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de proteínas de la cápside AAV9 VP1, VP2 y VP3, respectivamente.

En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende una proteína VP1, VP2, o VP3 que tiene al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 o los aminoácidos 203 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17 VP1, VP2 y VP3, respectivamente. En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende las proteínas VP1 y VP2 que tienen al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 736 y los aminoácidos 138 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17 VP1 y VP2, respectivamente; las proteínas VP1 y VP3 que tienen al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17 VP1 y VP3, respectivamente; o las proteínas VP2 y VP3 que tienen al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17 VP2 y VP3, respectivamente. En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende las proteínas VP1, VP2 y VP3 que tienen al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17 VP1, VP2 y VP3, respectivamente.

En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende una proteína VP1, VP2, o VP3 que está codificada por una secuencia nucleotídica que comprende al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con SEQ ID NO:18, que corresponde a la secuencia nucleotídica que codifica las proteínas de la cápside de AAV9 VP1, VP2 y VP3, respectivamente. En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende las proteínas VP1 y VP2 que están codificadas por secuencias nucleotídicas que comprenden al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con SEQ ID NO: 18, que corresponde a la secuencia nucleotídica que codifica las proteínas de la cápside de AAV9 VP1, VP2 y VP3; las proteínas VP1 y VP3 que están codificadas por una secuencia nucleotídica que comprende al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con SEQ ID NO: 18; o las proteínas VP2 y VP3 que están codificadas por una secuencia nucleotídica que comprende al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con SEQ ID NO: 18. En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende las proteínas VP1, VP2, y VP3 que están codificadas por una secuencia nucleotídica que comprende al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con SEQ ID NO: 18, que corresponde a una secuencia nucleotídica que codifica las proteínas de la cápside de AAV9 VP1, VP2 y VP3.

En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende una proteína VP1, VP2 o VP3 que está codificada por una secuencia nucleotídica que comprende al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con una cualquiera de SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 25, 24, 27, 28, 29, 26, 30, 31, 32, 33, 34 o 35, que corresponden a secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas de la cápside de AAVF1 a AAVF17 VP1, VP2 y VP3, respectivamente. En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende las proteínas VP1 y VP2 que están codificadas por secuencias nucleotídicas que comprenden al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con una cualquiera de SEQ ID NOs:20-35; las proteínas VP1 y VP3 que están codificadas por una secuencia nucleotídica que comprende al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con una cualquiera de SEQ ID NOs:20-35; o las proteínas VP2 y VP3 que están codificadas por una secuencia nucleotídica que comprende al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con una cualquiera de SEQ ID NOs:20-35. En algunos aspectos, una cápside del clado F de AAV comprende las proteínas VP1, VP2, y VP3 que están codificadas por una secuencia nucleotídica que comprende al menos 85% (p. ej., al menos 86%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) de identidad de secuencia nucleotídica con una cualquiera de SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 25, 24, 27, 28, 29, 26, 30, 31, 32, 33, 34 o 35, que corresponden a secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas de la cápside de AAVF1 a AAVF17 VP1, VP2 y VP3, respectivamente.

Una cápside del clado F de AAV descrita en la presente puede comprender una proteína de la cápside VP1, VP2 o VP3 de AAV9, que corresponde a los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 que se indican en SEQ ID NO:1, respectivamente. Una cápside del clado F de AAV descrita en la presente puede comprender las proteínas de la cápside VP1 y VP2 de AAV9, que corresponden a los aminoácidos 1 a 736 y los aminoácidos 138 a 736 que se indican en SEQ ID NO:1, respectivamente; las proteínas de la cápside VP1 y VP3 de AAV9, que corresponden a los aminoácidos 1 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 que se indican en SEQ ID NO:1, respectivamente; o las proteínas de la cápside VP2 y VP3 de AAV9, que corresponden a los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 que se indican en SEQ ID NO:1, respectivamente. Una cápside del clado F de AAV descrita en la presente puede comprender las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de AAV9, que corresponden a los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 que se indican en SEQ ID NO:1, respectivamente.

En algunas realizaciones, una cápside del clado F de AAV comprende una proteína de la cápside VP1 seleccionada de una proteína de la cápside VP1 de uno cualquiera de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17, que corresponde a los aminoácidos 1 a 736 que se indican en SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente. En algunas realizaciones, una cápside del clado F de AAV comprende una proteína de la cápside VP1 y una VP2 seleccionadas independientemente de una proteína de la cápside VP1 y VP2 de uno cualquiera de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17, que corresponden a los aminoácidos 1 a 736 y los aminoácidos 138 a 736 que se indican en SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente. En algunas realizaciones, una cápside del clado F de AAV comprende una proteína de la cápside VP2 y a VP3 seleccionada independientemente de una proteína de la cápside VP2 y VP3 de uno cualquiera de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17, que corresponden a los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 que se indican en SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente. En algunas realizaciones, una cápside del clado

F de AAV comprende cada una de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 de uno cualquiera de AAVF1 a AAVF9 y AAVF11 a AAVF17, que corresponden a los aminoácidos 1 a 736, los aminoácidos 138 a 736 y los aminoácidos 203 a 736 que se indican en SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 o 13, respectivamente.

Según se usa en la presente, un fragmento de una secuencia polinucleotídica puede ser una porción del polinucleótido que codifica un polipéptido que proporciona sustancialmente la misma función que el polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica de longitud completa. Según se usa en la presente, los mutantes de una secuencia polinucleotídica se pueden obtener mediante eliminación, sustitución, adición y/o inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia polinucleotídica específica. Se debe entender que estos fragmentos y/o mutantes de una secuencia polinucleotídica codifican un polipéptido que tiene sustancialmente la misma función que el polipéptido codificado por la secuencia polinucleotídica de longitud completa.

Según se usa en la presente, una secuencia polipeptídica puede incluir fragmentos y/o mutantes de la secuencia polipeptídica, mientras que todavía proporciona sustancialmente la misma función que la secuencia polipeptídica de longitud completa. Un fragmento de una secuencia polipeptídica significa una parte de la secuencia polipeptídica que proporciona sustancialmente la misma función que la secuencia polipeptídica de longitud completa. Ejemplos de mutantes de una secuencia polipeptídica incluyen eliminaciones, sustituciones, adiciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos a la secuencia polipeptídica.

En ciertos aspectos, una secuencia polinucleotídica puede ser un polinucleótido recombinante o no presente en la naturaleza. En ciertos aspectos, una secuencia polinucleotídica puede ser ADNc.

Los vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV descritos en la presente pueden comprender cualquiera de los AAVF (o AAVHSC) o cualesquiera otros vectores del clado F de AAV descritos en la presente. Un vector del clado F de AAV o una variante del vector de AAV descritos en la presente pueden comprender cualquiera de los vectores de AAVF (o AAVHSC) descritos en la presente, tales como AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF10, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, AAVF17, sus variantes, fragmentos, mutantes, o cualquiera de sus combinaciones. Un vector del clado F o una variante del vector de AAV descritos en la presente pueden comprender cualquiera de AAV9, AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF10, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, AAVF17, AAVHU31, AAVHU32, sus variantes, fragmentos, mutantes o cualquiera de sus combinaciones.

En ciertas realizaciones, los vectores del clado F de AAV proporcionados en la presente para el uso en los métodos reivindicados comprenden un elemento de edición (también denominado en la presente un casete de direccionamiento, significando que los términos "elemento de edición" y "casete de direccionamiento" se usan intercambiablemente en la presente) según se define por las reivindicaciones, que comprende una o más secuencias nucleotídicas o un enlace internucleotídico que se van a integrar en un locus diana (también denominado en la presente un sitio diana, significando que los términos se usan intercambiablemente en la presente) del genoma, una secuencia nucleotídica 5’ de la rama homóloga 5’ del elemento de edición, que tiene homología con una región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana (p. ej., una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5’ que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana)), y una secuencia nucleotídica 3’ de la rama homóloga 3’ del elemento de edición, que tiene homología con una región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana (p. ej., una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3’ que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana)).

En ciertas realizaciones, las una o más secuencias nucleotídicas que se van a integrar en un sitio diana del genoma pueden ser una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas. El término "terapéutico" según se usa en la presente se refiere a una sustancia o un procedimiento que da como resultado el tratamiento de una enfermedad o un trastorno. Una "secuencia nucleotídica terapéutica" es una secuencia nucleotídica que proporciona un efecto terapéutico. El efecto terapéutico puede ser directo (p. ej., una sustitución de un ácido nucleico de un gen expresado como una proteína, o una inserción de un ADNc en un intrón para la expresión) o indirecto (p. ej., una corrección de un elemento regulador tal como un promotor). En ciertas realizaciones, la secuencia nucleotídica terapéutica puede incluir uno o más nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia nucleotídica terapéutica puede ser un gen, uno de sus variantes, fragmentos o mutantes. En ciertas realizaciones, cuando se desea una terapia génica, la secuencia nucleotídica terapéutica puede ser cualquier secuencia nucleotídica que codifique una proteína que sea terapéuticamente eficaz, incluyendo anticuerpos terapéuticos. Los vectores del clado F que comprenden las secuencias nucleotídicas terapéuticas se administran preferiblemente en una cantidad terapéuticamente eficaz a través de una vía de administración adecuada, tal como inyección, inhalación, absorción, ingestión u otros métodos.

En algunas realizaciones, un elemento de edición según se describe en la presente consiste en un nucleótido. En algunas realizaciones, un elemento de edición según se describe en la presente consiste en un nucleótido y un locus diana según se describe en la presente es una secuencia nucleotídica que consiste en un nucleótido, representando el locus diana una mutación puntual. En algunas realizaciones, un elemento de edición según se describe en la presente comprende al menos 1, 2, 10, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, o 5000 nucleótidos. En algunas realizaciones, un elemento de edición según se describe en la presente comprende o consiste en de 1 a 5500, de 1 a

5000, de 1 a 4500, de 1 a 4000, de 1 a 3000, de 1 a 2000, de 1 a 1000, de 1 a 500, de 1 a 200, o de 1 a 100 nucleótidos, o de 2 a 5500, de 2 a 5000, de 2 a 4500, de 2 a 4000, de 2 a 3000, de 2 a 2000, de 2 a 1000, de 2 a 500, de 2 a 200, o de 2 a 100 nucleótidos, o de 10 a 5500, de 10 a 5000, de 10 a 4500, de 10 a 4000, de 10 a 3000, de 10 a 2000, de 10 a 1000, de 10 a 500, de 10 a 200, o de 10 a 100 nucleótidos. En algunas realizaciones, un elemento de edición según se describe en la presente comprende o consiste en un exón, un intrón, una región no traducida (UTR) 5', una UTR 3', un promotor, un donante de empalme, un aceptor de empalme, una secuencia que codifica o no codifica ARN, un aislante, un gen, o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, un elemento de edición según se describe en la presente es un fragmento (p. ej., no más de 2 kb, no más de 1 kb, no más de 500 pb, no más de 250 pb, no más de 100 pb, no más de 50 pb, o no más de 25 pb) de una secuencia codificante de un gen dentro de o que abarca un locus diana según se describe en la presente. En algunas realizaciones, un elemento de edición según se describe en la presente es un enlace internucleotídico (p. ej., un enlace fosfodiéster que conecta dos nucleótidos adyacentes). En algunas realizaciones, un elemento de edición según se describe en la presente es un enlace internucleotídico, un locus diana en un cromosoma según se describe en la presente es una secuencia nucleotídica que comprende uno o más nucleótidos, y el elemento de edición comprende una eliminación para el locus diana en el cromosoma.

En ciertas realizaciones, el elemento de edición (o casete de direccionamiento) del vector del clado F de AAV puede comprender una o más secuencias polinucleotídicas del elemento regulador. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las una o más secuencias polinucleotídicas del elemento regulador se pueden seleccionar de una secuencia 2A, una secuencia aceptora de empalme, una secuencia de poliadenilación, y cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el casete de direccionamiento puede comprender una o más secuencias polinucleotídicas de la repetición terminal invertida (ITR) de AAV que flanquean las secuencias polinucleotídicas de las ramas homólogas 5' y 3'. En ciertas realizaciones, el elemento de edición (o casete de direccionamiento) no contiene un promotor para conducir la expresión de las una o más secuencias nucleotídicas. En ciertas realizaciones, si el elemento de edición (o casete de direccionamiento) no contiene un promotor, la expresión de las una o más secuencias nucleotídicas después de la integración en el genoma celular se puede controlar mediante uno o más elementos reguladores de la célula. En ciertas realizaciones, la expresión de las una o más secuencias nucleotídicas sin promotor demuestra que las una o más secuencias nucleotídicas se integraban correctamente en la célula.

El vector del clado F de AAV comprende una secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5' y una secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3' según se definen en las reivindicaciones. Las secuencias polinucleotídicas de las ramas homólogas son homólogas a una región del locus diana (sitio diana) del genoma según se define en las reivindicaciones. Las secuencias polinucleotídicas de las ramas homólogas incluyen una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' según se define en las reivindicaciones. La secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' flanquea el extremo 5' del elemento de edición (o casete de direccionamiento) según se define en las reivindicaciones. La secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de edición (o casete de direccionamiento) es homóloga a una región que está aguas arriba de un locus diana (sitio diana) del genoma según se define en las reivindicaciones. Las secuencias polinucleotídicas de las ramas homólogas incluyen una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' según se define en las reivindicaciones. La secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' flanquea el extremo 3' del elemento de edición (o casete de direccionamiento) según se define en las reivindicaciones. La secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (o casete de direccionamiento) es homóloga a una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana) del genoma según se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, las secuencias polinucleotídicas de las ramas homólogas pueden tener una longitud de aproximadamente 500 a 1.000 nucleótidos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las secuencias polinucleotídicas de las ramas homólogas pueden tener una longitud de aproximadamente 800 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la secuencia polinucleotídica de la rama puede tener una longitud de aproximadamente 3.000 nucleótidos. En algunas realizaciones, cada una de las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 3' y 5' tiene independientemente una longitud de nucleótidos de entre aproximadamente 50 y 2000 nucleótidos, tal como entre aproximadamente 500-1000, aproximadamente 600-1000 o aproximadamente 700-900 nucleótidos. En algunas realizaciones, cada una de las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 3' y 5' tiene independientemente una longitud de nucleótidos de entre aproximadamente 600, aproximadamente 800 o aproximadamente 1000 nucleótidos.

En algunas realizaciones, las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 3' y 5' tienen longitudes de nucleótidos sustancialmente iguales. En algunas realizaciones, las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 3' y 5' tienen longitudes de nucleótidos asimétricas. En algunas realizaciones, la simetría en la longitud de nucleótidos se define mediante una diferencia entre las longitudes de las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 5' y 3' de hasta 50% en la longitud, tal como hasta 40%, 30%, 20% o 10% de diferencia en la longitud. En algunas realizaciones, la asimetría en la longitud de nucleótidos se define por que una rama de la rama homóloga 5' y 3' tiene una longitud de aproximadamente 600 nucleótidos y la otra rama de la rama homóloga 5' y 3' tiene una longitud de aproximadamente 800 o aproximadamente 900 nucleótidos.

En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5' tiene al menos aproximadamente 90% (p. ej., al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% o al menos aproximadamente 99,5%) de identidad de secuencia nucleotídica con la región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3' tiene al menos

aproximadamente 90% (p. ej., al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% o al menos aproximadamente 99,5%) de identidad de secuencia nucleotídica con la región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana. En algunas realizaciones, las diferencias en las secuencias nucleotídicas de la rama homóloga 5' o la rama homóloga 3' y la correspondiente región 5' o región 3' del cromosoma de mamífero, respectivamente, pueden comprender, consistir esencialmente en consistir en diferencias no codificantes en las secuencias nucleotídicas. En algunas realizaciones, las diferencias en las secuencias nucleotídicas de la rama homóloga 5' o la rama homóloga 3' y la correspondiente región 5' o región 3' del cromosoma de mamífero, respectivamente, pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en diferencias en secuencias nucleotídicas que dan como resultado cambios de aminoácidos conservativos (p. ej., un aminoácido básico cambiado por un aminoácido básico diferente). En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5' tiene 100% de identidad de secuencia con la región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana y la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3' tiene 100% de identidad de secuencia con la región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana. En algunas realizaciones, la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5' y la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3' se consideran homólogas con la región 5' y 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana, respectivamente, aunque el locus diana contenga una o más mutaciones, tales como uno o más SNPs presentes en la naturaleza, en comparación con la rama homóloga 5' o 3'.

En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) del genoma celular puede ser cualquier región del genoma en la que se desee que se produzca la edición del genoma celular. Por ejemplo, el locus diana (sitio diana) del genoma celular puede comprender un locus de un cromosoma en la célula (p. ej., una región de un cromosoma de mamífero). En ciertas realizaciones, el locus del cromosoma puede ser un sitio de "puerto seguro". Un sitio de "puerto seguro" es una localización del genoma en la que una secuencia nucleotídica se puede integrar y funcionar de un modo predecible sin perturbar la actividad del gen endógeno. En ciertas realizaciones, el sitio de "puerto seguro" puede ser el locus AAVS1 en el cromosoma 19 humano (también conocido como locus PPP1R12C). En ciertas realizaciones, el sitio de "puerto seguro" puede ser el primer intrón de PPP1R12C en el locus AAVS1 en el cromosoma 19 humano. Se observó previamente que el locus AAVS1 sobre el cromosoma 19 qter13.3-13.4 era un sitio de "puerto seguro" para la inserción de transgenes ya que los genes insertados aquí se expresan sin consecuencias patógenas, lo que es similar a AAV silvestre que se integra en este locus sin consecuencias patógenas (Giraud 1994; Linden, 1996A; Linden 1996B). En algunas realizaciones, el locus diana (sitio diana) es un locus asociado con un estado patológico según se describe en la presente.

En ciertas realizaciones, el locus diana es un locus mutante diana en un cromosoma de mamífero que comprende uno o más nucleótidos mutantes, con relación a un cromosoma de mamífero silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, el locus diana mutante comprende una mutación puntual, una mutación de sentido alterado, una mutación sin sentido, una inserción de uno o más nucleótidos, una eliminación de uno o más nucleótidos, o sus combinaciones. En algunas realizaciones, el locus mutante diana comprende una mutación amórfica, una mutación neomórfica o una mutación antimórfica. En algunas realizaciones, el locus mutante diana comprende una mutación dominante autosómica, una mutación recesiva autosómica, una mutación heterocigótica, una mutación homocigótica, o sus combinaciones. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los locus diana mutantes descritos en la presente, el locus diana mutante se selecciona de un promotor, un potenciador, una secuencia de señalización, un intrón, un exón, un sitio donante de empalme, un sitio aceptor de empalme, un sitio interno de entrada al ribosoma, un exón invertido, un aislante, un gen, una inversión cromosómica y una translocación cromosómica dentro del cromosoma de mamífero.

En algunas realizaciones, un locus diana en un cromosoma según se describe en la presente es una secuencia nucleotídica que comprende n nucleótidos donde n es un número entero mayor de o igual a uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000. 5000, o cualquier número entero entre los mismos), un elemento de edición según se describe en la presente comprende m nucleótidos donde m es un número entero igual a n, y el elemento de edición representa una sustitución para el locus diana del cromosoma. En algunas realizaciones, un locus diana en un cromosoma según se describe en la presente es una secuencia nucleotídica que comprende n nucleótidos donde n es un número entero mayor de o igual a uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000. 5000, o cualquier número entero entre los mismos), un elemento de edición según se describe en la presente comprende m nucleótidos donde m es un número entero mayor de n, y el elemento de edición representa una adición sustitutiva para el locus diana del cromosoma. En algunas realizaciones, un locus diana en un cromosoma según se describe en la presente es una secuencia nucleotídica que comprende n nucleótidos donde n es un número entero mayor de o igual a dos (p. ej., 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000. 5000, o cualquier número entero entre los mismos), un elemento de edición según se describe en la presente comprende m nucleótidos donde m es un número entero menor de n; y el elemento de edición representa una eliminación sustitutiva para el locus diana del cromosoma. En algunas realizaciones, un locus diana en un cromosoma según se describe en la presente es un enlace internucleotídico, un elemento de edición según se describe en la presente comprende m nucleótidos donde m es un número entero mayor de o igual a uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000. 5000, o cualquier número entero entre los mismos); y el elemento de edición representa una adición para el locus diana del cromosoma.

Según las reivindicaciones, un locus diana en un cromosoma es un locus diana en un cromosoma de mamífero (p. ej. un cromosoma de ser humano, ratón, bóvido, equino, canino, felino, rata o conejo). En algunas realizaciones, el locus diana puede comprender un intrón de un cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana puede comprender un exón de un cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana puede comprender una región no codificante de un cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el locus diana puede comprender una región reguladora de un cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, el cromosoma de mamífero se selecciona de cromosoma 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X e Y humano. En algunas realizaciones, el cromosoma de mamífero se selecciona de cromosoma 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X e Y de ratón. En algunas realizaciones, el cromosoma de mamífero no es cromosoma 19 humano. En algunas realizaciones, el cromosoma de mamífero es un cromosoma de célula somática. Células somáticas ejemplares se describen adicionalmente en la presente.

En ciertas realizaciones, las una o más secuencias nucleotídicas o el elemento de edición se pueden integrar en el genoma a través de una recombinación homóloga sin la necesidad de escisión de ADN antes de la integración. En ciertas realizaciones, las una o más secuencias nucleotídicas o el elemento de edición se pueden integrar en el genoma a través de una recombinación homóloga sin la necesidad de la adición de nucleasas exógenas tales como nucleasa del dedo de cinc (ZFN), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN) o una nucleasa guiada por ARN (CRISPR/Cas).

La célula que se edita mediante los vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV descritos en la presente puede ser cualquier tipo de célula de mamífero. En ciertas realizaciones, las células son las definidas por las reivindicaciones. Se contempla en la presente una amplia variedad de células de mamífero, por ejemplo, células del hígado, el pulmón, el cartílago y otro tejido conectivo, el ojo, el sistema nervioso central y periférico, el sistema linfático, el hueso, el músculo, la sangre, el cerebro, la piel, el corazón y el tracto y digestivo. Cuando la célula que va a ser editada por los vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV es, por ejemplo, una célula hepática, la secuencia nucleotídica insertada se dirige a tratar (mejorar o curar un trastorno o detener la progresión adicional de una enfermedad o un trastorno) o prevenir una afección. Cuando la célula que va a ser editada por los vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV es una célula hepática, las afecciones hepáticas tratadas o prevenidas comprenden hemofilia, aporte enzimático, cirrosis, cáncer o aterosclerosis, entre otras afecciones hepáticas. En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula somática (p. ej., una célula somática de mamífero). En ciertas realizaciones, la célula (p. ej., una célula somática tal como una célula somática de mamífero) puede proceder de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido conectivo (incluyendo sangre), tejido muscular, tejido nervioso y tejido epitelial. En ciertas realizaciones, la célula (p. ej., una célula somática tal como una célula somática de mamífero) puede proceder de un órgano seleccionado del grupo que consiste en pulmón, corazón, hígado, riñón, músculo, cerebro, ojo, mama, hueso y cartílago. En algunas realizaciones, la célula es una célula CD34+ (p. ej., una célula somática CD34+). En algunas realizaciones, la célula (p. ej., una célula somática tal como una célula somática de mamífero) es una célula hepática, un fibroblasto, una célula mamaria, un linfocito o una célula retiniana.

Según se muestra en la presente, los AAV empaquetados con las cápsides del clado F o las variantes de cápside descritas en la presente demuestran un tropismo específico para ciertos tejidos diana, tales como células madre sanguíneas, hígado, corazón, ojo, mama y tejido articular, y se pueden usar para transducir células madre para la introducción de genes de interés en los tejidos diana. Ciertos de los vectores son capaces de cruzar conexiones biológicas estrechamente controladas, tales como la barrera hematoencefálica, lo que abre nuevos usos adicionales y órganos diana para los vectores, proporcionando métodos de terapia génica a través de edición genómica. Así, los vectores del clado F o las variantes de vectores de AAV pueden demostrar un tropismo para una célula particular basándose en sus cápsides del clado F o variantes de cápside. Por ejemplo a) para tejido o células musculares, el vector del clado F de AAV o la variante del vector de AAV se puede seleccionar del grupo de AAVF5, AAVF7, AAVF13, AAVF15, y AAVF17; b) para tejido o células cardíacos o pulmonares, el vector se puede seleccionar del grupo de AAVF13, AAVF15, y AAVF17; c) para tejido o células hepáticos o del SNC, el vector se puede seleccionar de AAVF5, AAVF13, AAVF17, AAVF7 o AAVF15; d) para células madre, el vector puede ser AAVF17; e) para progenitores de células B, el vector puede ser AAVF5; f) para progenitores mieloides y eritroides, el vector puede ser AAVF12; y g) para tejidos o células de nódulo linfático, riñón, bazo, cartílago y hueso, el vector se puede seleccionar del grupo del vector seleccionado del grupo de AAVF7, AAVF13, AAVF15 y AAVF17.

Además, los vectores del clado F o las variantes de vectores de AAV pueden tener un tropismo para células que contienen diversas etiquetas, tales como una etiqueta de seis His o una etiqueta de afinidad, o para respuestas interferónicas, tales como anticuerpos presentes en la naturaleza producidos o anticuerpos monoclonales introducidos administrados en respuesta a un patógeno o una célula tumoral.

En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula madre (p. ej., una célula madre de mamífero). En ciertas realizaciones, la célula madre puede ser cualquier tipo de célula madre incluyendo una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre embrionaria no humana o una célula madre mesenquimal. En ciertas realizaciones, la célula madre (p. ej., célula madre de mamífero) puede ser una célula madre hematopoyética, una célula madre de sangre del cordón umbilical, una célula madre de médula ósea, una célula madre hepática fetal o una célula madre de sangre periférica. En algunas realizaciones, la célula madre puede ser una célula madre CD34+. En ciertas realizaciones, la célula madre (p. ej., célula madre de mamífero) puede ser una célula madre hematopoyética

o una célula madre de sangre periférica. La transducción de la célula madre puede ser bien transitoria o bien permanente (también llamada persistente). Si es transitoria, una realización permite que el espacio de tiempo en el que el nucleótido terapéutico se usa o se expresa sea controlado bien por el vector, bien por la sustancia ligada al vector o bien por factores o fuerzas externos.

En ciertas realizaciones, la célula se puede seleccionar del grupo que consiste en una línea de células madre hematopoyéticas (HSC) CD34+, una línea celular de leucemia K562 CD34+, una línea celular hepática humana HepG2, una célula madre de sangre periférica, una célula madre de sangre del cordón umbilical, una célula madre de sangre periférica CD34+, una línea celular de fibroblastos diploides humanos WI-38, una línea celular de cáncer de mama humano MCF7, una línea celular de retinoblastoma humano Y79, una línea de células B inmortalizadas por EBV humana SCID-X1 LBL, un hepatocito humano primario, una célula endotelial sinusoidal hepática primaria y un mioblasto de músculo esquelético primario.

También se proporcionan en la presente métodos según las reivindicaciones de edición *ex vivo* de un genoma de una célula de un sujeto que comprenden transducir la célula con un vector del clado F según se define por las reivindicaciones. Según las reivindicaciones, la transducción de la célula con un vector del clado F se produce sin nucleasas exógenas adicionales, tales como una nucleasa del dedo de cinc (ZFN), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN) o una nucleasa guiada por ARN (CRISPR/Cas). Según las reivindicaciones, la célula puede ser cualquier tipo de célula de mamífero. En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula madre según se describe en la presente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, métodos para editar el genoma de una célula madre pueden comprender transducir la célula madre con uno o más vectores del clado F según se definen por las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la transducción de la célula madre se puede realizar sin la necesidad de nucleasas exógenas adicionales. En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula somática según se describe en la presente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los métodos de edición del genoma de una célula somática pueden comprender transducir la célula somática con uno o más vectores del clado F según se definen por las reivindicaciones. Según las reivindicaciones, la transducción de la célula somática se realiza sin la necesidad de nucleasas exógenas adicionales. En ciertas realizaciones, el vector del clado F comprende una o más cápsides del clado F según se definen por las reivindicaciones, un elemento de edición (casete de direccionamiento) seleccionado de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en un locus diana de un cromosoma de mamífero o que comprende una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas que se van a integrar en un locus diana (sitio diana) del genoma, una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana) y una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana). En ciertas realizaciones, el enlace internucleotídico o la secuencia nucleotídica o las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas se pueden integrar en el genoma sin la necesidad de nucleasas exógenas adicionales para la escisión de ADN antes de la integración.

También se describen en la presente métodos para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto mediante la edición *ex vivo* de un genoma de una célula del sujeto que incluyen transducir la célula con un vector del clado F o una variante del vector de AAV y trasplantar adicionalmente la célula transducida en el sujeto para tratar la enfermedad o el trastorno. En ciertos aspectos, el método puede comprender transducir la célula del sujeto con un vector del clado F o una variante del vector de AAV descritos en la presente. En ciertos aspectos, la célula se puede transducir sin nucleasas exógenas adicionales. La transducción de la célula con el vector del clado F o la variante del vector de AAV se puede realizar según se proporciona en la presente o mediante cualquier método de transducción conocido por un experto normal en el técnica. La célula se puede transducir con el vector del clado F o la variante del vector de AAV a una multiplicidad de infección (MOI) de 50.000, 100.000, 150.000, 200.000, 250.000, 300.000, 350.000, 400.000, 450.000 o 500.000, o a cualquier MOI que proporcione una transducción óptima de la célula. En ciertos aspectos, la célula transducida se trasplanta adicionalmente al sujeto, en donde la célula transducida trata la enfermedad o el trastorno. La célula puede ser cualquier tipo de célula de mamífero descrita en la presente.

También se proporciona en la presente un método *ex vivo* para editar un locus diana de un genoma de mamífero según las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el método comprende transducir una célula según se define por las reivindicaciones (tal como una célula de ser humano, ratón, bóvido, equino, canino, felino, rata o conejo) que comprende el genoma de mamífero con un AAV según se define por las reivindicaciones (p. ej., un AAV con replicación defectuosa que comprende un genoma de corrección encerrado en una cápside). En algunos aspectos, el método comprende (a) obtener células de mamífero de un mamífero (tal como un ser humano, ratón, bóvido, equino, canino, felino, rata o conejo); (b) cultivar las células de mamífero *ex vivo* para formar un cultivo *ex vivo*; (c) transducir las células de mamífero con un AAV según se describe en la presente (p. ej., un AAV con replicación defectuosa que comprende un genoma de corrección encerrado en una cápside) en el cultivo *ex vivo* para formar células de mamífero transducidas; y (d) administrar las células de mamífero transducidas al mamífero. En algunos aspectos, el método comprende (a) obtener células de mamífero de este primer mamífero; (b) cultivar las células de mamífero *ex vivo* para formar un cultivo *ex vivo*; (c) transducir las células de mamífero con un AAV según se describe en la presente (p. ej., un AAV con replicación defectuosa que comprende un genoma de corrección encerrado en una cápside) en el cultivo *ex vivo* para formar células de mamífero transducidas; y (d) administrar las células de mamífero transducidas a un segundo mamífero. En algunos aspectos, el primer mamífero y el segundo mamífero son especies diferentes (p. ej.,

el primer mamífero es un ser humano, un ratón, un bóvido, un, equino, un canino, un felino, una rata o un conejo y el segundo mamífero es una especie diferente). En algunos aspectos, el primer mamífero y el segundo mamífero son la misma especie (p. ej., ambos son ser humano, ratón, bóvido, equino, canino, felino, rata o conejo). El método puede comprender administrar un AAV según se describe en la presente (p. ej., un AAV con replicación defectuosa que comprende un genoma de corrección encerrado en una cápside) a un mamífero (tal como un ser humano, un ratón, un bóvido, un equino, un canino, un felino, una rata o un conejo) en una cantidad eficaz para transducir las células del mamífero con el AAV *in vivo*.

En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, las células de mamífero proceden de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido conectivo (incluyendo sangre), tejido muscular, tejido nervioso y tejido epitelial. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, las células de mamífero proceden de un órgano seleccionado del grupo que consiste en pulmón, corazón, hígado, riñón, músculo, cerebro, ojo, mama, hueso y cartílago. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, las células de mamífero son células madre. En algunas realizaciones, las células madre son células madre hematopoyéticas o células madre de sangre periférica. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, las células de mamífero son células CD34+.

En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, el AAV (p. ej., AAV del clado F) tiene una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 1% (p. ej., al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 3%, al menos aproximadamente 4%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98% o aproximadamente 100%) para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, el AAV (p. ej. AAV del clado F) tiene una eficacia de integración cromosómica de al menos aproximadamente 1% (p. ej., al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 3%, al menos aproximadamente 4%, al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98% o aproximadamente 100%) para integrar el elemento de edición en el locus diana del cromosoma de mamífero en ausencia de una nucleasa exógena. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, el elemento de edición del genoma de corrección se integra en el locus diana del cromosoma de mamífero con una eficacia de integración cromosómica que varía de 10% a 70%, de 20% a 70%, de 40% a 70%, de 50% a 70%, de 10% a 80%, de 20% a 80%, de 40% a 80%, de 50% a 80%, de 10% a 90%, de 20% a 90%, de 40% a 90%, de 50% a 90%, de 10% a 100%, de 20% a 100%, de 40% a 100% o de 50% a 100% de las células de mamífero. En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, el elemento de edición del genoma de corrección se integra en el locus diana del cromosoma de mamífero con una eficacia de integración cromosómica que varía de 10% a 70%, de 20% a 70%, de 40% a 70%, de 50% a 70%, de 10% a 80%, de 20% a 80%, de 40% a 80%, de 50% a 80%, de 10% a 90%, de 20% a 90%, de 40% a 90%, de 50% a 90%, de 10% a 100%, de 20% a 100%, de 40% a 100%, de o 50% a 100% de las células de mamífero en ausencia de una nucleasa exógena.

En algunas realizaciones de uno cualquiera de los métodos, el AAV (p. ej., AAV del clado F) tiene una eficacia de integración cromosómica caracterizada además por una frecuencia alélica en una población de células de al menos aproximadamente 10% (p. ej., al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95%) para el alelo que comprende el elemento de edición integrado en el locus diana del cromosoma de mamífero. En algunas realizaciones, la frecuencia alélica en una población de células es una frecuencia alélica en una población de células *in vitro*, tal como una población de un tipo de célula proporcionado en la presente *in vitro* (p. ej., una línea de células madre hematopoyéticas (HSC) CD34+, una línea celular de leucemia K562 CD34+, una línea celular hepática humana HepG2, una célula madre de sangre periférica, una célula madre de sangre del cordón umbilical, una célula madre de sangre periférica CD34+, una línea celular de fibroblastos diploides humanos WI-38, una línea celular de cáncer de mama humano MCF7, una línea celular de retinoblastoma humano Y79, una línea de células B inmortalizadas por EBV SCID-X1, un hepatocito humano primario, una célula endotelial sinusoidal hepática primaria o un mioblasto de músculo esquelético primario).

También se describen en la presente métodos para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto mediante la edición *ex vivo* de un genoma de célula madre del sujeto y trasplante adicional de la célula editada al sujeto para tratar la enfermedad o el trastorno. En ciertos aspectos, los métodos para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto al editar un genoma de una célula madre del sujeto pueden comprender las etapas de transducir la célula madre del sujeto con un vector del clado F de AAV o una variante del vector de AAV según se describen en la presente y trasplantar la célula madre transducida en el sujeto, en donde la célula madre transducida trata la enfermedad o el trastorno. En ciertos aspectos, el vector del clado F de AAV o la variante del vector de AAV pueden comprender una o más cápsides del clado F o variantes de cápside, un elemento de edición (casete de direccionamiento) que comprende una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas para ser integradas en un locus diana (sitio diana) en el genoma de la célula madre, una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de

edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana), y una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana). La transducción de la célula madre se realiza sin nucleasas exógenas adicionales. En ciertos aspectos, las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas se pueden integrar en el genoma sin la necesidad de nucleasas exógenas adicionales para la escisión de ADN antes de la integración.

En ciertas realizaciones, cuando la célula es una célula madre, la enfermedad o el trastorno que se trata puede ser cualquier enfermedad o trastorno que esté provocado por una o más mutaciones del genoma. En ciertas realizaciones, la enfermedad o el trastorno que se trata se selecciona de enfermedades metabólicas hereditarias, enfermedades de almacenamiento lisosómico, mucopolisacaridodosis, enfermedades de inmunodeficiencia y enfermedades e infecciones hemoglobinopáticas. En ciertas realizaciones, cuando la célula que se va a editar es una célula madre, el vector del clado F de AAV se puede seleccionar del grupo de AAVF7, AAVF12, AAVF15 y AAVF17. En ciertas realizaciones, cuando la célula que se va a editar es una célula madre, el vector del clado F se puede seleccionar del grupo de AAVF5, AAVF7, AAVF12, AAVF15 y AAVF17. En ciertos aspectos, el vector del clado F o la variante del vector de AAV puede comprender una o más cápside del clado F o variantes de cápside que comprenden una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo de AAVF7 (SEQ ID NO: 27), AAVF12 (SEQ ID NO: 30), AAVF15 (SEQ ID NO: 33), AAVF17 (SEQ ID NO: 35), sus variantes, fragmentos, mutantes y combinaciones. En ciertos aspectos, el vector del clado F o la variante del vector de AAV pueden comprender una o más cápsides del clado F o variantes de cápside que comprenden una secuencia polinucleotídica seleccionada del grupo de AAVF5 (SEQ ID NO: 25), AAVF7 (SEQ ID NO: 27), AAVF12 (SEQ ID NO: 30), AAVF15 (SEQ ID NO: 33), AAVF17 (SEQ ID NO: 35), sus variantes, fragmentos, mutantes y combinaciones. En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV puede comprender una o más cápsides del clado F que comprenden una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16) y AAVF17 (SEQ ID NO: 13). En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV puede comprender una o más cápsides del clado F que comprenden una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF15 (SEQ ID NO: 16) y AAVF17 (SEQ ID NO: 13).

En otro aspecto, los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV capaces de edición genómica, procedentes de HSC $CD34^+$ o de otra fuente, se pueden usar para la transducción de alta eficacia de células madre, incluyendo HSC y iPSC, y otras células, tales como las del corazón, una articulación, el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, el músculo y el hígado. Si los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV se usan in vitro, se pueden usar con propósitos de estudio e investigación o para preparar células o tejidos que más tarde se implantarán en un sujeto. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, tal como un ser humano, pero puede ser cualquier otro animal que tenga tejidos que se puedan transducir mediante los presentes vectores y métodos para usar esos vectores. Los presentes vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV son muy adecuados para uso tanto humano como veterinario. Los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV también se pueden usar in vitro para la transducción transitoria de células madre, tales como HSC. La longitud de la transducción se puede controlar por las condiciones de cultivo. Si los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV se usan *in vivo*, se pueden administrar directamente al sujeto que recibe la terapia para la captación o el uso en células diana, tales como células del hígado o el cartílago. Si los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV se usan para transducir células del sistema nervioso central, preferiblemente son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y mantener su eficacia.

También se proporciona en la presente un AAV con replicación defectuosa para el uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto mediante la edición genómica *in vivo* de una célula del sujeto al administrar al sujeto directamente un vector del clado F de AAV según se define por las reivindicaciones. El vector del clado F de AAV puede ser cualquier vector del clado F de AAV según las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV puede comprender una o más cápsides del clado F según se definen en las reivindicaciones, un elemento de edición (casete de direccionamiento) que comprende una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas que se van a integrar en un locus diana (sitio diana) en el genoma de la célula madre, una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana), y una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana). En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV que se administra trata la enfermedad o el trastorno mediante la edición genómica de la célula del sujeto. Según las reivindicaciones, la edición genómica *in vivo* se produce sin nucleasas exógenas adicionales. En ciertas realizaciones, las una o más cápsides del clado F comprenden una secuencia polipeptídica según se define por las reivindicaciones. En ciertos aspectos, la secuencia polipeptídica se puede seleccionar de las secuencias proporcionadas en la Figura 1 de la Publicación de Patente de EE. UU. Número 20130096182A1 o en la Figura 1 de la presente, sus variantes, fragmentos, mutantes y combinaciones. En ciertas realizaciones, los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV se administran preferiblemente en una cantidad terapéuticamente eficaz a través de una vía de administración adecuada, tal como inyección, inhalación, absorción, ingestión u otros métodos.

Estudios previos, incluyendo Xu *y cols.*, Wang *y cols.*, y Carbonaro *y cols.*, han mostrado la transducción de HSCs después del aporte *in vivo* de un vector viral (véanse Xu 2004; Wang 2014; y Carbonaro 2006). Sin embargo, estos

tres estudios implicaban bien retrovirus (Xu 2004) o bien lentivirus (Wang 2014 y Carbonaro 2006). Adicionalmente, las inyecciones de Xu *y cols.* y Carbonaro *y cols.* se realizaron en ratones neonatos, y se requería rapamicina e inyección intrafemoral para una transducción eficaz en Wang *y cols.* Sin embargo, ninguno de estos documentos presenta la transducción de HSCs mediante la transducción *in vivo* de vectores del clado F o variantes de vectores de AAV en ratones adultos. Los nuevos resultados proporcionados en el Ejemplo 3 son los primeros en mostrar la transducción de vectores de AAV sobre HSCs mediante inyección intravenosa.

Según se muestra en el Ejemplo 3 posteriormente, la inyección intravenosa de vectores del clado F (o variantes de vectores de AAV) pseudotipados con AAVF7 o AAVF17 daba como resultado la transducción de células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ humanas *in vivo*. Los vectores de clado F o vectores de AAV inyectados intravenosamente viajaban hasta sitios de hematopoyesis humana y células humanas transducidas. La inyección intravenosa de vectores del clado F o variantes de vectores de AAV daba como resultado la expresión de Venus en células madre progenitoras CD34+ humanas, así como su descendencia CD45+. Estos datos muestran que la inyección intravenosa de vectores del clado F o variantes de vectores de AAV se puede usar para la manipulación genómica *in vivo* sin la necesidad de recolección de células madre, transducción *ex vivo*, acondicionamiento del receptor y trasplante posterior de células transducidas. Este enfoque hace la terapia génica significativamente más segura, más accesible a pacientes de todo el mundo, menos costosa y obvia la necesidad de hospitalización.

Según las reivindicaciones, se divulga un AAV con replicación defectuosa para el uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto mediante la edición genómica *in vivo* de una célula del sujeto al administrar directamente un vector del clado F de AAV al sujeto. En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV puede comprender una o más cápsides del clado F según se definen en las reivindicaciones, un elemento de edición (casete de direccionamiento) que comprende una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas para ser integradas en un locus diana (sitio diana) del genoma, una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 5' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas arriba del locus diana (sitio diana), y una secuencia polinucleotídica de la rama homóloga 3' que flanquea el elemento de edición (casete de direccionamiento) y que tiene homología con una región que está aguas abajo del locus diana (sitio diana), en donde el vector transduce una célula del sujeto e integra las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas en el genoma de la célula. En ciertas realizaciones, las una o más cápsides del clado F pueden comprender una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo de AAVF1 (SEQ ID NO: 2), AAVF2 (SEQ ID NO: 3), AAVF11 (SEQ ID NO: 4), AAVF3 (SEQ ID NO: 5), AAVF4 (SEQ ID NO: 6), AAVF6 (SEQ ID NO: 7), AAVF7 (SEQ ID NO: 8), AAVF8 (SEQ ID NO: 9), AAVF9 (SEQ ID NO: 10), AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF12 (SEQ ID NO: 12), AAVF17 (SEQ ID NO: 13), AAVF13 (SEQ ID NO: 14), AAVF14 (SEQ ID NO: 15), AAVF15 (SEQ ID NO: 16) y AAVF16 (SEQ ID NO: 17). En ciertas realizaciones, las una o más cápsides del clado F pueden comprender una secuencia polipeptídica de AAVF7 (SEQ ID NO: 8) o AAVF17 (SEQ ID NO: 13). En ciertas realizaciones, las una o más cápsides del clado F pueden comprender una secuencia polipeptídica de AAVF5 (SEQ ID NO: 11), AAVF (SEQ ID NO: 8) o AAVF17 (SEQ ID NO: 13). En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV no contiene un promotor para las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas. En ciertas realizaciones, el locus diana (sitio diana) puede ser un sitio de "puerto seguro". En ciertas realizaciones, el sitio de "puerto seguro" puede ser el locus AAVS1 en el cromosoma 19. En ciertas realizaciones, la célula puede ser una célula madre. En ciertas realizaciones, la célula madre puede ser una célula madre hematopoyética, una célula madre pluripotente, una célula madre embrionaria no humana o una célula madre mesenquimal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o el trastorno pueden estar provocados por una o más mutaciones en el genoma celular. En ciertas realizaciones, la enfermedad o el trastorno se puede seleccionar de una enfermedad metabólica hereditaria, una enfermedad del almacenamiento lisosómico, mucopolisacaridodosis, una enfermedad de inmunodeficiencia y enfermedad e infección hemoglobinopáticas.

Demostrando adicionalmente la eficacia de las aplicaciones *in vivo*, el trasplante de células transducidas a ratones inmunodeficientes con las variantes de aislado (con relación a AAV9) daba como resultado una expresión transgénica prolongada y sostenida y se puede usar para la terapia génica. En ciertos aspectos, cuando se aportan sistémicamente, estos vectores exhiben un tropismo para el hígado y el cartílago, con implicaciones para la terapia de enfermedades hereditarias, adquiridas, infecciosas y oncológicas. Con respecto a la transducción hepática, los presentes aislados de AAV tienen niveles de transducción hepática hasta aproximadamente 10 veces superiores que el método de referencia actual para el aporte sistémico de genes al hígado, AAV8. Esta propiedad se puede explotar para la terapia enzimática restitutiva a partir del hígado para enfermedades tales como hemofilia, enfermedades por deficiencia enzimática y aterosclerosis. El tropismo adicional de los presentes aislados de AAV para tejido cartilaginoso en articulaciones se puede explotar para el tratamiento de trastornos óseos tales como artritis, osteoporosis u otras enfermedades basadas en cartílagos/huesos. Según esto, las secuencias y los métodos diversos se pueden usar para la transducción transitoria cuando no sea deseable la integración a largo plazo.

Miembros de la familia de cápsides del clado F de AAV o la familia de variantes de cápsides de AAV transducen HSC, p. ej. AAVF 15 y AAVF 17, dando lugar al injerto a largo plazo con expresión génica sostenida y así son fuertes candidatos para vectores de terapia génica con células madre. AAVF17 y AAVF15 (también denominados en forma abreviada "HSC17" y "HSC15") soportaban los niveles más altos de transducción *in vivo* a largo plazo, hasta 22 semanas después del trasplante. La obtención de imágenes bioluminiscente después de la inyección intravenosa de las variantes de AAV revelaba que AAVF15 generalmente soportaba los niveles más altos de expresión transgénica a

largo plazo *in vivo*. Otras variantes de AAV incluyendo AAVF13 y 17 también soportaban una fuerte transducción *in vivo*.

Se encontró que AAVF15 era altamente trópico para el hígado, aproximadamente 5-10 veces mayor que AAV9. AAVF13 y AAVF15 también transducían el corazón y el músculo esquelético al menos 10 veces mejor que AAV9. Las valoraciones de neutralización in vitro revelaban que la prevalencia de anticuerpos para cápsides de AAVF 1-9 en IVIG humana reunida era similar a AAV9, mientras que los anticuerpos para AAVF13, AAVF15, AAVF16 y AAVF17 eran algo menos prevalentes. Los ensayos de neutralización *in vivo* confirmaban que se encontraban más de 100 veces más copias de genoma del vector/célula en el hígado y el músculo después de la administración de IVIG con AAVF15 en comparación con AAV9, sugiriendo que los anticuerpos preexistentes no neutralizaban completamente AAVF15. Enfermedades o trastornos musculares pueden comprender cualquier célula, tejido, órgano o sistema que contenga células musculares que tengan una enfermedad o un trastorno, incluyendo el corazón, tal como cardiopatía coronaria o cardiomiopatía.

Además, experimentos de mutagénesis específica del sitio indican que la mutación R505G en AAVF15 es responsable del tropismo hepático potenciado. Los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV se pueden usar para tratar a todo el hospedador de enfermedades genéticas tales como hemofilia, aterosclerosis y una variedad de errores innatos del metabolismo. En un caso, AAVF15 trata eficazmente la hemofilia B. Algunos miembros de esta familia también se dirigen a las articulaciones después de una inyección sistémica, que se puede usar para tratar enfermedades de las articulaciones y los cartílagos tales como artritis. Otros miembros de la familia se dirigen al corazón tras una inyección intravenosa. Otros miembros más de la familia se dirigen al cerebro. En algunos aspectos, un vector que comprende proteínas de la cápside de AAVF5 se proporciona como parte de un método, un estuche o una composición proporcionados en la presente, ya que se observó que AAVF5 transduce múltiples tipos de células (véase la Figura 4).

En ciertos aspectos, métodos para tratar una enfermedad o un trastorno neurológico en un sujeto mediante edición genómica pueden comprender administrar un vector del clado F de AAV o una variante del vector de AAV capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, la barrera hematoocular o la barrera hematonerviosa. Ciertos de los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV divulgados en la presente tienen la capacidad única para atravesar las conexiones biológicas que previamente era desconocido que fueran accesibles para cualquier vector para terapia génica u otros propósitos diagnósticos o terapéuticos usando un vector viral modificado. Estas conexiones tienen características comunes. La barrera hematoencefálica es una separación entre sangre que circula en el cuerpo y el fluido cerebral extracelular del sistema nervioso central y está creada por conexiones estrechas alrededor de los capilares. Generalmente, la barrera hematoencefálica permite solamente el paso mediante difusión de moléculas hidrófobas pequeñas. La barrera hematoocular es una separación formada entre los vasos sanguíneos locales y la mayoría de las partes del ojo y está formada por el endotelio de capilares de la retina y el iris. La barrera hematonerviosa es el espacio fisiológico dentro del cual funcionan los axones, las células de Schwann y otras células asociadas de un nervio periférico y está formada por los microvasos endoneuriales dentro del fascículo nervioso y el perineurio de revestimiento. Como con tres de estas barreras, existe una permeabilidad restringida para proteger en el ambiente interno, aquí, el nervio, de cambios de concentración drásticos en los espacios vasculares y otros espacios extracelulares. El vector que atraviesa cualquiera de estas barreras tiene una capacidad única para aportar una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas para tratar la enfermedad o el trastorno neurológico o para actuar como un agente marcado y/o de diagnóstico. Ciertos de los vectores del clado F de AAV o las variantes de vectores de AAV que se han validado experimentalmente como particularmente muy adecuados para cruzar estas barreras biológicas incluyen AAVF15, AAVF15 A346T y AAVF15 R505G.

Existen muchas enfermedades o trastornos neurológicos que son muy conocidos por un experto en la técnica, que generalmente se pueden clasificar por el tipo de célula u órgano tal como una enfermedad o un trastorno del cerebro, la médula espinal, los ganglios, un nervio motor, un nervio sensorial, un nervio autónomo, un nervio óptico, un nervio retiniano y un nervio auditivo. A modo de ejemplo, enfermedades o trastornos cerebrales incluyen cáncer u otro tumor cerebral, inflamación, infecciones bacterianas, infecciones virales, incluyendo rabia, infecciones por amebas o parásitos, apoplejía, parálisis, trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson u otra demencia o reducción en el funcionamiento cognitivo, placas, encefalopatía, enfermedad de Huntington, aneurisma, malformaciones genéticas o adquiridas, lesión cerebral adquirida, síndrome de Tourette, narcolepsia, distrofia muscular, temblores, parálisis cerebral, autismo, síndrome de Down, déficit de atención y trastorno de hiperactividad con déficit de atención, inflamación crónica, epilepsia, coma, meningitis, esclerosis múltiple, miastenia grave, diversas neuropatías, síndrome de las piernas inquietas y enfermedad de Tay-Sachs.

Enfermedades o trastornos musculares incluyen, solamente a modo de ejemplo, miopatías, síndrome de fatiga crónica, fibromialgia, distrofia muscular, esclerosis múltiple, atrofia, espasmos, calambres, rigidez, diversas inflamaciones, tales como dermatomiositis, rabdomiolisis, síndrome de dolor miofacial, hinchazón, síndrome compartimental, síndrome de eosinofilia-mialgia, miopatías mitocondriales, trastorno miotónico, parálisis, tendinitis, polimialgia reumática, cáncer y trastornos de los tendones tales como tendinitis y tenosinovitis.

Enfermedades o trastornos cardíacos incluyen, solamente a modo de ejemplo, arteriopatía coronaria, cardiopatía coronaria, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, miocarditis, enfermedad pericárdica, cardiopatía congénita, cáncer, endocarditis y valvulopatía.

Enfermedades o trastornos pulmonares incluyen, solamente a modo de ejemplo, asma, alergias, neumopatía obstructiva crónica, bronquitis, enfisema, fibrosis quística, neumonía, tuberculosis, edema pulmonar, cáncer, síndrome de dificultad respiratoria aguda, neumonconiosis y neumopatía intersticial.

Enfermedades o trastornos hepáticos incluyen, solamente a modo de ejemplo, cáncer, hepatitis A, B y C, cirrosis, ictericia y hepatopatía. Enfermedades o trastornos renales incluyen, solamente a modo de ejemplo, cáncer, diabetes, síndrome nefrótico, cálculos renales, nefropatía adquirida, enfermedad congénita, nefropatía poliquística, nefritis, hiperoxaluria primaria y cistinuria. Enfermedades o trastornos esplénicos incluyen, solamente a modo de ejemplo, cáncer, infarto esplénico, sarcoidosis y enfermedad de Gaucher. Enfermedades o trastornos óseos incluyen, solamente a modo de ejemplo, osteoporosis, cáncer, baja densidad ósea, enfermedad de Paget e infección.

Con cualquiera de estas enfermedades o trastornos tratados usando secuencias nucleotídicas terapéuticas o incluso pequeñas moléculas transportadas por o con los vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV, la secuencia nucleotídica terapéutica puede ser, a modo de ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica, tal como para el cáncer - - una proteína apoptótica, ARNmi, ARNsh, ARNsi, otros subtipos de ARN o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, los vectores se aíslan y purifican según se describe en la presente. El aislamiento y la purificación se prefieren en la administración *in vivo* para incrementar la eficacia y reducir la contaminación. El vector puede transducir permanentemente o transitoriamente un transgén, que es un gen u otro material genético que se ha aislado de un organismo e introducido en otro. Aquí, el otro organismo puede ser el sujeto que recibe el vector.

En ciertas realizaciones, los vectores del clado F de AAV para la edición genómica se pueden seleccionar basándose en resultados experimentales de la mayor eficacia en la célula o el tejido diana dados para la enfermedad o el trastorno dado según se muestra en la presente. Por ejemplo a) para una enfermedad o un trastorno muscular y para genes de anticuerpos u otros tratamientos vacunales administrados al sujeto a través del músculo, el vector del clado F de AAV seleccionado del grupo de AAVF5, AAVF7, AAVF13, AAVF15, y AAVF17; b) para enfermedades o trastornos cardíacos y pulmonares, el vector seleccionado del grupo de AAVF13, AAVF15 y AAVF17; c) para enfermedades o trastornos hepáticos o neurológicos, el vector seleccionado de AAVF5 y AAVF15; d) para afecciones tratadas al injertar células madre, el vector AAVF17; e) para afecciones tratadas al transducir progenitores de células B, el vector AAVF5; f) para afecciones tratadas al transducir progenitores mieloides y eritroides, el vector AAVF12; y g) para enfermedades o trastornos de los nódulos linfáticos, el riñón, el bazo, los cartílagos y los huesos, el vector seleccionado del grupo de AAVF7, AAVF13, AAVF15 y AAVF17; en donde el vector del clado F de AAV según se define por las reivindicaciones transduce la célula o el tejido y las una o más secuencias nucleotídicas terapéuticas se integran en el genoma de la célula y tratan la enfermedad o el trastorno. En ciertas realizaciones, el vector del clado F de AAV puede comprender una o más cápsides del clado F según se definen en las reivindicaciones que demuestran tropismo para una célula según se describe en la presente.

El sujeto es cualquier animal para el que funcione el método, pero preferiblemente es un mamífero, que puede ser un ser humano. Si el vector contiene un gen de anticuerpo u otro tratamiento vacunal, se puede administrar a través de inyección en el músculo y puede proporcionar protección inmunológica contra enfermedades que incluyen VIH, gripe, malaria, tétanos, sarampión, paperas, rubeola, HPV, pertussis o cualquier otra vacuna. El vector se puede empaquetar, aislar y purificar y puede transducir una célula madre de cualquier tipo con la al menos una secuencia nucleotídica terapéutica. El vector también puede transducir un transgén o soportar genes correctores endógenos al sujeto y/o a los otros sujetos de la misma especie.

"AAV" es un virus adenoasociado. El término se puede usar para referirse al virus o sus derivados, subtipos de virus y formas presentes en la naturaleza y recombinantes, a menos que se indique otra cosa. El AAV tiene más de 100 subtipos diferentes, que se denominan AAV-1, AAV-2, etc., e incluye AAV tanto humanos como no derivados de seres humanos. Existe aproximadamente una docena de serotipos de AAV. Los diversos subtipos de AAVs se pueden usar como virus de transferencia génica recombinantes para transducir muchos tipos de células diferentes.

"Recombinante", según se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligación, y otros procedimientos que dan como resultado una construcción que es distinta de un polinucleótido presente en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que comprende un polinucleótido recombinante, incluyendo réplicas de la construcción polinucleotídica original y la descendencia de la construcción viral original. Un "vector de rAAV" se refiere a un vector de AAV recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica de origen distinto al AAV (es decir, un polinucleótido heterólogo a AAV), que habitualmente es una secuencia de interés para la transformación genética de una célula.

Un "virus cooperador" para AAV según se usa en la presente es un virus que permite que el AAV se replique y sea empaquetado por una célula de mamífero. Virus cooperadores para AAV son conocidos en la técnica, e incluyen, por

ejemplo, adenovirus (tales como Adenovirus tipo 5 del subgrupo C), herpesvirus (tales como virus de herpes simples, virus de Epstein-Bar y citomegalovirus) y poxvirus.

El "tejido articular" está comprendido por un número de tejidos incluyendo cartílago, fluido sinovial y células progenitoras y madre maduras que dan lugar a, o son: (i) células productoras de cartílago; (ii) sinoviocitos de tipo I; (iii) sinoviocitos de tipo II; (iv) leucocitos residentes o circulatorios; (v) fibroblastos; (vi) células endoteliales vasculares; y (vii) pericitos.

Un virus con "replicación competente" se refiere a un virus que es infeccioso y capaz de replicarse en una célula infectada. En el caso de AAV, la competencia para la replicación generalmente requiere la presencia de genes de empaquetamiento de AAV funcionales, así como genes de virus cooperadores, tales como adenovirus y virus de herpes simple. En general, los vectores de rAAV son incompetentes para la replicación (también denominados en la presente de replicación defectuosa) debido a que carecen de uno o más genes de empaquetamiento de AAV. En algunas realizaciones, un AAV se puede considerar de replicación defectuosa (o incompetente para la replicación) si el AAV tiene una ausencia esencial de un gen *rep* de AAV y/o un gen *cap* de AAV. En algunas realizaciones, un AAV se puede considerar de replicación defectuosa (o incompetente para la replicación) si el AAV carece de un gen *rep* de AAV y/o un gen *cap* de AAV. En algunos aspectos, una composición que comprende vectores del clado F de AAV o aislados de variantes de AAV es una composición libre de células. Generalmente, la composición está libre de proteínas celulares y/u otros contaminantes y puede comprender elementos adicionales tales como un tampón (p. ej., un tampón de fosfato, un tampón de Tris), una sal (p. ej., NaCl, $MgCl_2$), iones (p. ej., iones magnesio, iones manganeso, iones cinc), un conservante, un agente solubilizante o un detergente (p. ej., un detergente iniónico; dimetilsulfóxido).

También se describe en la presente un casete de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una o más de las cápsides del clado F o aislados de variantes de AAV, en donde la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, más preferiblemente aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente aproximadamente 99% de identidad de secuencia con las secuencias mostradas en la presente memoria descriptiva. El porcentaje de identidad se puede calcular usando cualquiera de un número de programas o métodos de comparación de secuencias tales como the Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988), y programas que ejecutan algoritmos de comparación tales como GAP, BESTFIT, FASTA, o TFASTA (de the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), o BLAST, disponible en el cibersitio de the National Center for Biotechnology Information.

También se describe un casete de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una o más de las cápsides del clado F o los aislados de variantes de AAV, en donde la secuencia está comprendida por porciones de los tres genes que comprenden la proteína de la cápside, V1-V3 (también denominadas VP1-VP3). Por ejemplo, el casete puede comprender V1 procedente de AAVF1 de la cápside, una V2 estándar en comparación con AAV9 hu.14, y V3 procedente de cápsides de AAVF17. Una cápside puede comprender más de uno de cada uno de los componentes del gen de la cápside. Por ejemplo, las cápsides del clado F o las variantes de cápside se pueden seleccionar de cualquiera de las VP1-VP3 (V1-V3) para las secuencias de la cápside indicadas en la presente y se pueden combinar en cualquier orden y en cualquier combinación con la condición de que se alcance la propiedad deseada de transducción incrementada. Por ejemplo, la secuencia de la cápside podría ser VP1A-VP1B-VP2-VP3 (V1A-V1B-V2-V3), VP3-VP1-VP2 (V3-V1-V2) o VP1-VP2-VP3A-VP3B (V1-V2-V3A-V3B).

También se describen en la presente métodos de inmunización de un sujeto. Composiciones que comprenden las cápsides del clado F o variantes de cápside se pueden introducir en un sujeto de un modo que provoque una reacción inmunológica que dé como resultado inmunidad en el sujeto. Las cápsides del clado F o las variantes de cápside pueden estar en la composición solas o como parte de un casete de expresión. Los casetes de expresión (o polinucleótidos) se pueden introducir usando un vector de aporte génico. El vector de aporte génico, por ejemplo, puede ser un vector aviral o un vector viral. Vectores virales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, vectores aportados por el virus Sindbis, vectores retrovirales y vectores lentivirales. Composiciones útiles para generar una respuesta inmunológica también se pueden aportar usando un portador en partículas. Además, estas composiciones pueden estar revestidas, por ejemplo, sobre partículas de oro o volframio y las partículas revestidas se pueden aportar al sujeto usando, por ejemplo, una pistola génica. Las composiciones también se pueden formular como liposomas. El sujeto puede ser un mamífero y, por ejemplo, puede ser un ser humano.

El término "etiqueta de afinidad" se usa en la presente para indicar un segmento polipeptídico que puede estar ligado a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para la ligazón del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para el que esté disponible un anticuerpo u otro agente de unión específica se puede usar como una etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen un tramo de polihistidina, proteína A (Nilsson y cols., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson y cols., Methods Enzymol. 198:3, 1991), glutationa S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67:31, 1988), la etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4, 1985), sustancia P, péptido Flag.TM. (Hopp y cols., Biotechnology 6:1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina, u otro epítopo o dominio de unión antigénico. Véase, en general, Ford y cols., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991, ADNs que codifican etiquetas de afinidad están disponibles de proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.).

Del número de sistemas de purificación con etiquetas de afinidad disponible, los empleados más frecuentemente utilizan etiquetas de polihistidina (His) o glutationa S-transferasa (GST). His se une con buena selectividad a matrices que incorporan iones Ni^{+2}, típicamente inmovilizados con grupos quelantes bien ácido iminodiacético o bien ácido nitrilotriacético. La técnica se conoce como cromatografía de afinidad con metal inmovilizado. La absorción de la proteína etiquetada con His se realiza a pH de neutro a ligeramente alcalino para evitar la protonación y la pérdida de capacidad de unión de los grupos histidinoimidazol débilmente básicos. La elución de la proteína unida está provocada por el desplazamiento con imidazol o condiciones de pH bajo.

También se describen métodos para generar células madre pluripotentes inducidas a partir de células somáticas sin la introducción permanente de ADN extraño. El método implicaba transducir transitoriamente células madre con vectores que comprenden una secuencia nucleotídica de la cápside del clado F o la variante de la cápside según se describe en la presente que codifica una secuencia polipeptídica, o su porción VP1 (V1) o VP3 (V3).

Para estos y otros experimentos, un experto en la técnica sabe cómo modificar y propagar AAV. Por ejemplo, AAV-2 se puede propagar como virus lítico y como un provirus. Para el crecimiento lítico, AAV requiere la coinfección con un virus cooperador. Bien un adenovirus o bien un herpes simple pueden suministrar función cooperadora. Cuando no hay un cooperador disponible, AAV puede persistir como un provirus integrado, que implica la recombinación entre los extremos de AAV y secuencias del hospedador y la mayoría de las secuencias de AAV permanecen intactas en el provirus. La capacidad de AAV para integrarse en ADN del hospedador permite la propagación en ausencia de un virus cooperador. Cuando células que soportan un provirus de AAV se infectan posteriormente con un cooperador, el genoma de AAV integrado se rescata y se produce un ciclo lítico productivo. La construcción de vectores de rAAV que soportan modificaciones particulares y la producción de partículas de rAAV, p. ej., con cápsides modificadas, se describe, p. ej., en Shi y cols. (2001), Human Gene Therapy 12:1697-1711; Rabinowitz y cols. (1999), Virology 265:274-285; Nicklin y cols. (2001), Molecular Therapy 4:174-181; Wu y cols. (2000), J. Virology 74:8635-8647; y Grifman y cols. (2001), Molecular Therapy 3:964-974.

También se describe en la presente una composición farmacéutica que contiene un vector del clado F de AAV o una variante del vector de AAV o una partícula de AAV según se describen en la presente. La composición farmacéutica que contiene un vector del clado F de AAV o una variante del vector o una partícula de AAV, preferiblemente, contiene un excipiente, adyuvante, diluyente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, o una de sus combinaciones. Un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo de una composición, permite que el ingrediente retenga actividad biológica y sin provocar reacciones fisiológicas disruptivas, tales como una reacción inmunitaria no pretendida. Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen agua, solución salina tamponada con fosfato, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua, y agentes humectantes. Las composiciones que comprenden estos portadores se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos tales como los indicados en Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. actual, Mack Publishing Co., Easton Pa. 18042, USA; A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel y cols., 7ª ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe y cols., 3ª ed. Amer. Pharmaceutical Assoc. Estos portadores se pueden formular mediante métodos convencionales y se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar de diferentes modos, p. ej. mediante la administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La composición se puede formular para la administración a un mamífero. La composición se puede formular para la administración a un mamífero a través de inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, transferencia de células autólogas o transferencia de células alogeneicas. La vía de administración, por supuesto, depende, entre otras cosas, del tipo de vector contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico responsable y otros factores clínicos. Como se sabe bien en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, la superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular que se vaya a administrar, el tiempo y la vía de administración, el tipo y la fase de la infección o la enfermedad, la salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente.

Algunos de los vectores del clado F de AAV o variantes de cápside son capaces de soportar expresión transgénica estable a largo plazo *in vivo* después del trasplante de células madre hematopoyéticas transducidas o después del aporte sistémico directo de rAAV.

En ciertos aspectos, un ácido nucleico que comprende las cápsides del clado F o variantes de aislados de la cápside de AAV se puede insertar en el genoma de un nuevo virus, donde en la adición de los genes de la cápside del clado F o las variantes de aislados de la cápside transmite a un tejido u órgano igual o similar tropismos de las cápsides del clado F o los aislados de la cápside de AAV al nuevo virus. Esta terapia génica se puede efectuar usando procedimientos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*; véanse, p. ej., la Pat. EE. UU. Nº 5.474.935; Okada, Gene Ther. 3:957-964, 1996. La terapia génica usando el gen de la cápside del clado F de AAV o la variante de la cápside de AAV implicará típicamente introducir el gen diana in vitro en el nuevo virus, bien solo o bien con otro gen destinado a propósitos terapéuticos. Si el gen trópico se introduce con uno o más genes adicionales, preferiblemente los polipéptidos resultantes se administran con propósitos terapéuticos en el tejido para el que tiene un tropismo la cápside

del clado F o el aislado de AAV. A continuación, el virus se puede administrar a un paciente que necesite esta terapia o se puede administrar *ex vivo*, tal como a un órgano en espera de un trasplante. El virus puede ser un retrovirus, un virus de ARN, un virus de ADN tal como un vector adenoviral, un vector de virus adenoasociado, un vector de virus vacunal, un vector de herpesvirus, y similares. También se contempla un método de transfección que usa un liposoma para la administración en el que está encapsulado el nuevo vector viral.

Se describen en la presente estuches que comprenden uno o más vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV descritos en la presente o sus composiciones o formulaciones. Los uno o más vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV en los estuches se pueden usar para la edición genómica de una célula. El estuche se puede usar como una herramienta de estudio para investigar el efecto de la edición genómica por los uno o más vectores del clado F de AAV o variantes de vectores de AAV.

Otros aspectos de la divulgación se refieren a un sistema de empaquetamiento para la preparación recombinante de un AAV según se describe en la presente (p. ej., un vector del clado F de AAV o un vector de una variante de AAV) y sus métodos de uso. El sistema de empaquetamiento comprende una secuencia nucleotídica de Rep que codifica una o más proteínas Rep de AAV; una secuencia nucleotídica de Cap que codifica una o más proteínas Cap de AAV de una cápside del clado F de AAV según se describe en la presente; y un genoma de corrección según se describe en la presente, en donde el sistema de empaquetamiento es operativo en una célula para encerrar el genoma de corrección en la cápside para formar un virus adenoasociado.

El sistema de empaquetamiento comprende un primer vector que comprende la secuencia nucleotídica de Rep y la secuencia nucleotídica de Cap, y un segundo vector que comprende el genoma de corrección. Según se usa en el contexto de un sistema de empaquetamiento según se describe en la presente, un "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es un vehículo para introducir ácidos nucleicos en una célula (p. ej., un plásmido, un virus, un cósmido, un cromosoma artificial, etc.).

En el sistema de empaquetamiento, la cápside del clado F de AAV puede comprender al menos una o al menos dos proteínas seleccionadas de VP1 del clado F, VP2 del clado F y VP3 del clado F. En el sistema de empaquetamiento, la cápside del clado F de AAV puede comprender proteínas VP1 del clado F, VP2 del clado F y VP3 del clado F. En el sistema de empaquetamiento, la cápside del clado F de AAV se puede seleccionar del grupo que consiste en AAV9, AAVHSC1, AAVHSC2, AAVHSC3, AAVHSC4, AAVHSC5, AAVHSC6, AAVHSC7, AAVHSC8, AAVHSC9, AAVHSC10, AAVHSC11, AAVHSC12, AAVHSC13, AAVHSC14, AAVHSC15, AAVHSC16, AAVHSC17, AAVHU31 y AAVHU32.

En el sistema de empaquetamiento, la secuencia nucleotídica de Rep puede codificar una proteína Rep de AAV2. En el sistema de empaquetamiento, la proteína Rep de AAV2 codificada puede ser al menos una de Rep 78/68 o Rep 68/52. En el sistema de empaquetamiento, la secuencia nucleotídica que codifica la proteína Rep de AAV2 puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene un porcentaje de identidad de secuencia mínimo con la secuencia de aminoácidos de Rep de AAV2 de SEQ ID NO:40, en donde el porcentaje de identidad de secuencia mínimo es al menos 70% (p. ej., al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99% o 100%) a lo largo de la longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteína Rep de AAV2.

Secuencia de aminoácidos de Rep de AAV2 ejemplar (SEQ ID NO: 40) -

mpgfyeivikvpsdldehlpgisdsfvnwvaekewelppdsdmdlnlieqapltvaeklqrdfltewrrvskapealffv

qfekgesyfhmhvlvettgvksmvlgrflsqirekliqriyrgieptlpnwfavtktrngagggnkvvdecyipnyllpktqpelq

wawtnmeqylsaclnlterkrlvaqhlthvsqtqeqnkenqnpnsdapvirsktsarymelvgwlvdkgitsekqwiqedqas

yisfnaasnsrsqikaaldnagkimsltktapdylvgqqpvedissnriykilelngydpqyaasvflgwatkkfgkrntiwlfgpa

ttgktniaeaiahtvpfygcvnwtnenfpfndcvdkmviwweegkmtakvvesakailggskvrvdqkckssaqidptpvivt

sntnmcavidgnsttfehqqplqdrmfkfeltrrldhdfgkvtkqevkdffrwakdhvvevehefyvkkggakkrpapsdadis

epkrvresvaqpstsdaeasinyadryqnkcsrhvgmnlmlfpcrqcermnqnsnicfthgqkdclecfpvsesqpvsvvkka

yqklcyihhimgkvpdactacdlvnvdlddcifeq

En el sistema de empaquetamiento, el sistema de empaquetamiento puede comprender además un tercer vector, p. ej., un vector de virus cooperador. El tercer vector puede ser un tercer vector independiente, integral con el primer vector, o integral con el segundo vector. En algunas realizaciones, el tercer vector comprende genes que codifican proteínas del virus cooperador.

En el sistema de empaquetamiento, el virus cooperador se puede seleccionar del grupo que consiste en adenovirus, herpesvirus (incluyendo virus del herpes simple (HSV)), poxvirus (tal como virus vacunal), citomegalovirus (CMV) y baculovirus. En el sistema de empaquetamiento, cuando el virus cooperador es adenovirus, el genoma adenoviral puede comprender uno o más genes de ARN adenoviral seleccionados del grupo que consiste en E1, E2, E4 y VA. En el sistema de empaquetamiento, cuando el virus cooperador sea HSV, el genoma de HSV puede comprender uno o más genes de HSV seleccionados del grupo que consiste en UL5/8/52, ICPO, ICP4, ICP22 y UL30/UL42.

En el sistema de empaquetamiento, el primer, el segundo y/o el tercer vector puede estar contenido dentro de uno o más plásmidos de transfección. El primer vector y el tercer vector pueden estar contenidos dentro de un primer plásmido de transfección. El segundo vector y el tercer vector pueden estar contenidos dentro de un segundo plásmido de transfección.

En el sistema de empaquetamiento, el primer, el segundo y/o el tercer vector pueden estar contenidos dentro de uno o más virus cooperadores recombinantes. El primer vector y el tercer vector pueden estar contenidos dentro de un virus cooperador recombinante. El segundo vector y el tercer vector pueden estar contenidos dentro de un virus cooperador recombinante.

También se describe en la presente un método para la preparación recombinante de un AAV según se describe en la presente (p. ej., un vector del clado F de AAV o un vector de una variante de AAV), en donde el método comprende transfectar o transducir una célula con un sistema de empaquetamiento como el descrito bajo condiciones operativas para encerrar el genoma de corrección en la cápside para formar el AAV según se describe en la presente (p. ej., un vector del clado F de AAV o un vector de una variante de AAV). Métodos ejemplares para la preparación recombinante de un AAV incluyen transfección transitoria (p. ej., con uno o más plásmidos de transfección que contienen un primer y un segundo y opcionalmente un tercer vector según se describe en la presente), infección viral (p. ej. con uno o más virus cooperadores, tales como un adenovirus, poxvirus (tal como virus vacunal), herpesvirus (incluyendo virus del herpes simple (HSV), citomegalovirus o baculovirus, recombinantes que contienen un primer y un segundo y opcionalmente un tercer vector según se describe en la presente), y transfección o infección de una línea celular productora estable (p. ej., con una célula productora estable, tal como una célula de mamífero o insecto, que contiene una secuencia nucleotídica de Rep que codifica una o más proteínas de Rep de AAV y/o una secuencia nucleotídica de Cap que codifica una o más proteínas Cap de AAV de una cápside del clado F de AAV según se describe en la presente, y aportándose un genoma de corrección según se describe en la presente en la forma de un plásmido de transfección o un virus cooperador recombinante).

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar diversas realizaciones de la divulgación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Edición genómica mediada por variantes de vectores del clado F de AAV en una línea de células madre hematopoyéticas humanas CD34+ o una línea celular K562

Se realizó una edición genómica a través de una inserción específica para un sitio o una integración dirigida de secuencias de ADN específicas usando vectores de AAVF (AAVHSC) sin el uso de una nucleasa exógena en líneas celulares hematopoyéticas CD34+ humanas procedentes de donantes sanos o la línea celular K562, que es una línea celular eritroleucémica CD34+. Se construyó un grupo de vectores de AAV recombinantes donantes, ITR-AAVS1-FP, y se usó para integrar un transgén en el locus AAVS1 en el cromosoma 19, el sitio de integración de AAV silvestre natural (Kotin, 1992; Giraud, 1994). Se mostró previamente que el locus AAVS1 en el cromosoma 19 qter13.3-13.4 era un sitio de "puerto seguro" para la inserción de transgenes ya que los genes insertados aquí se expresan sin consecuencias patógenas, lo que es similar a AAV silvestre que se integra en este locus sin consecuencias patógenas (Giraud, 1994; Linden, 1996A; Linden 1996B). El transgén que se va a integrar era un gen de proteína fluorescente amarilla Venus ("YFP" o "FP"), que estaba flanqueado en cada lado por aproximadamente 800 nucleótidos que tienen homología con el locus AAVS1 en el cromosoma 19 humano (véase el esquema de la Figura 3). El vector de AAV donante se diseñaba de modo que el transgén no tuviera promotor y solamente se expresaría si estaba integrado en el locus correcto, que estaría aguas abajo de secuencias reguladoras codificadas cromosómicamente (véase la Figura 4). Así, cualquier expresión del transgén YPF Venus que se produjera estaba bajo el control de un promotor cromosómico situado en o cerca de AAVS1.

El vector donante, ITR-AAVS 1-FP, se empaquetó en cápsides de AAVHSC según el método de empaquetamiento de AAV estándar descrito en Chatterjee y cols, 1992. Específicamente, ITR-AAVS 1-FP se empaquetó en cápsides de AAVHSC7, AAVHSC15 o AAVHSC17 formando el vector AAVHSC-AAVS 1-FP pseudotipado (es decir, una variante del vector de AAV). Líneas de células madre hematopoyéticas CD34+ humanas o células K562 se transdujeron con el AAVHSC-AAVS1-FP pseudotipado a diferentes multiplicidades de infección (MOI) (es decir, MOI 50.000; MOI 100.000; MOI 200.000; MOI 300.000 y MOI 400.000).

La integración del transgén YFP en el locus AAVS1 mediante recombinación homóloga se ensayó inicialmente mediante análisis citofluorométrico de la expresión de YFP en células K562 transducidas. La integración dirigida

usando el vector AAVHSC7 FP daba como resultado la expresión del transgén de YFP 24 horas después de la transducción (Figuras 5 y 7A) y 72 horas después de la transducción (Figuras 6 y 7B). Adicionalmente, a medida que se incrementaba la MOI del vector AAVHSC7 FP, también se incrementaba el porcentaje medio de expresión de YFP (Figuras 7A y B).

La integración dirigida del transgén de YFP se confirmó adicionalmente mediante amplificación por PCR del genoma editado usando cebadores situados fuera de las regiones de homología. Brevemente, se extrajo ADN de células K562 transducidas a una MOI de 100.000 genomas de vector/célula con vector AAVHSC7 FP. La amplificación por PCR se realizó usando los cebadores de la "región cebadora directa FUERA" y la "región cebadora inversa FUERA" (véase la Figura 4). La integración del transgén de YFP daba como resultado un incremento en el tamaño del locus AAVS1 desde el tamaño silvestre de ~1,9 kb hasta el transgén de YFP que contenía un fragmento de -3,1 kb (véase la Figura 4, compárese la línea marcada "Fragmento 1" con la línea marcada "Fragmento 2"). La amplificación del fragmento de -3,1 kb que contenía el transgén de YFP dentro del locus AAVS1 del cromosoma 19 indicaba que el transgén de YFP estaba eficazmente integrado en el locus AAVS1 en células transducidas con el vector AAVHSC7 FP (véanse las Figuras 8A y 8B, carril 4).

EJEMPLO 2: Edición genómica mediada por variantes de vectores de AAV en células madre de sangre periférica CD34+ humanas primarias

La edición genómica a través de una inserción específica para un sitio o una integración dirigida de secuencias de ADN específicas usando vectores AAVHSC sin el uso de una nucleasa exógena también se realizó en células madre hematopoyéticas humanas derivadas de sangre periférica (PBSCs) primarias CD34+ humanas. Brevemente, el vector, ITR-AAVS 1-FP, se empaquetó en cápsides de AAVHSC incluyendo AAVHSC7, AAVHSC12, AAVHSC15 y AAVHSC17 (véase Chatterjee, 1992 para el método de empaquetamiento de AAV estándar). Las células CD34+ primarias se transdujeron con el vector AAVHSC-AAVS 1-FP pseudotipado (es decir, una variante del vector de AAV) con MOIs de 100.000 y 150.000.

La integración del transgén de YFP en el locus AAVS1 locus mediante recombinación homóloga se ensayó mediante el análisis citofluorométrico de la expresión de YFP. La integración dirigida usando los vectores AAVHSC7 FP y AAVHSC17 FP en células CD34+ primarias daba como resultado la expresión del transgén de YFP 1 día después de la transducción con una MOI de 150.000 (Figura 9), 4 días después de la transducción con una MOI de 100.000 (Figura 10), y 18 días después de la transducción con una MOI de 100.000 (Figura 11). El porcentaje de células positivas que expresan YFP a las 5,5 semanas después de la transducción con una MOI de 100.000 (39 días) no disminuía (véanse las Figuras 12A y B, compárense los resultados a los 20 días con los resultados a los 39 días). Esta expresión a largo plazo de un transgén de YFP sin promotor en una población celular que se divide indica la integración exacta del transgén.

La integración dirigida del transgén de YFP se confirmó adicionalmente mediante análisis por PCR. El genoma editado se amplificó usando cebadores que amplifican la región de conexión 5' entre la secuencia transgénica insertada y la secuencia de la rama de homología 5' cromosómica natural (véase la Figura 4, véase la línea marcada "Fragmento 3"). Brevemente, se extrajo ADN de células CD34+ primarias transducidas con una MOI de 150.000 genomas del vector/célula con el vector AAVHSC7 FP. La amplificación por PCR se realizó usando los cebadores de la "región cebadora directa FUERA" y el "cebador inverso DENTRO" (véase la Figura 4). La amplificación de un fragmento de -1,7 kb de la región de conexión 5' para células CD34+ primarias transducidas indicaba que el transgén de YFP estaba satisfactoriamente integrado en el locus AAVS1 (véase la Figura 13, carril 5). Mientras tanto, no existía producto amplificado para las células que no se transducían con el vector AAVHSC7 FP (véase la Figura 13, carril 3).

La integración dirigida del transgén de YFP se confirmó adicionalmente mediante análisis de secuencias de diferentes porciones del locus AAVS1 editado. La secuenciación se realizó empezando cerca de la "región cebadora directa FUERA" (véase la Figura 14), cerca de la rama de homología 5' (véase la Figura 15), cerca de la región 5' de los elementos reguladores (véase la Figura 16), cerca de la región 3' de los elementos reguladores (véase la Figura 17), cerca de la región 5' del transgén (véase la Figura 18) y cerca de la región "cebadora inversa DENTRO" (véase la Figura 19). Los resultados de la secuenciación indicaban que el gen YFP estaba presente y se integraba satisfactoriamente en el locus AAVS1.

Según se proporciona en los Ejemplos 1 y 2, los vectores AAVHSC mediaban satisfactoriamente en la edición genómica dirigida eficaz en líneas celulares hematopoyéticas CD34+ humanas y PBSCs CD34+ sin la necesidad de la adición de endonucleasas exógenas. Los vectores AAVHSC eran capaces de dirigir la integración del transgén de YFP al locus AAVS1 en el cromosoma 19 basándose en las ramas de homología de flanqueo correspondientes al locus AAVS1. Se ha presentado previamente la transgénesis mediada por AAV; sin embargo, las frecuencias presentadas han sido bajas, habitualmente del orden de 1 en 1e6 células a 1 en 1e4 células. Según se muestra en la presente, la edición genómica dirigida usando vectores AAVHSC se producía a frecuencias de aproximadamente 10% de células primarias a largo plazo, que es de 1.000 a 100.000 veces más eficaz que las presentadas previamente (véase, p. ej., Khan, 2011). La expresión del transgén de YFP en líneas celulares hematopoyéticas CD34+ humanas se observó tan temprano como un día después de la transducción y se confirmó el día tres. La expresión del transgén

de YFP en PBSCs se observó partiendo del día uno y continuó a largo plazo (hasta casi 6 semanas), que era el último momento analizado. No se observó una toxicidad excesiva como resultado de la transducción de vectores AAVHSC. Basándose en la alta frecuencia de inserción, la facilidad de uso y la falta de toxicidad observadas, las terapias basadas en la edición genómica dirigida usando vectores de AAVHSC son prácticas y factibles.

EJEMPLO 3: Manipulación genómica *in vivo* con variantes de vectores de AAV.

Vectores de AAVHSC que codifican luciferasa y vectores de AAVHSC que codifican Venus se inyectaron en ratones inmunodeficientes adultos previamente xenoinjertados con HSCs CD34+ de sangre de cordón umbilical humano. Según se muestra posteriormente, la inyección intravenosa de vectores de AAVHSC daba como resultado la transducción de células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ humanas *in vivo*, y los vectores de AAVHSC inyectados intravenosamente viajaban hasta sitios de hematopoyesis humana y células humanas transducidas.

Métodos. Brevemente, ratones adultos NOD/SCID inmunodeficientes se irradiaron en primer lugar con una dosis subletal de 350cGy a partir de una fuente de ^{137}Cs. En segundo lugar, un millón de células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano se inyectó en los ratones NOD/SCID inmunodeficientes irradiados subletalmente. Posteriormente, dos horas después del trasplante de HSC CD34+, se les inyectaron intravenosamente a los ratones aproximadamente 1E11 - 5e11 partículas de vector de AAVHSC-luciferasa (bien vector de AAVHSC7-luciferasa o bien vector de AAVHSC17-luciferasa). Estos vectores se usaron en ausencia de una nucleasa exógena. Los vectores de AAVHSC-luciferasa codifican el gen de luciferasa de luciérnaga monocatenario (ssLuc) bajo el control del promotor de CBA ubicuo para permitir la comprobación bioluminiscente *in vivo* en serie de la expresión transgénica. Estos vectores se describen específicamente en la Publicación de EE. UU. Número 20130096182A1 y en Smith *y cols*. (véase Smith, 2014). El vector de AAVHSC-luciferasa se pseudotipó en la variante de la cápside de HSC7 (la secuencia polinucleotídica de la cápside de HSC7 se proporciona como SEQ ID NO: 27 y la secuencia polipeptídica de la cápside de HSC7 se proporciona como SEQ ID NO:8 (véase la Figura 1)) o la variante de la cápside de HSC17 (la secuencia polinucleotídica de la cápside de HSC17 se proporciona como SEQ ID NO: 35 y la secuencia polipeptídica de la cápside de HSC17 se proporciona como SEQ ID NO: 13 (véase la Figura 1)) según se describe en la Publicación de Patente de EE. UU. Número 20130096182A1 y Smith *y cols*, para formar el vector de AAVHSC7-luciferasa y el vector de AAVHSC17-luciferasa (véase Smith, 2014) (véase Chatterjee, 1992 para el método de empaquetamiento de AAV estándar). Nótese que los vectores de AAVHSC-luciferasa pueden transducir células tanto de ratón como humanas. Sin embargo, en contraste con la Venus codificada en el vector de AAVHSC-Venus descrito posteriormente, la luciferasa no se integraba en AAVS1. En cambio, la luciferasa se puede integrar aleatoriamente o permanecer episómica.

De dos a siete días después de la inyección con el vector de AAVHSC-luciferasa, a los ratones se les inyectaron aproximadamente 1E11 - 5e11 partículas de vectores de AAVHSC-Venus. Específicamente, a los ratones a los que se inyectaba en primer lugar vector de AAVHSC7-luciferasa se les inyectó vector de AAVHSC7-Venus y a los ratones a los que se inyectaba en primer lugar vector de AAVHSC17-luciferasa se les inyectó vector de AAVHSC17-Venus. El vector donante de Venus usado se describe específicamente en los Ejemplos 1 y 2 anteriores. El vector de AAV donante se diseñó de modo que el transgén de Venus no tuviera promotor y solo se expresaría si estaba integrado en el locus AAVS1 correcto, que estaría aguas abajo de las secuencias reguladoras codificadas cromosómicamente (véanse las Figuras 3 y 4). Así, cualquier expresión del transgén Venus que se produjera estaba bajo el control de un promotor cromosómico situado en o cerca de AAVS1. De formas importante, el vector que contiene el gen Venus no contiene un promotor para conducir la expresión. El gen Venus solo se expresará si está integrado correctamente en AAVS1 en células humanas, aguas abajo de un promotor cromosómico endógeno. El vector donante, ITR-AAVS1-Venus (véase la Figura 3), se empaquetó en cápsides de AAVHSC según el método de empaquetamiento de AAV estándar descrito en Chatterjee y cols, 1992. El vector se pseudotipó en la variante de la cápside HSC7 (la secuencia polinucleotídica de la cápside de HSC7 se proporciona como SEQ ID NO: 27 y la secuencia polipeptídica de la cápside de HSC7 se proporciona como SEQ ID NO:8 (véase la Figura 1)) o la variante de la cápside HSC17 (la secuencia polinucleotídica de la cápside de HSC17 se proporciona como SEQ ID NO: 35 y la secuencia polipeptídica de la cápside de HSC17 se proporciona como SEQ ID NO:13 (véase la Figura 1)) para formar el vector AAVHSC7-Venus y el vector AAVHSC17-Venus.

Finalmente, la expresión de luciferasa *in vivo* se midió 4 semanas después de la inyección. Seis semanas después de la inyección, se midió el injerto de células CD34+ y CD45+ humanas y se cuantificó la expresión de Venus. Véase la Figura 20 para un esquema global de los experimentos realizados en este Ejemplo.

Resultados. Cuatro semanas después de la inyección, se realizó la obtención de imágenes *in vivo* sobre ratones xenotrasplantados y no xenotrasplantados que recibían inyecciones intravenosas de vectores de AAVHSC-luciferasa. Los resultados mostraban una expresión de luciferasa específica en vertebras, bazo, caderas y huesos largos, que son todos sitios de hematopoyesis después del trasplante (véase la Figura 21A). Sin embargo, no se observaba expresión de luciferasa específica en órganos hematopoyéticos en ratones que no eran xenoinjertados previamente con HSCs CD34+ de sangre de cordón umbilical humano (véase la Figura 21B). Estos resultados indican que vectores de AAVHSC inyectados intravenosamente viajan hasta sitios *in vivo* de hematopoyesis humana y preferentemente transducen células madre y progenitoras.

Seis semanas después de la inyección con los vectores de AAVHSC-Venus, se analizaron células CD34+ y CD45+ humanas usando citometría de flujo. Los resultados indican que las células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano inyectadas injertadas en los ratones y daban lugar a células sanguíneas más maduras. Específicamente, se observaron células progenitoras sanguíneas humanas primitivas (es decir, células CD34+) en la médula ósea (véase la Tabla 1, células CD34+ y médula femoral). Adicionalmente, las células sanguíneas mononucleares humanas (es decir, células CD45+) eran evidentes en la médula femoral, la médula vertebral y el bazo según se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Injerto de células sanguíneas humanas en ratones inmunodeficientes

AAVHSC7			
Tipo de célula	Médula femoral	Médula vertebral	Bazo
CD45+	68,4	30,4	24,3
CD34+	22	NT*	NT
AAVHSC 17			
Tipo de célula	Médula femoral	Médula vertebral	Bazo
CD45+	46,6	24	18,3
CD34+	13,1	NT	NT
*NT= No testado			
Células CD45+: células sanguíneas mononucleares humanas			
Células CD34+: células progenitoras hematopoyéticas humanas			

Seis semanas después de la inyección, se usó citometría de flujo para analizar la expresión de Venus desde HSCs humanas de ratones xenotrasplantados que recibían inyecciones intravenosas de vectores bien AAVHSC7-Venus o bien AAVHSC17-Venus. Los resultados revelaban que se observaba fácilmente una transducción de AAVHSC en las HSCs humanas CD45+ así como HSC humanas CD34+ desde la médula femoral y vertebral (véanse la Tabla 2 y las Figuras 22A-F).

Tabla 2: Porcentaje de células hematopoyéticas humanas injertadas que expresan Venus

AAVHSC7			
Tipo de célula	Médula femoral	Médula vertebral	Bazo
CD45+	8,35	15,3	10,3
CD34+	9,23	NT*	NT
AAVHSC 17			
Tipo de célula	Médula femoral	Médula vertebral	Bazo
CD45+	8,59	70,2	9,9
CD34+	8,92	NT	NT
*NT= No testado			
Células CD45+: células sanguíneas mononucleares humanas			
Células CD34+: células progenitoras hematopoyéticas humanas			

Adicionalmente, las células CD45+ humanas del bazo mostraban fácilmente evidencia de transducción ya que Venus se expresaba en estas células (véanse la Tabla 2 y las Figuras 22G y H). Esto demuestra que las células CD45+ que surgen de las células CD34+ de sangre del cordón umbilical humano trasplantadas expresan Venus. Estos resultados indican que la inyección intravenosa de vectores de AAVHSC *in vivo* da como resultado la transducción de células hematopoyéticas humanas.

EJEMPLO 4: Inserción de elementos de edición grandes y pequeños en un genoma usando vectores del clado F de AAV

Métodos. Producción, purificación y valoración de rAAV. Todos los genomas de direccionamiento se clonaron en un esqueleto de AAV2 usando New England Biolabs Gibson Assembly Cloning Kit con cebadores diseñados usando NEBuilder v.1.6.2 (Ipswich, MA). Todos los genomas de direccionamiento se secuenciaron y la integridad de ITR de

AAV2 se confirmó usando digestión con restricción y secuenciación. Los genomas de direccionamiento monocatenarios se empaquetaron en las cápsides de AAVF en células 293 infectadas con virus de herpes simple (HSV). Los vectores de AAV recombinante resultantes se purificaron a través de dos rondas de gradientes de centrifugación de densidad de $CsCl_2$ y los títulos se determinaron usando qPCR con cebadores y sonda específicos para el transgén.

Transducciones de K562, HepG2 y PBSC. La línea celular de leucemia mielógena crónica (CML), K562 y la línea celular de carcinoma hepatocelular HepG2 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) y se cultivaron según las directrices del ATCC. Células madre de sangre periférica (PBSCs) se purificaron de células mononucleares de PB cebada con citocina de donantes sanos usando estuches de aislamiento indirecto CD34+ (Miltenyi Biotech) y se realizaron transducciones inmediatamente después del aislamiento. Las PBSCs se cultivaron en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) (Irvine Scientific) que contenía 20% de FCS, 100 ug/m l de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, 2 mmol/l de L-glutamina, IL-3 (10 ng/ml; R&D Systems), IL-6 (10 ng/ml; R&D Systems) y factor de células madre (1 ng/ml; R&D Systems. Las células HepG2 se dividieron y se sembraron aproximadamente 24 horas antes de las transducciones. Las células K562 se sembraron inmediatamente antes de las transducciones. K562s, HepG2s o PBSCs se transdujeron con vectores de direccionamiento de AAVF a MOIs que variaban de 5E4 a 4E5. Las células se transdujeron y la recombinación homóloga se alcanzó en ausencia de una nucleasa exógena. Las células se recolectaron para el análisis del flujo y molecular en momentos entre los días 1 a 39 después de la transducción. El marcaje con BrdU de transducciones in vitro se realizó antes de la recolección usando el APC BrdU Flow Kit (BD Biosciences) según las instrucciones.

TI PCR y secuenciación. Se aisló ADN de alto peso molecular de K562s, HepG2s o PBSCs transducidas con vectores de direccionamiento de AAVF. Se realizó PCR específica para TI usando un cebador que se hibrida a la región cromosómica fuera de las ramas de homología, cebador directo Sigma AAVS1 (5' - GGC CCT GGC CAT TGT CAC TT - 3') y un cebador que se hibrida a un casete insertado, bien el cebador inverso Venus (5' - AAC GAG AAG CGC GAT CAC A - 3') o bien el cebador inverso RFLP HindIII (5' - CCAATCCTGTCCCTAGTAAAGCTT - 3'). Se usó el sistema de PCR Expand Hifidelity de Roche (Indianapolis, IN) y condiciones de ciclación como sigue: 1 ciclo, 5 minutos - 95°C; 15 ciclos, 30 segundos - 95°C, 30 segundos – empiécese en 62°C y redúzcase en 0,5°C por ciclo, 2 minutos - 68°C; 20 ciclos, 30 segundos - 95°C, 30 segundos - 53°C, 2 minutos - 68°C; 1 ciclo, 5 minutos - 68°C. Los productos de PCR se purificaron por PCR para la secuenciación directa usando el estuche de purificación por PCR Qiaquick (Qiagen) o se clonaron usando el estuche de clonación TOPO TA para secuenciación y los clones se secuenciaron mediante secuenciación de Sanger (Life Technologies).

Trasplante de células CD34+. Todo el cuidado y los experimentos en animales se realizaron usando protocolos aprobados por un comité institucional para el cuidado y el uso de animales. Ratones NOD.CB17-Prkdcscid/NCrCrl (NOD/SCID) macho de 6-8 semanas de edad se mantuvieron en una instalación libre de patógenos específica. Los ratones se trataron con antibiótico pediátrico oral sulfametoxazol/trimetoprim (Hi-Tech Pharmacal (Amityville, NY), 10 ml/500 ml de H_2O) durante al menos 48 horas antes del trasplante. Los ratones fueron irradiados con una dosis subletal de 350 cGy a partir de una fuente 137Cs y se dejó que se recuperaran durante un mínimo de 4 horas antes del trasplante. Células CD34+ de sangre del cordón umbilical (CB) se aislaron usando estuches de aislamiento indirecto de CD34+ (Miltenyi Biotech). 1 X 10^6 células CB CD34+ se resuspendieron en aproximadamente 200 ul y se trasplantaron mediante inyección en la vena caudal. De 2,4E11 a 6,0E11 partículas de vectores de direccionamiento de AAVF se inyectaron intravenosamente a través de la vena caudal a las 1 o 7 semanas después del trasplante de CB CD34+. Se recogieron médula ósea (BM) femoral, BM vertebral y bazo 6, 7 o 19 semanas después del trasplante.

Análisis citométrico de flujo. Se analizaron las transducciones in vitro para la integración mediada por vectores de direccionamiento de AAVF, y BrdU y 7-AAD usando un citómetro de flujo Cyan ADP (Dako). La fluorescencia específica se cuantificó después de la sustracción de la autofluorescencia. La expresión *in vivo* del casete fluorescente integrado en células CD34+ y eritroides se analizó en BM vertebral, BM femoral y bazo recogidos de ratones xenoinjertados al teñir con anticuerpos específicos humanos, anti-CD34 conjugado a APC y glicoforina A conjugada a PE, y controles de IgG conjugada a PE y APC (BD Biosciences) en un FACS Aria SORP (BD Biosciences). Los datos de citometría de flujo se analizaron usando el programa FlowJo (Treestar).

Resultados. Se observó que AAV derivados de células madre cartografiaban el clado F de AAV basándose en la homología de secuencias nucleotídicas de los genes de la cápside (Figura 23, Smith y cols, Mol Ther. 2014 Sep;22(9):1625-34). Estos AAV derivados de células madre se denominaron AAVHSC1-17. Estos AAV también se denominan en la presente AAVF1-17, respectivamente.

Un genoma de un vector de AAV monocatenario se usó para diseñar un genoma de corrección que contiene ramas de homología y un inserto grande (Figura 24). El inserto contenía un marco de lectura abierto (ORF) de Venus sin promotor aguas abajo de un aceptor de empalme (SA) y una secuencia 2A (2A) para permitir la expresión de proteínas independiente. Venus es una variante de la proteína fluorescente amarilla (véase, p. ej., Nagai y cols. Nat Biotechnol, 2002, 20(1): 87-90). Las ramas de homología (HA) izquierda y derecha tenían cada una longitud de 800 pb y eran complementarias a secuencias del intrón 1 del PPP1R12C humano situado en el locus AAVS1 en el cromosoma 19 (Figura 25). Un genoma de vector de AAV monocatenario similar se diseñó con un inserto de 10 pb entre las dos

ramas de homología (Figura 35). El locus AAVS1 se considera un sitio de “puerto seguro” para la inserción de transgenes heterólogos.

Las ramas de homología, el marco de lectura abierto y las secuencias reguladoras se clonaron entre repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV2. A continuación, este genoma de corrección se empaquetó (pseudotipó) en diferentes cápsides de AAV, incluyendo AAVHSC, AAV8, 9, 6 y 2. A continuación, se usaron virus recombinantes para aportar el genoma de edición a los núcleos de células diana. Células diana probadas incluían líneas celulares de eritroleucemia CD34+, líneas celulares hepáticas y células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+ humanas primarias, así como su descendencia hematopoyética.

Vectores de AAVF que contenían el ORF de Venus, precedido por y flanqueado por ramas de homología complementarias al intrón 1 de los genes PPP1R12C humanos, se usaron para aportar el genoma de edición a células madre de sangre periférica cebadas con citocina CD34+ humanas primarias (Figura 26A), K562, una línea celular de eritroleucemia CD34+ humana (Figura 26B) y HepG2, una línea celular hepática humana (Figura 26C). Las células CD34+ primarias soportaban el nivel más alto de edición, hasta 60% (Figuras 26A-F). Líneas celulares inmortalizadas, incluyendo K562 y HepG2, también mostraban niveles de edición significativos. En todos los casos, el nivel de edición alcanzado era consecuentemente significativamente superior que el alcanzado con virus que no son del clado F, incluyendo AAV6 y AAV8 (Figura 26A-F y Figura 36).

En otro experimento, ADN extraído de células madre de sangre periférica (PBSC) CD34+ cebadas con citocina transducidas con vectores AAVF7, AAVF15 o AAVF17 se amplificó con un cebador específico del cromosoma y un cebador específico del inserto. Los vectores incluían bien un inserto grande (Venus) o bien un inserto corto (10 pb, RFLP). Los geles mostraban que los amplicones de tamaño correcto se amplificaban a partir de las células CD34 editadas (Figura 27, Figura 35 y Figura 36). La presencia de las bandas de 1,7 kb y 1 kb reflejaba una integración dirigida correctamente de insertos grandes y pequeños, respectivamente. La integración dirigida se observaba en momentos tanto a corto como a largo plazo después de editar con vectores de AAVF (Figura 27).

En otro experimento, genomas de vectores de AAV monocatenarios se diseñaron para la inserción de un inserto de 10 pb en el intrón 1 del gen PPP1R12C humano (Figura 28A). Estos vectores incluían una rama de homología izquierda (HA-L) silvestre que contenía un sitio de reconocimiento por la enzima de restricción NheI (GCTAGC). El vector NS mut se diseñó para cambiar la secuencia TA en la rama de homología izquierda en el cromosoma 19 por AT. Este cambio da como resultado la conversión de un sitio NheI en un sitio Sph1, cambiando la secuencia de GCTAGC a GCATGC. La Figura 28B muestra los tamaños relativos de los fragmentos esperados creados al cortar con NheI o Sph1 cuando ADN genómico procedente de células K562 se editaba usando los vectores de AAVF bien silvestre o bien NS Mut. Amplicones reales derivados de ADN genómico de células K562 editados con un vector de AAVF silvestre se digerían con Nhe 1, pero no con Sph1, según se predice (Figura 28C). Los resultados con ADN de K562 amplificado después de editar con vectores AAVF7 o un AAVF17 que codifican genomas bien silvestre o bien NS Mut mostraban que la digestión con NheI ya no daba como resultado la escisión del amplicón, comparable al amplicón procedente de células no editadas. La digestión con Sph1 daba como resultado escisión, demostrando que el sitio NheI en la rama de homología izquierda del cromosoma se reemplazaba por un sitio Sph1 (Figura 28D). La electroforesis de ADN amplificado forma una línea de carcinoma hepatocelular, HepG2, después de editar con vectores AAVF7 o uno AAVF17 que codifican genomas bien silvestre o bien NS Mut mostraba que la digestión con NheI ya no daba como resultado la escisión del amplicón, comparable al amplicón procedente de células no editadas (Figura 28E). La digestión con Sph1 daba como resultado escisión, demostrando que el sitio Nhe1 en la rama de homología izquierda del cromosoma se reemplazaba por un sitio Sph1. El análisis de secuencias confirmaba la edición con vectores silvestre o NS Mut de AAVF7 y AAVF17 (Figura 29). Estos resultados demuestran que tanto AAVF7 como AAVF17 mediaban satisfactoriamente en la sustitución de 2 nucleótidos en las secuencias cromosómicas en dos líneas celulares diferentes. Estos resultados también demuestran la capacidad de vectores de AAVF para mediar en una sustitución de 2 pares de bases en ADN genómico de células humanas, sugiriendo su uso para la corrección de mutaciones causantes de enfermedad o la inducción de nuevas mutaciones en el genoma.

En otro experimento, se probó el requerimiento potencial de la división celular sobre la capacidad de edición de vectores de AAVF sobre PBSC CD34+ humanas sanas. Se incorporó BrdU en PBSC CD34+ humanas transducidas a través de un impulso con 10 µM de BrdU durante 2 horas. Las células CD34+ transducidas con AAVF se recolectaron, se permeabilizaron y se fijaron antes del tratamiento con DNasa. Después del tratamiento con DNasa, las células tratadas se tiñeron con anticuerpo anti-BrdU APC durante 20 minutos. El marcaje con BrdU de células editadas in vitro se realizó antes de la recolección usando el APC BrdU Flow Kit (BD Biosciences) según las instrucciones. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo con respecto a la expresión de Venus, así como el marcaje con BrdU. Los resultados revelaban las frecuencias similares de expresión de Venus en las poblaciones tanto positiva como negativa a BrdU, sugiriendo que no se requería división celular para la edición mediada por AAVF (Figura 30).

En otro experimento, se probó la edición de células madre hematopoyéticas humanas injertadas *in vivo* mediante vectores de AAVF sistémicamente aportados ratones NOD/SCID inmunodeficientes injertados con células madre hematopoyéticas CD34+ de sangre de cordón umbilical humano (Figura 31A y B). Tanto en la médula como en el bazo, se encontró que la mayoría de las células humanas expresaba Venus, mientras que no se observaba expresión

de Venus en células de ratón (Figura 31C, Figura 37 y Figura 38). Puesto que el genoma de ratón no contiene un locus AAVS1 complementario a las ramas de homología, estos hallazgos demuestran la especificidad del direccionamiento génico. De las células humanas analizadas, se observaba expresión de Venus en células progenitoras CD34+ primitivas, así como células eritroides glicoforina A+ maduras tanto en la médula como en el bazo.

En otro experimento, se injertaron ratones con células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano y se inyectó AAVF-Venus por una vía intravenosa bien 1 o bien 7 semanas más tarde. La médula vertebral o femoral o el bazo se recolectó bien 5, bien 6 o bien 13 semanas después de la inyección intravenosa de Venus. Estos representaban tiempos acumulativos posteriores al trasplante de 6, 7 o 20 semanas. Los resultados revelan que la inyección intravenosa de AAVF-Venus da como resultado la edición de las células hematopoyéticas humanas injertadas *in vivo* primitivas (CD34+) así como más maduras diferenciadas (CD45+). Las células del linaje eritroide humano demostraban una edición muy eficaz a largo plazo después del trasplante y la inyección (Figura 32). Se encontró que la edición mediada por AAVF era estable a largo plazo, y era heredada establemente por la descendencia diferenciada de células CD34+ humanas injertadas *in vivo* (Figura 32). La descendencia diferenciada de células CD34+ editadas expresaba Venus a largo plazo (Figura 32).

En otro experimento, se realizó análisis de secuencias para la inserción cromosómica dirigida de un ORF de Venus SA/2A sin promotor en una línea celular de eritroleucemia K562, células CD34+ de sangre periférica cebadas con citocina humanas primarias y una línea celular hepática humana HepG2 (Figura 33). Secuencias integradas específicamente en un sitio se amplificaron usando un cebador específico de un cromosoma y un cebador específico de un inserto. Los resultados revelaban la inserción precisa del Venus SA/2A en la conexión entre las ramas de homología izquierda y derecha en cada caso (Figura 33).

En otro experimento, se realizó análisis de secuencias para la inserción cromosómica dirigida de un inserto de 10 pb en células CD34+ de sangre periférica cebadas con citocina humanas primarias y una línea celular hepática humana HepG2 (Figura 34). Secuencias integradas específicamente en un sitio se amplificaron usando un cebador específico de un cromosoma y un cebador específico de un inserto. Los resultados revelaban la inserción precisa del inserto de 10 pb en la conexión entre las ramas de homología izquierda y derecha en cada caso (Figura 34).

Estos datos muestran que los insertos tanto grande como corto se pueden editar satisfactoriamente en un genoma usando vectores del clado F de AAV y que la integración en el genoma es precisa. Estos datos también muestran que los vectores del clado F de AAV se podrían usar para la edición genómica de alta eficacia en ausencia de una nucleasa exógena.

EJEMPLO 5: Edición del locus PPP1R12c en líneas celulares humanas

Métodos

Para determinar la edición de tipos de células humanas mediante vectores de AAVF, se usaron las siguientes líneas celulares humanas:

Línea celular	**Tipo de tejido**
WI-38	fibroblastos diploides humanos normales
MCF7	línea celular de cáncer de mama humano
Hep-G2	línea celular de carcinoma hepatocelular humano
K562	línea celular eritroleucémica CD34+
Y79	línea celular de retinoblastoma humano
SCID-X1 LBL	línea de células B inmortalizadas con EBV procedente de un paciente SCID-X1

Los vectores de AAVF usados contenían cada uno un genoma de vector que contenía un elemento de edición que codifica un indicador Venus sin promotor. El Venus sin promotor contenía el marco de lectura abierto (ORF) de Venus aguas abajo de un aceptor de empalme (SA) y una secuencia 2A (2A) para permitir la expresión de proteína independiente. Las ramas de homología (HA) izquierda y derecha tenían cada una una longitud de 800 pb y eran complementarias a secuencias del intrón 1 PPP1R12C humano situado en el locus AAVS1 en el cromosoma 19. El locus AAVS1 se considera un sitio de “puerto seguro” para la inserción de transgenes heterólogos. El elemento de edición que contenía las ramas de homología, el ORF de Venus y las secuencias reguladoras se clonaron entre repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV2.

Cultivo celular. Todas las líneas celulares se hicieron crecer en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% a 37°C y se cultivaron como sigue: los linfoblastos SCID-X1 (Coriell) se cultivaron en RPMI1640 (Gibco, nº cat 21875) complementado con 15% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, nº cat 26140); las células K562 (ATCC) se cultivaron en

DMEM (Corning, nº cat 15-017-CVR) complementado con 10% de FBS (Gibco, nº cat 26140) y 1% de L-glutamina (Gibco, nº cat 25030); las células HepG2 (ATCC) se cultivaron en EMEM (ATCC, nº cat 30-2003) complementado con 10% de FBS (Gibco, nº cat 26140); las células MCF-7 (ATCC) se cultivaron en MEM (Gibco, nº cat 11095) complementado con 10% de FBS (Gibco, nº cat 26140), 1% de MEM-aminoácidos no esenciales (Gibco, nº cat 11140), 1% de piruvato sódico (Gibco, nº cat 11360) y 10 µg/ml de insulina recombinante humana (Gibco, nº cat12585-014); los fibroblastos WI-38 (ATCC) y las células HEK293 (ATCC) se cultivaron en MEM (Gibco, nº cat 11095) complementado con 10% de FBS (Gibco, nº cat 26140), 1% de MEM-aminoácidos no esenciales (Gibco, nº cat 11140) y 1% de piruvato sódico (Gibco, nº cat 11360); y las células Y79 (ATCC) se cultivaron en RPMI1640 (Gibco, nº cat A10491) complementado con 20% de FBS (Gibco, nº cat 26140).

Edición mediada por AAVF de líneas celulares humanas. Se sembraron células adherentes el día 0 en 20.000 células/0,1 ml para un formato de 96 pocillos o 20.000 células/0,5 ml para un formato de 24 pocillos. Los recuentos celulares se midieron 24 h más tarde (el día 1) antes de la adición de los vectores de AAVF. Se sembraron células en suspensión el día 1 en 20.000 células/0,1 ml en un formato de 96 pocillos o 20.000 células/0,5 ml en un formato de placa de 24 pocillos. El día 1, los AAVFs se añadieron a las células usando una multiplicidad de infección (MOI) de 150.000 genomas del vector (VG)/célula. Antes de la adición de AAVF, las puntas de pipeta usadas para la transferencia se revistieron con sulfato de protamina (10 mg/ml). Los AAVFs se suspendieron a fondo en un mezclador turbulento a velocidad completa durante 30 segundos inmediatamente antes de la transducción. El volumen de AAVF añadido a las células no superaba 5% del volumen total del pocillo. El día 3, las células se recolectaron (las células adherentes se tripsinizaron suavemente para retirarlas de las placas de cultivo tisular), se lavaron y se analizaron con respecto a la expresión de Venus mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo Intellicyt equipado con un automuestreador Hypercyt. La edición se expresó como el porcentaje de la población celular total que era positiva a Venus menos la fluorescencia de fondo observada en células no transducidas (típicamente menos de 1% de células positivas a Venus). Los experimentos de edición con AAVF se llevaron a cabo sin el uso de una nucleasa exógena.

Resultados

Se observó la edición del locus PPP1R12c humano para todos los AAVF probados y mostraba la selectividad para el tipo de célula (Tabla 3). En general, AAVF5 producía los niveles más altos de edición en cada una de las líneas celulares, desde 12-45% de la población celular total, después de 48 horas de infección. AAVF9 también producía altos niveles de edición génica en las líneas celulares de linfoblastos B (SCID-X1 LBL y K562). AAVF17 producía el nivel más alto de edición génica en fibroblastos diploides humanos normales (células WI-38) bajo estas condiciones. Los vectores AAVF1, AAVF4, AAVF7 producían niveles de edición que eran consecuentemente mayores que los observados en células no transducidas pero que generalmente eran inferiores que los niveles máximos observados con AAVF5, AAVF9 y AAVF17. Estos datos demuestran que los AAVFs tienen un amplio tropismo para tejidos humanos y pueden ser útiles para la edición génica en el hígado, el SNC (p. ej., la retina), fibroblastos tisulares, mama y linfocitos, entre otros.

Tabla 3. Edición de líneas celulares humanas mediante AAVF

	Líneas celulares humanas					
Vector	**K562**	**Hep-G2**	**WI-38**	**Y79**	**MCF7**	**SCID-X1 LBL**
	Porcentaje de células positivas a Venus					
AAVF1	2,06	1,92	1,39	0,7	2,71	0,57
AAVF4	1,36	2,95	6,29	0,35	3,42	0,12
AAVF5	45,32	-	11,85	12,5	20,47	45,02
AAVF7	5,78	3,83	4,87	1,42	3,6	0,94
AAVF9	18,06	-	-	2,46	6,14	6,79
AAVF17	3,18	3,71	17,6	1,29	5,66	0,44

EJEMPLO 6: Edición por AAVF en células humanas primarias

Para determinar la edición de células humanas primarias mediante vectores de AAVF, se usaron cultivos primarios de hepatocitos humanos, células endoteliales sinusoidales hepáticas y mioblastos del músculo esquelético.

Los vectores de AAVF y AAV usados empaquetaban cada uno un genoma de vector que codifica un indicador de Venus sin promotor. El inserto comprendía un marco de lectura abierto (ORF) de Venus aguas abajo de un aceptor de empalme (SA) y una secuencia 2A (2A) para permitir la expresión de proteína independiente. Las ramas de

homología (HA) izquierda y derecha tenían cada una una longitud de 800 pb y eran complementarias a secuencias del intrón 1 de PPP1R12C humano situado en el locus AAVS1 en el cromosoma 19. El locus AAVS1 se considera un sitio de "puerto seguro" para la inserción de transgenes heterólogos. El genoma de corrección que consiste en las ramas de homología, el marco de lectura abierto y las secuencias reguladoras se clonaron entre repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV2.

Métodos

Cultivo celular. Todas las células humanas primarias se cultivaron a 37°C, bajo CO_2 humidificado al 5% en una incubadora de cultivo tisular. Todos los materiales y los componentes de los medios se obtuvieron de Life Technologies a menos que se especifique otra cosa.

Cultivos primarios de hepatocitos humanos se obtuvieron de Invitrogen y se cultivaron sobre placas revestidas con colágeno tipo I según se sugiere por el fabricante. Las células se recuperaron del almacenamiento en nitrógeno líquido en medio de descongelación/siembra [32,5 ml de medio E de William (nº A12176) 1,6 ml de suero bovino fetal, 3,2 ul de dexametasona 10 mM y 0,9 ml de cóctel de siembra A por 35,0 ml de volumen final]. El cóctel de siembra A consistía en 0,5 ml de solución de penicilina (10.000 U/ml)/estreptomicina (10.000 ug/ml) (nº Cat 15140), 0,05 ml de 4,0 mg de insulina recombinante humana/ml (Nº de catálogo 12585-014), 0,5 ml de solución de GlutaMAXTM 200 mM (Nº de catálogo 35050) y 0,75 ml de Hepes 1,0 M, pH 7,4 (Nº de catálogo 15630) por 1,8 ml de volumen final. Los hepatocitos humanos se mantuvieron en medio de mantenimiento que contenía 100 ml de medio E de Williams, 0,001 ml de dexametasona y 3,6 ml de cóctel de mantenimiento B (Nº de catálogo A13448) por 103,6 ml de volumen final.

Se obtuvieron cultivos primarios de mioblastos de músculo esquelético humanos de Lonza y se cultivaron en medio SkGM™ según se describe por el fabricante.

El estuche SkGM™-2 Bullit™ (Lonza, Nº de catálogo CC-3245) contenía 0,5 ml de factor de crecimiento epidérmico humano [hEGF] (nº 0000482653), 0,5 ml de dexametasona (nº 0000474738), 10 ml de L-glutamina (nº 0000474740), 50 ml de suero bovino fetal (nº 0000474741), 0,5 ml de gentamicina/anfotericina-B [GA] (nº 0000474736), en 500 ml de medio SkGM-2 (nº 0000482653).

Cultivos primarios de células endoteliales sinusoidales hepáticas humanas se adquirieron de Creative Bioarray y se cultivaron en medio para células endoteliales SuperCult® y se hicieron crecer sobre un revestimiento basado en gelatina según se describe por el fabricante. El estuche de complemento para medio para células endoteliales SuperCult® (Nº de catálogo ECM-500 Kit) contenía 0,5 ml de VEGF (nº 15206), 0,5 ml de heparina (nº 15250), 0,5 ml de EGF (nº 15217), 0,5 ml de FGF (nº 15204), 0,5 ml de hidrocortisona (nº 15318), 5,0 ml de solución antibiótica-antimicótica (nº 15179), 5,0 ml de L-glutamina (nº 15409), 10,0 ml de complemento para células endoteliales (nº 15604), 50,0 ml de FBS (nº 15310) y 500,0 ml de medio para células endoteliales SuperCult® (nº 15517).

Edición mediada por AAVF de células humanas primarias. Se sembraron hepatocitos primarios humanos el día 0 en 2×10^4 células/0,1 ml para el formato de 96 pocillos o 2×10^4 células/0,5 ml para el formato de 24 pocillos. Se añadieron vectores virales 48 h más tarde el día 2 según se describe posteriormente. Mioblastos de músculo esquelético humano y células endoteliales sinusoidales hepáticas humanas se sembraron el día 1 a 2×10^4 células/0,1 ml en un formato de 96 pocillos o 2×10^4 células/0,5 ml en un formato de 24 pocillos. El día 2, los vectores virales se añadieron a estas células a una multiplicidad de infección (MOI) de 150.000 VG (genomas de vector)/célula (para AAVF5 se usó una MOI de 5×10^4 VG/célula y para AAVF17 se usó una MOI de $2,5 \times 10^4$ VG/célula). Antes de la adición de vector a las células, todas las puntas de pipeta usadas para la transferencia del vector se revistieron son sulfato de protamina (10 mg/ml) y los vectores se mezclaron a fondo mediante turbulencia durante 30 segundos inmediatamente antes de la transducción. El volumen de vector añadido a la células no superaba el 5% del volumen total del pocillo.

El medio de cultivo para los hepatocitos primarios humanos se renovó el día 3. El día 4, las células se recolectaron (las células adherentes se tripsinizaron) y se analizaron con respecto a la expresión de Venus mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo Intellicyt equipado con un automuestreador Hypercyt. La edición se expresó como el porcentaje de la población celular total que era positiva a Venus menos la fluorescencia de fondo observada en células no transducidas (típicamente menos de 1% de células positivas a Venus).

Resultados

Se observó la edición del locus PPP1R12c humano para todos los AAVF probados y mostraba selectividad para el tipo de célula (Tabla 4). En general, AAVF5 daba los niveles más altos de edición en cada una de las poblaciones celulares primarias, desde un mínimo de 2% en hepatocitos humanos hasta de 24% a 35% en mioblastos esqueléticos y células endoteliales sinusoidales hepáticas primarios, respectivamente, después de 48 h de infección. AAVF7 y AAVF17 también producían altos niveles de edición génica en las células endoteliales sinusoidales hepáticas y los mioblastos esqueléticos humanos. Los niveles de edición con los vectores de AAVF en estas células eran de 10 a 50 veces superiores que los observados con AAV2 o AAV6. Los vectores de AAVF producían niveles de edición que eran

consecuentemente mayores que los observados en células no transducidas o células transducidas con un AAV2 o AAV6 que empaqueta el genoma del vector de Venus sin promotor. Se observó poca o ninguna edición bien para AAV2 o bien para AAV6 en estas células. Estos datos en células humanas primarias demuestran que AAVF5, AAVF7 y AAVF17 tienen un amplio tropismo para tejidos humanos y pueden ser útiles para aplicaciones de terapia génica dirigidas al hígado, el músculo esquelético y poblaciones de células endoteliales, entre otros.

Para comparación, cada una de las poblaciones de células humanas primarias también se transdujo con vectores de transferencia de genes de AAVF que empaquetan mCherry bajo el control del promotor de actina beta de pollo (CBA). A continuación, las relaciones de expresión proteínica de Venus/mCherry se usaron para estimar un relación de edición – que refleja la relación del número de células que tienen expresión proteínica detectable en los diversos tipos de células usando vectores de edición génica del experimento (Venus) al número de células que tienen expresión proteínica detectable usando los susodichos vectores de transferencia génica (mCherry) – para AAV6, AAVF5 y AAVF7. Según se muestra en la Tabla 5, la edición génica mediada por AAVF generalmente es más eficaz para la expresión proteínica que el enfoque de transferencia mediado por AAVF correspondiente en las células humanas primarias estudiadas, mientras que la edición génica mediada por AAV6 era sustancialmente igual o ligeramente menos eficaz que la transferencia génica mediada por AAV6 en estas células. Notablemente, como también se muestra en la Tabla 5, la edición génica mediada por AAVF era superior que la observada con la edición génica mediada por AAV6 para las células humanas primarias estudiadas. Estos datos demuestran que la edición génica mediada por AAVF es más eficaz que AAV6 en una variedad de células humanas primarias, y que la edición génica mediada por AAVF se compara favorablemente con enfoques de transferencia génica correspondientes en estas células.

Los vectores de AAVF que empaquetan el indicador mCherry también transducían eficazmente células humanas primarias y mostraban especificidad para el tipo de célula (Tabla 6). Para células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y células endoteliales sinusoidales hepáticas (HSEC), la transducción con AAVF9 producía 38-50% de células positivas a mCherry después de 48 h de infección. AAVF9 también transducía eficazmente mioblastos de músculo esquelético humanos y, en una menor extensión, todos los AAVF probados transducían eficazmente las HSEC bajo estas condiciones (Tabla 6). Sin limitarse por una teoría, es probable que la mayoría, si no toda, la expresión de mCherry en estos estudios represente la expresión episómica del indicador ya que no estaban presentes ramas de homología en los genomas del vector mCherry con expresión era conducida por el promotor CBA.

Tabla 4. Edición mediada por AAVF de células humanas primarias

Vector	**HSEC**	**Hepatocitos**	**SMM**
		Porcentaje de células positivas a Venus	
AAV2	0,34	0,06	0,52
AAV6	0,00	0,00	0,00
AAVF5	34,70	2,00	24,20
AAVF7	18,40	0,62	18,65
AAVF17	21,40	1,37	19,60

Tabla 5. Relaciones de edición de AAVF en células humanas primarias

Vector	**Hepatocitos**		**SMM**	
	Venus/mCherry	AAVF/AAV6	Venus/mCherry	AAVF/AAV6
AAV6	0,84		0,80	
AAVF5	9,42	11,21	14,32	17,90
AAVF7	0,95	1,10	13,05	16,30

Vector	**HSEC**	
	Venus/mCherry	AAVF/AAV6
AAV6	0,60	
AAVF5	5,30	8,80
AAVF7	2,70	4,50
HSEC = células endoteliales sinusoidales hepáticas SMM = mioblastos de músculo esquelético		

Tabla 6. Transducción de células humanas primarias con vectores de AAVF que empaquetan mCherry

Vector	HSEC	Hepatocitos	SMM	HUVEC
Porcentaje de células positivas a mCherry				
AAVF1	7,04	0,13	1,65	1,47
AAVF4	9,10	0,05	1,72	0,61
AAVF5	4,00	0,01	1,03	0,71
AAVF7	4,43	0,70	0,77	2,15
AAVF9	38,24	1,05	29,27	50,13

HSEC = células endoteliales sinusoidales hepáticas
SMM = mioblastos de músculo esquelético
HUVEC = células endoteliales de vena umbilical humanas

EJEMPLO 7: Estudio de edición génica relativa a AAVF (HDR) frente a eficacias de transferencia génica (transducción)

Se usaron dos tipos de vectores basados en AAV (vectores de transferencia génica de CBA-mCherry, y vectores de edición génica de AAVS1-Venus, Figura 39) para determinar la eficacia de edición génica relativa frente a la eficacia de transducción de transferencia génica de vectores de AAVF, así como AAV2 y AAV6, según se mide mediante expresión de proteínas relativa. Para los vectores de transferencia génica, la construcción CBA-mCherry incluía el gen mCherry bajo el control del promotor de actina beta de pollo (CBA), y utilizaba una señal de poliadenilación, pero no contenía ramas de homología. Para los vectores de edición génica, la construcción AAVS1-Venus incluía el marco de lectura abierto (ORF) de Venus sin promotor, con ramas de homología (HA-L) y derecha (HA-R) que dirigen el ORF de Venus al intrón 1 del gen PPP1R12C dentro de las región AAVS1 del cromosoma 19. También había un aceptor de empalme (SA) y una secuencia 2A aguas arriba del ORF de Venus, lo que permitía que el transcrito de Venus se escindiera y se expresara independientemente del gen PPP1R12C.

La capacidad de los vectores de AAVF, AAV2 y AAV6 para mediar en la edición génica frente a la transferencia génica se comparó en células madre/progenitoras hematopoyéticas CD34+ de sangre de cordón umbilical humano. La células usadas se reunieron de múltiples donantes. Las células CD34+ purificadas se transdujeron bien con vectores de transferencia génica (AAV*-CBA-mCherry) o bien con vectores de edición génica (AAV*-Venus) a una multiplicidad de 150.000 genomas de vector (VG) por célula. Cuarenta y ocho horas más tarde, las células se recolectaron y se analizaron mediante citometría de flujo (Figura 40A y 40B). Los datos mostrados incluyen la sustracción de células no transducidas de fondo.

Se estableció como hipótesis que la expresión de mCherry representaría la eficacia de transducción, mientras que la expresión de Venus representaría la eficacia de edición génica. Sin querer limitarse por una teoría. lo siguiente es un resumen del mecanismo potencial de transducción de AAV frente a la edición. Tras la infección, el AAV se une a receptores de la superficie celular y se internaliza antes de la translocación y la entrada nucleares. En el núcleo, el AAV sufre eliminación del revestimiento y se liberan genomas del vector. Probablemente, estos procesos se producen a la misma velocidad para cada cápside dada en la misma población celular, independientemente del genoma del vector. Después de la eliminación del revestimiento, el genoma CBA-mCherry monocatenario experimenta la síntesis de una segunda cadena antes de la expresión de mCherry. Por otra parte, el vector de edición de Venus sin promotor se dirige a la región genómica de complementariedad en el cromosoma 19. El casete SA/2A-Venus que está unido por las ramas de homología se puede recombinar a continuación en el cromosoma en la conexión interna de las ramas de homología a través de mecanismos de reparación dependiente de homología (HDR). Después de este episodio de recombinación, Venus se expresa en las células editadas satisfactoriamente.

Venus se expresaba en una proporción muy superior de células que mCherry para todos los vectores excepto AAVF9 (Figura 40A y 40C). La expresión de Venus era especialmente alta después de la transducción con AAVF1, AAVF5, AAVF7, AAVF16 y AAVF17. Las mismas cápsides conducían a niveles muy inferiores de expresión de mCherry (Figura 40A y 40C). La menor cantidad de expresión tanto de mCherry como de Venus se observaba después de la transducción con AAV2 y AAV6. También se realizó una comparación de la expresión relativa de Venus con mCherry. Específicamente, se determinó una relación de edición – que refleja la relación del número de células que tienen expresión proteínica detectable en los diversos tipos de células usando vectores de edición génica del experimento (Venus) al número de células que tienen expresión proteínica detectable usando los susodichos vectores de transferencia génica (mCherry). La relación de edición proporciona una estimación de la eficacia relativa de edición mediada por cada cápside de AAV después de la normalización para los procesos de entrada de virus a través de la eliminación del revestimiento dentro del núcleo. Todos los vectores de AAV probados exhibían una edición génica más eficaz (Venus) en comparación con la transferencia génica/expresión transgénica (mCherry), excepto para AAVF9

(Figura 40D y Tabla 7). AAVF5 y AAVF7 exhibían la relación de edición más alta (Figura 40D y Tabla 7). La edición génica mediada por AAVF (Venus) también se comparó con relación a la edición génica mediada por AAV2 y AAV6 (Venus) (Tabla 7, que muestra la relación Venus:mCherry de AAVF dividida por la misma relación bien para AAV2 o bien para AAV6). La eficacia de la edición génica de construcciones de edición génica de AAVF se comparaba favorablemente con relación a construcciones de edición génica de AAV2 y AAV6. Las relaciones de edición de AAVF5 y AAVF7 eran las más altas de los vectores comparados, indicando que estos vectores en particular median en una edición altamente eficaz.

Tabla 7. Relación de edición a transducción en células CB CD34+

Vector	Relación edición:transducción (Venus:mCherry)	Relación edición de AAVF:edición de AAV6	Relación edición de AAVF:edición de AAV2
AAVF1	4,32	1,23	3,02
AAVF4	3,42	0,98	0,98
AAVF5	16,60	4,74	11,62
AAVF7	14,66	4,19	10,26
AAVF9	0,73	0,21	0,51
AAV2	1,43	0,41	1,00
AAV6	3,50	1,00	2,45

REFERENCIAS

1. BAINBRIDGE, J.W., SMITH, A.J., BARKER, S.S., ROBBIE, S., HENDERSON, R., BALAGGAN, K., VISWANATHAN, A., HOLDER, G.E., STOCKMAN, A., TYLER, N., PETERSEN-JONES, S., BHATTACHARYA, S.S., THRASHER, A.J., FITZKE, F.W., CARTER, B.J., RUBIN, G.S., MOORE, A.T., y ALI, R.R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358, 2231-2239.

2. BATCHU, R.B., SHAMMAS, M.A., WANG, J.Y., FREEMAN, J., ROSEN, N., y MUNSHI, N.C. (2002). Adeno-associated virus protects the retinoblastoma family of proteins from adenoviral-induced functional inactivation. Cancer Res 62, 2982-2985.

3. BELL, P., WANG, L., LEBHERZ, C., FLIEDER, D.B., BOVE, M.S., WU, D., GAO, G.P., WILSON, J.M., y WIVEL, N.A. (2005). No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. Mol Ther 12, 299-306.

4. BERNS, K.I., y GIRAUD, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. Curr Top Microbiol Immunol 218, 1-23.

5. BIFFI, A., y CESANI, M. (2008). Human hematopoietic stem cells in gene therapy: preclinical and clinical issues. Curr Gene Ther 8, 135-146.

6. BRANTLY, M.L., CHULAY, J.D., WANG, L., MUELLER, C., HUMPHRIES, M., SPENCER, L.T., ROUHANI, F., CONLON, T.J., CALCEDO, R., BETTS, M.R., SPENCER, C., BYRNE, B.J., WILSON, J.M., y FLOTTE, T.R. (2009). Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A.

7. CHATTERJEE, S., JOHNSON, P.R., y WONG, K.K., JR. (1992). Dual-target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisense vector. Science 258, 1485-1488.

8. CHATTERJEE, S., LI, W., WONG, C.A., FISHER-ADAMS, G., LU, D., GUHA, M., MACER, J.A., FORMAN, S.J., y WONG, K.K., JR. (1999). Transduction of primitive human marrow and cord blood-derived hematopoietic progenitor cells with adeno-associated virus vectors. Blood 93, 1882-1894.

9. CHATTERJEE, S., WONG, KK. (1993). Adeno-Associated Viral Vectors for the Delivery of Antisense RNA. METHODS -LONDON- A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY- 5, 1.

10. CIDECIYAN, A.V., HAUSWIRTH, W.W., ALEMAN, T.S., KAUSHAL, S., SCHWARTZ, S.B., BOYE, S.L., WINDSOR, E.A., CONLON, T.J., SUMAROKA, A., PANG, J.J., ROMAN, A.J., BYRNE, B.J., y JACOBSON, S.G.

(2009). Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements y safety at 1 year. Hum Gene Ther 20, 999-1004.

11. EINERHAND, M.P., ANTONIOU, M., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., BERNS, K.I., GROSVELD, F., y VALERIO, D. (1995). Regulated high-level human beta-globin gene expression in erythroid cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. Gene Ther 2, 336-343.

12. FISHER-ADAMS, G., WONG, K.K., JR., PODSAKOFF, G., FORMAN, S.J., y CHATTERJEE, S. (1996). Integration of adeno-associated virus vectors in CD34+ human hematopoietic progenitor cells after transduction. Blood 88, 492-504.

13. FLOTTE, T.R., BRANTLY, M.L., SPENCER, L.T., BYRNE, B.J., SPENCER, C.T., BAKER, D.J., y HUMPHRIES, M. (2004). Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. Hum Gene Ther 15, 93-128.

14. GAO, G., VANDENBERGHE, L.H., ALVIRA, M.R., LU, Y., CALCEDO, R., ZHOU, X., y WILSON, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J Virol 78, 6381-6388.

15. HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., LE DEIST, F., WULFFRAAT, N., MCINTYRE, E., RADFORD, I., VILLEVAL, J.L., FRASER, C.C., CAVAZZANA-CALVO, M., y FISCHER, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 348, 255-256.

16. HAN, Z., ZHONG, L., MAINA, N., HU, Z., LI, X., CHOUTHAI, N.S., BISCHOF, D., WEIGEL-VAN AKEN, K.A., SLAYTON, W.B., YODER, M.C., y SRIVASTAVA, A. (2008). Stable integration of recombinant adeno-associated virus vector genomes after transduction of murine hematopoietic stem cells. Hum Gene Ther 19, 267-278.

17. JAYANDHARAN, G.R., ZHONG, L., LI, B., KACHNIARZ, B., y SRIVASTAVA, A. (2008). Strategies for improving the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro y *in vivo*. Gene Ther 15, 1287-1293.

18. KAPLITT, M.G., FEIGIN, A., TANG, C., FITZSIMONS, H.L., MATTIS, P., LAWLOR, P.A., BLAND, R.J., YOUNG, D., STRYBING, K., EIDELBERG, D., y DURING, M.J. (2007). Safety y tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. Lancet 369, 2097-2105.

19. KELLS, A.P., HADACZEK, P., YIN, D., BRINGAS, J., VARENIKA, V., FORSAYETH, J., y BANKIEWICZ, K.S. (2009). Efficient gene therapy-based method for the delivery of therapeutics to primate cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 2407-2411.

20. KESSLER, P.D., PODSAKOFF, G.M., CHEN, X., MCQUISTON, S.A., COLOSI, P.C., MATELIS, L.A., KURTZMAN, G.J., y BYRNE, B.J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression y systemic delivery of a therapeutic protein. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 14082-14087.

21. MANNO, C.S., CHEW, A.J., HUTCHISON, S., LARSON, P.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V.R., TAI, S.J., RAGNI, M.V., THOMPSON, A., OZELO, M., COUTO, L.B., LEONARD, D.G., JOHNSON, F.A., MCCLELLAND, A., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., KAY, M.A., HIGH, K.A., y GLADER, B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. Blood 101, 2963-2972.

22. MCCORMACK, M.P., y RABBITTS, T.H. (2004). Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 350, 913-922.

23. MILLER, D.G., ADAM, M.A., y MILLER, A.D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. Mol Cell Biol 10, 4239-4242.

24. PAZ, H., WONG, C.A., LI, W., SANTAT, L., WONG, K.K., y CHATTERJEE, S. (2007). Quiescent subpopulations of human CD34-positive hematopoietic stem cells are preferred targets for stable recombinant adeno-associated virus type 2 transduction. Hum Gene Ther 18, 614-626.

25. PETRS-SILVA, H., DINCULESCU, A., LI, Q., MIN, S.H., CHIODO, V., PANG, J.J., ZHONG, L., ZOLOTUKHIN, S., SRIVASTAVA, A., LEWIN, A.S., y HAUSWIRTH, W.W. (2009). High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. Mol Ther 17, 463-471.

26. PODSAKOFF, G., WONG, K.K., JR., y CHATTERJEE, S. (1994). Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. J Virol 68, 5656-5666.

27. PONNAZHAGAN, S., YODER, M.C., y SRIVASTAVA, A. (1997). Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of murine hematopoietic cells with long-term repopulating ability and sustained expression of a human globin gene *in vivo*. J Virol 71, 3098-3104.

28. RAJ, K., OGSTON, P., y BEARD, P. (2001). Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. Nature 412, 914-917.

29. SANTAT, L., PAZ, H., WONG, C., LI, L., MACER, J., FORMAN, S., WONG, K.K., y CHATTERJEE, S. (2005). Recombinant AAV2 transduction of primitive human hematopoietic stem cells capable of serial engraftment in immune-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 11053-11058.

30. SRIVASTAVA, A. (2004). Gene delivery to human y murine primitive hematopoietic stem y progenitor cells by AAV2 vectors. Methods Mol Biol 246, 245-254.

31. TOWNE, C., SCHNEIDER, B.L., KIERAN, D., REDMOND, D.E., JR., y AEBISCHER, P. (2009). Efficient transduction of non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV serotype 6. Gene Ther.

32. ZHONG, L., CHEN, L., LI, Y., QING, K., WEIGEL-KELLEY, K.A., CHAN, R.J., YODER, M.C., y SRIVASTAVA, A. (2004a). Self-complementary adeno-associated virus 2 (AAV)-T cell protein tyrosine phosphatase vectors as virus cooperadores to improve transduction efficiency of conventional single-stranded AAV vectors in vitro y *in vivo*. Mol Ther 10, 950-957.

33. ZHONG, L., LI, B., JAYANDHARAN, G., MAH, C.S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJEMCKENNA, M., HERZOG, R.W., WEIGEL-VAN AKEN, K.A., HOBBS, J.A., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., y SRIVASTAVA, A. (2008a). Tyrosine phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression. Virology 381, 194-202.

34. ZHONG, L., LI, B., MAH, C.S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., COOPER, M., HERZOG, R.W., ZOLOTUKHIN, I., WARRINGTON, K.H., JR., WEIGEL-VAN AKEN, K.A., HOBBS, J.A., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., y SRIVASTAVA, A. (2008b). Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: puntual mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 7827-7832.

35. ZHONG, L., LI, W., YANG, Z., QING, K., TAN, M., HANSEN, J., LI, Y., CHEN, L., CHAN, R.J., BISCHOF, D., MAINA, N., WEIGEL-KELLEY, K.A., ZHAO, W., LARSEN, S.H., YODER, M.C., SHOU, W., y SRIVASTAVA, A. (2004b). Impaired nuclear transport and uncoating limit recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transduction of primary murine hematopoietic cells. Hum Gene Ther 15, 1207-1218.

36. ZHONG, L., ZHAO, W., WU, J., LI, B., ZOLOTUKHIN, S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJEMCKENNA, M., y SRIVASTAVA, A. (2007). A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis. Mol Ther 15, 1323-1330.

37. ZHOU, S.Z., BROXMEYER, H.E., COOPER, S., HARRINGTON, M.A., y SRIVASTAVA, A. (1993). Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in murine hematopoietic progenitor cells. Exp Hematol 21, 928-933.

38. KHAN, I.G., HIRATA, R.K., RUSSELL, D.W. (2011) AAV-mediated gene targeting methods for human cells. Nat Protoc. 4, 482-501.

39. KHOTIN, R.M., LINDEN, R.M., y BERNS, K.I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. EMBO 13, 5071-8.

40. GIRAUD, C., WINOCOUR, E., y BERNS, K.I. (1994). Site-specific integration by adeno-associated virus is directed by a cellular DNA sequence. Proc. Natl Acad Sci USA 21, 10039-43.

41. LINDEN, R.M., WARD, P., GIRAUD, C., WINOCOUR, E., y BERNS, K.I. (1996A). Site-specific integration by adeno-associated virus. Proc. Natl Acad Sci USA 21, 11288-94.

42. LINDEN, R.M., WINOCOUR, E., y BERNS, K.I. (1996B). The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. Proc. Natl Acad Sci USA 15, 7966-72.

43. XU, L., O'MALLEY, T., SANDS, M.S., WANG, B., MEYERROSE, T., HASKINS, M.E., y PONDER, K.P (2004). *In vivo* Transduction of Hematopoietic Stem Cells After Neonatal Intravenous Injection of an Amphotrophic Retroviral Vector in Mice. Mol. Ther. Jul; 10(1):37-44.

44. WANG, C.X., SATHER, B.D., WANG, X., ADAIR, J., KHAN, I., SINGH, S., LANG, S., ADAMS, A., CURINGA, G., KIEM, H-P., MIAO, C.H., RAWLINGS, D.J., y TORBETT, B.E. (2014). Rapamycin relieves lentiviral vector transduction resistance in human and mouse hematopoietic stem cells. Blood. Aug; 124(6):913-23.

45. CARBONARO, D.A., JIN, X., PETERSEN, D., WANG, X., DOREY, F., KIL, K.S., ALDRICH, M., BLACKBURN, M.R., KELLEMS, R.E., y KOHN, D.B. (2006) *In vivo* Transduction by Intravenous Injection of a Lentiviral Vector Expressing Human ADA into Neonatal ADA Gene Knockout Mice: A Novel Form of Enzyme Replacement Therapy for ADA Deficiency. Mol. Ther. Jun; 13(6): 1110-20.

46. SMITH, L.J., UL-HASAN, T., CARVAINES, S.K., VAN VLIET, K., YANG, E., WONG, JR, K.K., AGBANDJE-MCKENNA, M., y CHATTERJEE, S. (2014) Gene Transfer Properties and Structural Modeling of Human Stem cell-derived AAV. Mol. Ther. Sept; 22(9):1625-1634.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CITY of HOPE

CHATTERJEE,

Saswati SMITH,

Laura WONG, Kamehameha

<120> VARIANTES DE VECTORES DE VIRUS ADENOASOCIADOS PARA LA EDICIÓN GENÓMICA DE ALTA EFICACIA Y SUS MÉTODOS

<130> Documento 054435-8138.WO00

<150> Documento US 62/209,862

<151> Documento 2015-08-25

<150> Documento US 62/063,587

<151> 2014-10-14

<150> Documento US 62/054,899

<151> 2014-09-24

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AAV9 adenoasociado

<400> 1

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365
```

```
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 2

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Gln Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350
```

```
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
```

595 600 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 3

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
```

325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

```
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 4

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
```

```
    50                  55                  60

Ile Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300
```

```
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560
```

```
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 5

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285
```

```
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540
```

```
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 6

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270
```

```
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Ser Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
```

```
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 7

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
```

```
                245                 250                 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495
```

```
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Arg Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 8

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Val Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480
```

```
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 9

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205
```

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460
```

```
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val

705                 710                 715                 720

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

<210> 10

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 10

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

```
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Cys Gly Gly
        195                 200                 205

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
```

```
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 11

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
```

```
                165                 170                 175

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415
```

```
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 12

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

```
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro His Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400
```

```
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Asn
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 13

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380
```

```
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
```

625 630 635 640

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 14

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
```

```
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605
```

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 15

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
```

```
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335
```

```
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590
```

```
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 16

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

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

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

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60
```

```
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320
```

```
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ala Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575
```

```
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 17

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

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

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

```
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
            260                 265                 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
        275                 280                 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300
```

```
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
                485                 490                 495

Asn Asn Ser Glu Ile Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
            500                 505                 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
```

```
545                 550                 555                 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
        595                 600                 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 2211

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 18

```
atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc        60

gagtggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac       120

aacgctcgag gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac       180

aaggggagc cggtcaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac       240
```

cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc 300

caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360

gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420

ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc 480

aaatcgggtg cacagcccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540

tcagtcccag accctcaacc aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct 600

cttacaatgg cttcaggtgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcatc 720

accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc 780

tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840

tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900

ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960

caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc 1020

acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080

gagggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg 1140

acgcttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc 1200

ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta 1260

cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc 1320

gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg 1380

ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct 1440

ggacccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500

tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560

ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620

ttaatttttg gcaaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata 1680

accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740

gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800

atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860

aaaattcctc acacggacgg caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920

aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980

gccttcaaca aggacaagct gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc 2040

gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100

tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta 2160

tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 19

<211> 4679

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 19

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120

gccaactcca tcactagggg ttcctggagg ggtggagtcg tgacgtgaat tacgtcatag 180

ggttagggag gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat 240

gtggtcacgc tgggtattta agcccgagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga 300

ggtttgaacg cgcagccgcc atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg 360

accttgacga gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg 420

aatgggagtt gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga 480

ccgtggccga gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc 540

cggaggccct tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc 600

tcgtggaaac caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg 660

aaaaactgat tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg 720

tcacaaagac cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc 780

ccaattactt gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac 840

agtatttaag cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga 900

cgcacgtgtc gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc 960

cggtgatcag atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca 1020

aggggattac ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca 1080

atgcggcctc caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta 1140

tgagcctgac taaaaccgcc cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt 1200

ccagcaatcg gatttataaa attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt 1260

ccgtctttct gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg 1320

ggcctgcaac taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct 1380

acgggtgcgt aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg 1440

tgatctggtg ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc 1500

tcggaggaag caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga 1560

ctcccgtgat cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga 1620

ccttcgaaca ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc 1680

tggatcatga ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa 1740

aggatcacgt ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa 1800

gacccgcccc cagtgacgca gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc 1860

agccatcgac gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat 1920

gttctcgtca cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga 1980

atcagaattc aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg 2040

tgtcagaatc tcaacccgtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc 2100

atcatatcat gggaaaggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt 2160

tggatgactg catctttgaa caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat 2220

cttccagatt ggctcgagga cactctctct gaaggaataa gacagtggtg gaagctcaaa 2280

cctggcccac caccaccaaa gcccgcagag cggcataagg acgacagcag gggtcttgtg 2340

cttcctgggt acaagtacct cggacccttc aacggactcg acaagggaga gccggtcaac 2400

gaggcagacg ccgcggccct cgagcacgac aaagcctacg accggcagct cgacagcgga 2460

gacaacccgt acctcaagta caaccacgcc gacgcggagt ttcaggagcg ccttaaagaa 2520

gatacgtctt ttgggggcaa cctcggacga gcagtcttcc aggcgaaaaa gagggttctt 2580

gaacctctgg gcctggttga ggaacctgtt aagacggctc cgggaaaaaa gaggccggta 2640

gagcactctc ctgtggagcc agactcctcc tcgggaaccg gaaaggcggg ccagcagcct 2700

gcaagaaaaa gattgaattt tggtcagact ggagacgcag actcagtacc tgacccccag 2760

cctctcggac agccaccagc agccccctct ggtctgggaa ctaatacgat ggctacaggc 2820

agtggcgcac caatggcaga caataacgag ggcgccgacg gagtgggtaa ttcctcggga 2880

aattggcatt gcgattccac atggatgggc gacagagtca tcaccaccag cacccgaacc 2940

tgggccctgc ccacctacaa caaccacctc tacaaacaaa tttccagcca atcaggagcc 3000

tcgaacgaca atcactactt tggctacagc acccctggg ggtattttga cttcaacaga 3060

ttccactgcc acttttcacc acgtgactgg caaagactca tcaacaacaa ctggggattc 3120

cgacccaaga gactcaactt caagctcttt aacattcaag tcaaagaggt cacgcagaat 3180

gacggtacga cgacgattgc caataacctt accagcacgg ttcaggtgtt tactgactcg 3240

gagtaccagc tcccgtacgt cctcggctcg gcgcatcaag gatgcctccc gccgttccca 3300

gcagacgtct tcatggtgcc acagtatgga tacctcaccc tgaacaacgg gagtcaggca 3360

gtaggacgct cttcatttta ctgcctggag tactttcctt ctcagatgct gcgtaccgga 3420

aacaacttta ccttcagcta cacttttgag gacgttcctt tccacagcag ctacgctcac 3480

agccagagtc tggaccgtct catgaatcct ctcatcgacc agtacctgta ttacttgagc 3540

agaacaaaca ctccaagtgg aaccaccacg cagtcaaggc ttcagttttc tcaggccgga 3600

gcgagtgaca ttcgggacca gtctaggaac tggcttcctg gaccctgtta ccgccagcag 3660

cgagtatcaa agacatctgc ggataacaac aacagtgaat actcgtggac tggagctacc 3720

aagtaccacc tcaatggcag agactctctg gtgaatccgg gcccggccat ggcaagccac 3780

aaggacgatg aagaaaagtt ttttcctcag agcggggttc tcatctttgg gaagcaaggc 3840

tcagagaaaa caaatgtgga cattgaaaag gtcatgatta cagacgaaga ggaaatcagg 3900

acaaccaatc ccgtggctac ggagcagtat ggttctgtat ctaccaacct ccagagaggc 3960

aacagacaag cagctaccgc agatgtcaac acacaaggcg ttcttccagg catggtctgg 4020

caggacagag atgtgtacct tcaggggccc atctgggcaa agattccaca cacggacgga 4080

cattttcacc cctctcccct catgggtgga ttcggactta aacaccctcc tccacagatt 4140

ctcatcaaga acaccccggt acctgcgaat ccttcgacca ccttcagtgc ggcaaagttt 4200

gcttccttca tcacacagta ctccacggga caggtcagcg tggagatcga gtgggagctg 4260

cagaaggaaa acagcaaacg ctggaatccc gaaattcagt acacttccaa ctacaacaag 4320

tctgttaatg tggactttac tgtggacact aatggcgtgt attcagagcc tcgccccatt 4380

ggcaccagat acctgactcg taatctgtaa ttgcttgtta atcaataaac cgtttaattc 4440

gtttcagttg aactttggtc tctgcgtatt tctttcttat ctagtttcca tggctacgta 4500

gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc 4560

actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc 4620

ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaa 4679

<210> 20

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 20

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atgactgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcaactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 21

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 21

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggggcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacgggcgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tggaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 22

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 22

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggactcg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattgac aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcggactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 23

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 23

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcctccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

atccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccag gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 24

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 24

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacgg gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 25

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 25

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acctagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaagaaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaacac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 26

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 26

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cgatcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacgtacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 27

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 27

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggagc cggtcaacgc 540

agtagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

atttcggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 28

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 28

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct cgggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggaact 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 29

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 29

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtctttcag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcatgtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 30

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 30

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgccacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgctg ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacatga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca atgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcctggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc atggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 31

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 31

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 32

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 32

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagcg 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 33

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 33

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcgcgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 34

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 34

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa attgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccagtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattgcaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 35

<211> 2601

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nuevo aislado de AAV

<400> 35

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgtctgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgat aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 36

<211> 145

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AAV2 5' ITR

<400> 36

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120

gccaactcca tcactagggg ttcct 145

<210> 37

<211> 145

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AAV2 3' ITR

<400> 37

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag agagggagtg gccaa 145

<210> 38

<211> 167

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 5' ITR de AAV5

<400> 38

ctctcccccc tgtcgcgttc gctcgctcgc tggctcgttt ggggggggtgg cagctcaaag 60

agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg ccccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa 120

cgcgacaggg gggagagtgc cacactctca agcaaggggg ttttgta 167

<210> 39

<211> 167

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3' ITR de AAV5

<400> 39

tacaaaacct ccttgcttga gagtgtggca ctctcccccc tgtcgcgttc gctcgctcgc 60

tggctcgttt ggggggggtgg cagctcaaag agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg 120

ccccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa cgcgacaggg gggagag 167

<210> 40

<211> 621

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Rep de AAV2

<400> 40

```
Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp
1               5                   10                  15

Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu
            20                  25                  30

Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile
        35                  40                  45

Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu
    50                  55                  60
```

```
Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val
65                  70                  75                  80

Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val Leu Val Glu
                85                  90                  95

Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile
            100                 105                 110

Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu Pro Thr Leu
        115                 120                 125

Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu Leu Pro Lys
145                 150                 155                 160

Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu Gln Tyr Leu
                165                 170                 175

Ser Ala Cys Leu Asn Leu Thr Glu Arg Lys Arg Leu Val Ala Gln His
            180                 185                 190

Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu Asn Gln Asn
        195                 200                 205

Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser Ala Arg Tyr
    210                 215                 220

Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Lys Gly Ile Thr Ser Glu Lys
225                 230                 235                 240

Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe Asn Ala Ala
                245                 250                 255

Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Ala Ala Leu Asp Asn Ala Gly Lys
            260                 265                 270

Ile Met Ser Leu Thr Lys Thr Ala Pro Asp Tyr Leu Val Gly Gln Gln
        275                 280                 285

Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Leu
    290                 295                 300

Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Ser Val Phe Leu Gly Trp Ala
```

305 310 315 320

Thr Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe Gly Pro Ala
325 330 335

Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His Thr Val Pro
340 345 350

Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp
355 360 365

Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met Thr Ala
370 375 380

Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys Val Arg
385 390 395 400

Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro Thr Pro Val
405 410 415

Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp Gly Asn Ser
420 425 430

Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe Lys Phe
435 440 445

Glu Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Asp Phe Gly Lys Val Thr Lys Gln
450 455 460

Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val Val Glu Val
465 470 475 480

Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys Arg Pro Ala
485 490 495

Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg Glu Ser Val
500 505 510

Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn Tyr Ala Asp
515 520 525

Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn Leu Met Leu
530 535 540

Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys
545 550 555 560

```
Phe Thr His Gly Gln Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu
                565                 570                 575

Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr
            580                 585                 590

Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp
        595                 600                 605

Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Ile Phe Glu Gln
    610                 615                 620
```

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* para editar un locus diana de un cromosoma de mamífero, en donde el método comprende transducir una célula de mamífero que comprende el cromosoma de mamífero con un virus adenoasociado (AAV) de replicación defectuosa que comprende

a) una cápside del clado F de AAV; y

b) un genoma de corrección que comprende:

(i) un elemento de edición para la inserción de uno o más nucleótidos, la eliminación de uno o más nucleótidos o la sustitución de uno o más nucleótidos con relación al locus diana, en donde el elemento de edición se selecciona de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en el locus diana;

(ii) un secuencia nucleotídica 5' de la rama homóloga 5' del elemento de edición, que tiene homología con una región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana; y

(iii) un secuencia nucleotídica 3' de la rama homóloga 3' del elemento de edición, que tiene homología con una región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana,

en donde la célula se transduce sin cotransducir o coadministrar una nucleasa exógena o una secuencia nucleotídica que codifica una nucleasa exógena, en donde la cápside del clado F de AAV comprende:

(i) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 203 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17;

(ii) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 138 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17; y/o

(iii) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 1 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17.

2. El método *ex vivo* según la reivindicación 1, en el que

(a) la célula de mamífero es un mioblasto, una célula endotelial, una célula hepática, un fibroblasto, una célula mamaria, un linfocito o una célula retiniana; y/o

(b) la célula de mamífero es una célula madre, en donde opcionalmente la célula madre es una célula madre hematopoyética, una célula madre de sangre del cordón umbilical o una célula madre de sangre periférica, y en donde, además, opcionalmente, la célula madre es una célula madre hematopoyética $CD34^+$.

3. Un virus adenoasociado (AAV) de replicación defectuosa para el uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto, comprendiendo el método administrar el AAV con replicación defectuosa al sujeto sin cotransducir o coadministrar una nucleasa exógena o una secuencia nucleotídica que codifica una nucleasa exógena,

en donde el AAV con replicación defectuosa comprende:

a) una cápside del clado F de AAV; y

b) un genoma de corrección que comprende:

(i) un elemento de edición para la inserción de uno o más nucleótidos, la eliminación de uno o más nucleótidos o la sustitución de uno o más nucleótidos con relación al locus diana, en donde el elemento de edición se selecciona de un enlace internucleotídico o una secuencia nucleotídica para la integración en un locus diana de un cromosoma de mamífero;

(ii) un secuencia nucleotídica 5' de la rama homóloga 5' del elemento de edición, que tiene homología con una región 5' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana; y

(iii) un secuencia nucleotídica 3' de la rama homóloga 3' del elemento de edición, que tiene homología con una región 3' del cromosoma de mamífero con relación al locus diana

en donde la cápside del clado F de AAV comprende:

(i) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 203 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17;

(ii) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 138 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17; y/o

(iii) una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 100% de identidad de secuencia con los aminoácidos 1 a 736 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 2-17.

4. El método *ex vivo* o el AAV con replicación defectuosa para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el genoma de corrección carece de un promotor ligado operativamente a la secuencia nucleotídica del elemento de edición.

5. El método *ex vivo* o el AAV con replicación defectuosa para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el genoma de corrección comprende además un promotor ligado operativamente al elemento de edición.

6. El método *ex vivo* o el AAV con replicación defectuosa para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada una de las secuencias nucleotídicas de las ramas homólogas 3' y 5' tiene independientemente una longitud de nucleótidos de aproximadamente 50 a 2000 nucleótidos.

7. El método *ex vivo* o el AAV con replicación defectuosa para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el elemento de edición comprende un exón, un intrón, una región no traducida (UTR) 5', una región no traducida (UTR) 3', un promotor, un donante de empalme, un aceptor de empalme, una secuencia correspondiente a un ARN no codificante, un aislante, un gen o uno de sus fragmentos, una secuencia codificante de un gen, o una de sus combinaciones.

8. El método *ex vivo* o el AAV con replicación defectuosa para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el locus diana del cromosoma de mamífero es un locus diana mutante que comprende uno o más nucleótidos mutantes, con relación a un cromosoma de mamífero silvestre correspondiente, en el que opcionalmente:

(a) el locus diana mutante comprende una mutación amórfica, una mutación neomórfica, una mutación antimórfica, una mutación dominante autosómica, una mutación recesiva autosómica, o una de sus combinaciones; y/o

(b) el locus diana mutante se selecciona de un promotor, un potenciador, una secuencia de señalización, un intrón, un exón, un sitio donante de empalme, un sitio aceptor de empalme, un sitio interno de entrada al ribosoma, un exón invertido, un aislante, un gen o uno de sus fragmentos, una inversión cromosómica y una translocación cromosómica dentro del cromosoma de mamífero.

9. El método *ex vivo* o el AAV con replicación defectuosa para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el genoma de corrección comprende una secuencia nucleotídica 5' de una repetición terminal invertida 5' (5' ITR) de la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 5', y una secuencia nucleotídica 3' de una repetición terminal invertida 3' (3' ITR) de la secuencia nucleotídica de la rama homóloga 3', en el que opcionalmente:

(a) la secuencia nucleotídica de 5' ITR tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:36, y la secuencia nucleotídica de 3' ITR tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:37; o

(b) la secuencia nucleotídica de 5' ITR tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:38, y la secuencia nucleotídica de 3' ITR tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO:39.

10. El método *ex vivo* o el AAV con replicación defectuosa para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el enlace internucleotídico es un enlace fosfodiéster.

11. El método *ex vivo* o el AAV con replicación defectuosa para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el locus diana es un sitio de "puerto seguro".

Figura 1

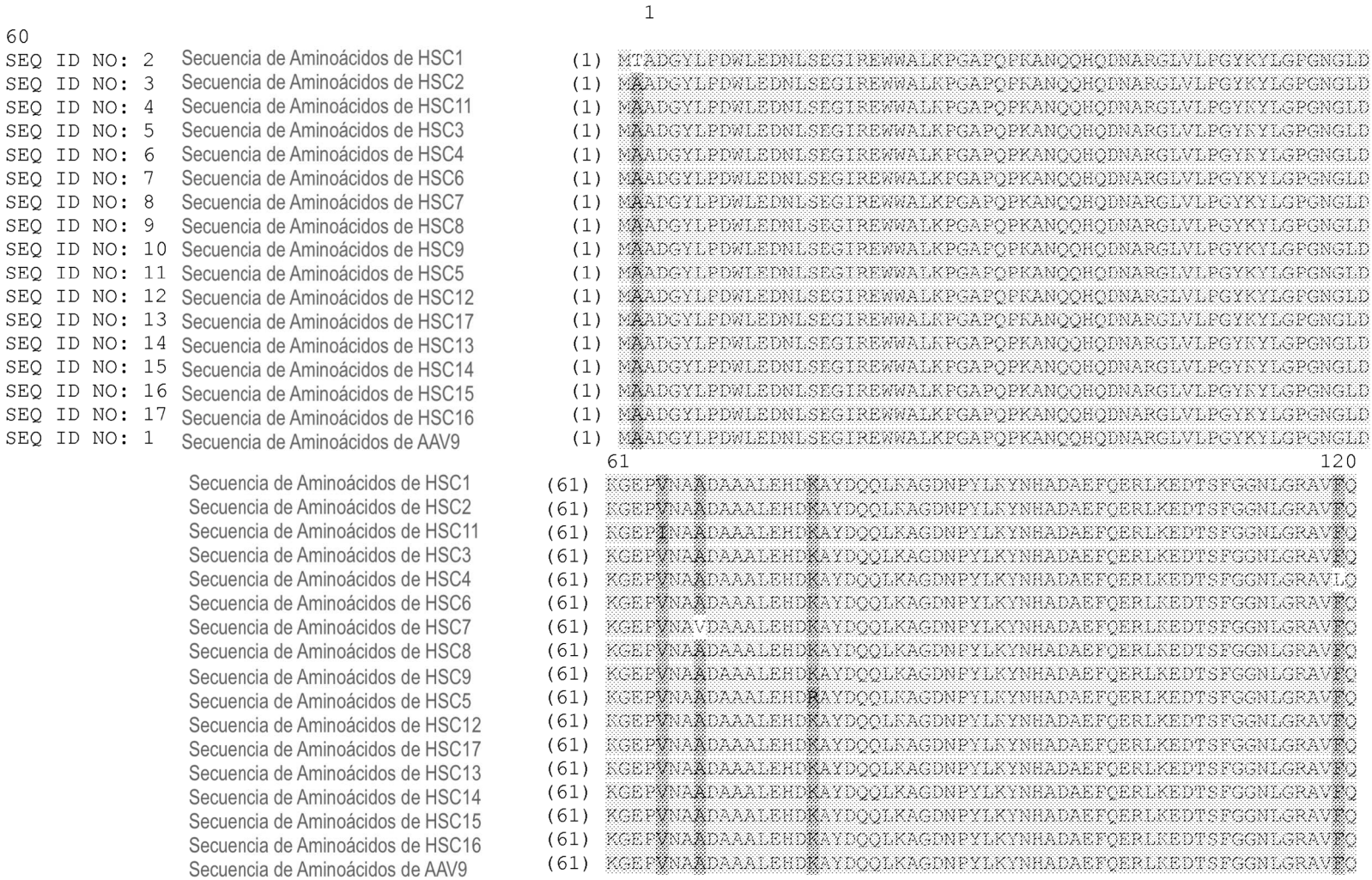

1
60
SEQ ID NO: 2 Secuencia de Aminoácidos de HSC1
SEQ ID NO: 3 Secuencia de Aminoácidos de HSC2
SEQ ID NO: 4 Secuencia de Aminoácidos de HSC11
SEQ ID NO: 5 Secuencia de Aminoácidos de HSC3
SEQ ID NO: 6 Secuencia de Aminoácidos de HSC4
SEQ ID NO: 7 Secuencia de Aminoácidos de HSC6
SEQ ID NO: 8 Secuencia de Aminoácidos de HSC7
SEQ ID NO: 9 Secuencia de Aminoácidos de HSC8
SEQ ID NO: 10 Secuencia de Aminoácidos de HSC9
SEQ ID NO: 11 Secuencia de Aminoácidos de HSC5
SEQ ID NO: 12 Secuencia de Aminoácidos de HSC12
SEQ ID NO: 13 Secuencia de Aminoácidos de HSC17
SEQ ID NO: 14 Secuencia de Aminoácidos de HSC13
SEQ ID NO: 15 Secuencia de Aminoácidos de HSC14
SEQ ID NO: 16 Secuencia de Aminoácidos de HSC15
SEQ ID NO: 17 Secuencia de Aminoácidos de HSC16
SEQ ID NO: 1 Secuencia de Aminoácidos de AAV9
(1) MTADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
(1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
61
120
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPINAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVLQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAVDAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDRAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
(61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ

Figura 1 (cont.)

Figura 1 (cont.)

Figura 1 (cont.)

```
                                                  361                                                
```

Figura 1 (cont.)

Figura 1 (cont.)

Figura 1 (cont.)

		721 736
Secuencia de Aminoácidos de HSC1	(721)	YSEPPRFIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC2	(721)	YSEPPPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC11	(721)	YSEPPPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC3	(721)	YSEPFPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC4	(721)	YSEPPPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC6	(721)	YSEERPIGTRYLTSNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC7	(721)	YSEERPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC8	(721)	YSEPPRIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC9	(721)	YSEPPRFGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC5	(721)	YSEPPRFIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC12	(721)	YSEPPRFIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC17	(721)	YSEPPPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC13	(721)	YSEPFPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC14	(721)	YSEPFPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC15	(721)	YSEERPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de HSC16	(721)	YSEERPIGTRYLTRNL
Secuencia de Aminoácidos de AAV9	(721)	YSEERPIGTRYLTRNL

Figura 2

Cápside	Cambio de Base	Aminoácido Aislado de AAV 9hu.	Nuevo Aminoácido del Clon	Diferencia en los Aminoácidos	Colocación del Aminoácido (HVR = Región Hipervariable)
SEQ ID NO:2 de HSC1	G por A	GCT - Alanina	ACT – Treonina	La alanina es apolar y neutra; la treonina es polar y neutra	4 bases en la cápside; 2º aminoácido; No en HVR, VP1
SEQ ID NO:2 de HSC1	G por A	CGA - Arginina	CAA – Glutamina	La arginina es polar y muy básica; la glutamina es polar y neutra	935 bases en la cápside; 312º aminoácido; No en HVR, VP3
SEQ ID NO:3 de HSC2	A por G	GGA – Glicina	GGG – Glicina	Sin diferencia en los aminoácidos	1515 bases en la cápside; 505º aminoácido; 1er aminoácido después de HVR, VP3
SEQ ID NO:3 de HSC2	A por G	GAC – Ácido Aspártico	GGC – Glicina	El ácido aspártico es polar y ácido; la glicina es apolar y neutra	1877 bases en la cápside; 626º aminoácido; No en HVR, VP3
SEQ ID NO:3 de HSC2	A por G	GAA – Ácido Glutámico	GGA – Glicina	El ácido glutámico es polar y ácido; la glicina es apolar y neutra	2153 bases en la cápside; 718º aminoácido; En el último aminoácido de HVR 12, VP3
SEQ ID NO:5 de HSC3	G por A	GGC – Glicina	GAC – Ácido Aspártico	La glicina es apolar y neutra; el ácido aspártico es polar y neutro	479 bases en la cápside; 160º aminoácido; No en HVR, VP1
SEQ ID NO:5 de HSC3	A por G	TCA – Serina	TCG – Serina	Sin diferencia en los aminoácidos	1044 bases en la cápside; 384º aminoácido; No en HVR, VP3
SEQ ID NO:6 de HSC4	T por C	TTC – Fenilalanina	CTC – Leucina	La fenilalanina es apolar y neutra; la leucina es apolar y neutra	355 bases en la cápside; 119º aminoácido; No en HVR, VP1
SEQ ID NO:6 de HSC4	C por T	CCC – Prolina	TCC – Serina	La prolina es apolar y neutra; la serina es polar y neutra	1402 bases en la cápside; 468º aminoácido; En HVR 5, VP3
SEQ ID NO:6 de HSC4	G por A	CCG - Prolina	CCA- Prolina	Sin diferencia en los aminoácidos	1809 bases en la cápside; 603º aminoácido; No en HVR, VP3

Figura 2 (cont.)

Cápside	Cambio de Base	Aminoácido Aislado de AAV 9hu.	Nuevo Aminoácido del Clon	Diferencia en los Aminoácidos	Colocación del Aminoácido (HVR = Región Hipervariable)
SEQ ID NO:8 de HSC6	A por G	CAG – Glutamina	CGG - Arginina	La glutamina es polar y neutra; la arginina es polar y muy básica	1769 bases en la cápside; 590º aminoácido; En HVR 10, VP3
SEQ ID NO:11 de HSC5	A por G	AAG - Lisina	AGG - Arginina	La lisina es polar y básica; la arginina es polar y muy básica	230 bases en la cápside; 77º aminoácido; No en HVR, VP1
SEQ ID NO:11 de HSC5	C por T	CCC - Prolina	CCT - Prolina	Sin diferencia en los aminoácidos	1404 bases en la cápside; 468º aminoácido; En HVR 5, VP3
SEQ ID NO:11 de HSC5	G por A	GAA – Ácido Glutámico	AAA - Lisina	El ácido glutámico es polar y ácido; la lisina es polar y básica	2068 bases en la cápside; 690º aminoácido; No en HVR, VP3
SEQ ID NO:11 de HSC5	T por C	AAT - Asparagina	AAC - Asparagina	Sin diferencia en los aminoácidos	2148 bases en la cápside; 716º aminoácido; En HVR 13, VP3
SEQ ID NO:11 de HSC5	G por A	GTC - Valina	ATC - Isoleucina	La isoleucina es apolar y neutra; la valina es apolar y neutra	193 bases en la cápside; 65º aminoácido; No en HVR, VP1
SEQ ID NO:4 de HSC11	G por T	GAC – Ácido Aspártico	TAC - Tirosina	El ácido aspártico es polar y ácido; la tirosina es polar y neutra	1876 bases en la cápside; 626º aminoácido; No en HVR, VP3
SEQ ID NO:8 de HSC7	C por T	GCA - Alanina	GTA - Valina	La alanina es apolar y neutra; la valina es apolar y neutra	203 bases en la cápside; 68º aminoácido; No en HVR, VP1
SEQ ID NO:8 de HSC7	C por T	TTC - Fenilalanina	TTT- Fenilalanina	Sin diferencia en los aminoácidos	924 bases en la cápside; 308º aminoácido; No en HVR, VP3
SEQ ID NO:9 de HSC8	A por G	CAG - Glutamina	CGG - Arginina	La glutamina es polar y neutra; la arginina es polar y muy básica	452 bases en la cápside; 151º aminoácido; En HVR 1, VP1

Figura 2 (cont.)

Cápside	Cambio de Base	Aminoácido Aislado de AAV 9hu.	Nuevo Aminoácido del Clon	Diferencia en los Aminoácidos	Colocación del Aminoácido (HVR = Región Hipervariable)
SEQ ID NO:9 de HSC8	G por A	CAG – Ácido glutámico	GAA – Ácido glutámico	Sin diferencia en los aminoácidos	2058 bases en la cápside; 686º aminoácido; No en HVR , VP3
SEQ ID NO:10 de HSC9	T por C	TTT- Fenilalanina	TTC - Fenilalanina	Sin diferencia en los aminoácidos	357 bases en la cápside; 119º aminoácido; No en HVR, VP1
SEQ ID NO:10 de HSC9	T por G	TGT – Cisteína	GGT - Glicina	La cisteína es polar y neutra; la glicina es apolar y neutra	616 bases en la cápside; 206º aminoácido; No en HVR; Muy al principio de VP3
SEQ ID NO:12 de HSC12	A por T	GCA - Alanina	GCT - Alanina	Sin diferencia en los aminoácidos	579 bases en la cápside; 193º aminoácido en la cápside, al final de VP2 cerca de HVR 2
SEQ ID NO:12 de HSC12	G por A	CGT - Arginina	CAT - Hisitina	La arginina es polar y muy básica; la histidina es polar y poco básica	887 bases en la cápside; 296º aminoácido en la cápside; En VP3, no en HVR
SEQ ID NO:12 de HSC12	G por A	AGT - Serina	AAT - Asparagina	La serina es polar y neutra; la asparagina es polar y neutra	1391 bases en la cápside; 464º aminoácido en la cápside; en VP3 en HVR 5
SEQ ID NO:12 de HSC12	T por C	GCT - Alanina	GCC – Alanina	Sin diferencia en los aminoácidos	1506 bases en la cápside; 502º aminoácido en la cápside; en VP3 en HVR 7
SEQ ID NO:12 de HSC12	G por A	GGA - Glicina	AGA - Arginina	La glicina es apolar y neutra; la arginina es polar y muy básica	1513 bases en la cápside; 505º aminoácido en la cápside; en VP3, justo después de HVR 7
SEQ ID NO:12 de HSC12	G por A	GTG - Valina	ATG - Metionina	La valina es apolar y neutra; la metionina es apolar y neutra	2041 bases en la cápside; 681º aminoácido en la cápside; en VP3; no en HVR
SEQ ID NO: 14 de HSC13	G por A	GGA - Glicina	AGA - Arginina	La glicina es apolar y neutra; la arginina es polar y muy básica	1513 bases en la cápside; 505º aminoácido en la cápside; en VP3, justo después de HVR 7

Figura 2 (cont.)

Cápside	Cambio de Base	Aminoácido Aislado de AAV 9hu.	Nuevo Aminoácido del Clon	Diferencia en los Aminoácidos	Colocación del Aminoácido (HVR = Región Hipervariable)
SEQ ID NO:15 de HSC14	G por A	GGA – Glicina	AGA - Arginina	La glicina es apolar y neutra; la arginina es polar y muy básica	1513 bases en la cápside; 505º aminoácido en la cápside; en VP3, justo después de HVR 7
SEQ ID NO:15 de HSC14	T por G	CTG- Leucina	CGG - Arginina	La leucina es apolar y neutra; la arginina es polar y muy básica	2060 bases en la cápside; 687º aminoácido en la cápside; en VP3; No en HVR
SEQ ID NO:16 de HSC15	A por G	ACG – Treonina	GCG - Alanina	La treonina es polar y neutra; la arginina es polar y muy básica	1036 bases en la cápside; 346º aminoácido en la cápside; en VP3; No en HVR
SEQ ID NO:16 de HSC15	G por A	GGA – Glicina	AGA - Arginina	La glicina es apolar y neutra; la arginina es polar y muy básica	1513 bases en la cápside; 505º aminoácido en la cápside; en VP3, justo después de HVR 7
SEQ ID NO:17 de HSC16	T por A	TTT - Fenilalanina	ATT – Isoleucina	La fenilalanina es apolar y neutra; la isoleucina es apolar y neutra	1501 bases en la cápside; 501º aminoácido en la cápside; En VP3, en HVR7
SEQ ID NO:17 de HSC16	G por A	GGA - Glicina	AGA - Arginina	La glicina es apolar y neutra; la arginina es polar y muy básica	1513 bases en la cápside; 505º aminoácido en la cápside; en VP3, justo después de HVR 7
SEQ ID NO:17 de HSC16	G por A	CCG – Prolina	CCA - Prolina	Sin diferencia en los aminoácidos	1713 bases en la cápside; 571º aminoácido en la cápside; en VP3 No en HVR
SEQ ID NO:17 de HSC16	A por G	TAC -Tirosina	TGC – Cisteína	La tirosina es polar y neutra; la cisteína polar y neutra	2117 bases en la cápside; 706º aminoácido en la cápside; en VP3; En HVR 12 y está después de una mutación YF
SEQ ID NO:13 de HSC17	C por T	GAC – Ácido aspártico	GAT – Ácido aspártico	Sin diferencia en los aminoácidos	180 bases en la cápside; 60º aminoácido en la cápside; en VP1; No en HVR
SEQ ID NO:	G por A	GGA - Glicina	AGA - Arginina	La glicina es apolar y neutra;	1513 bases en la cápside; 505º aminoácido en

Figura 3

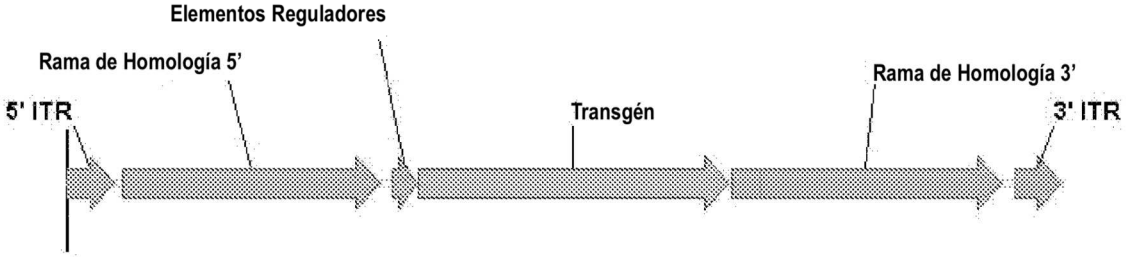

Elementos Reguladores
Rama de Homología 5'
Rama de Homología 3'
5' ITR
Transgén
3' ITR

Figura 4A

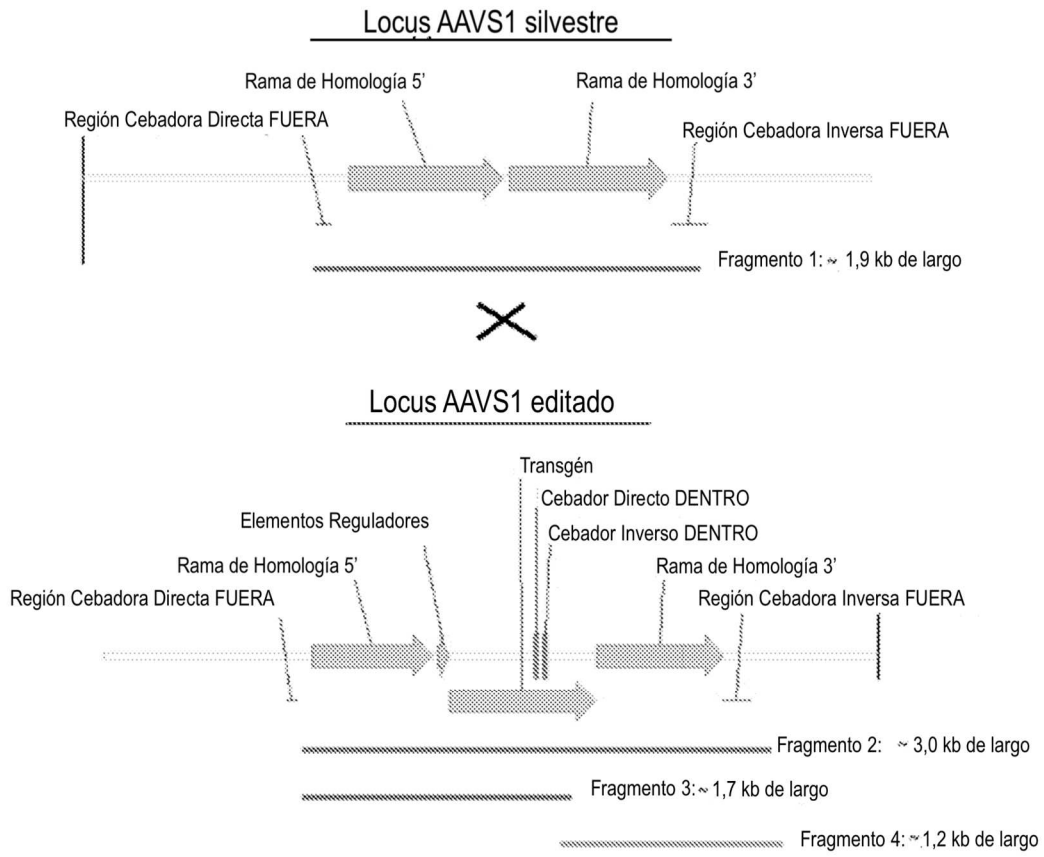
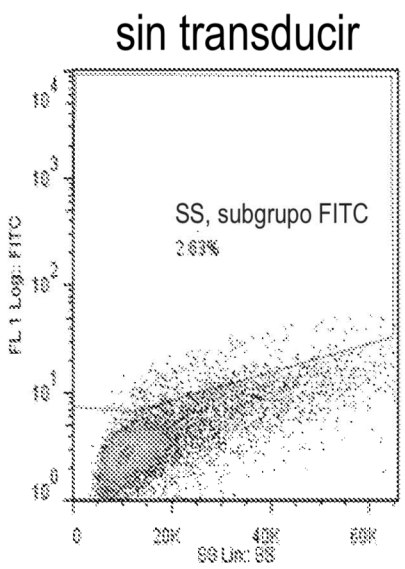


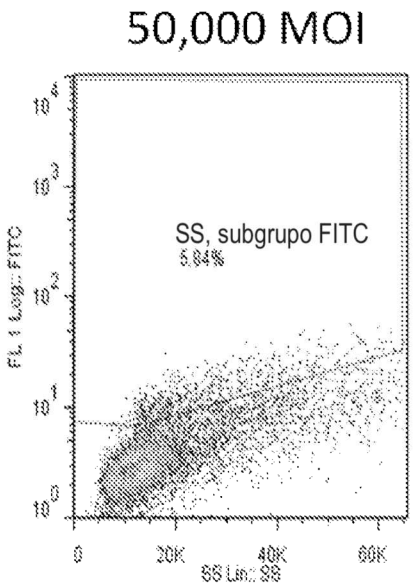
Figura 4B

Figura 5

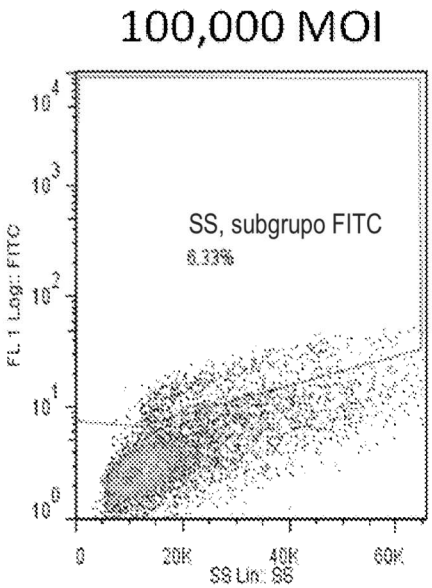
A.



B.



C.



D.

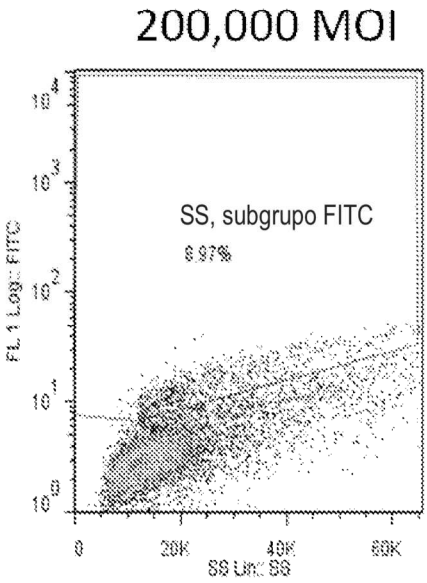
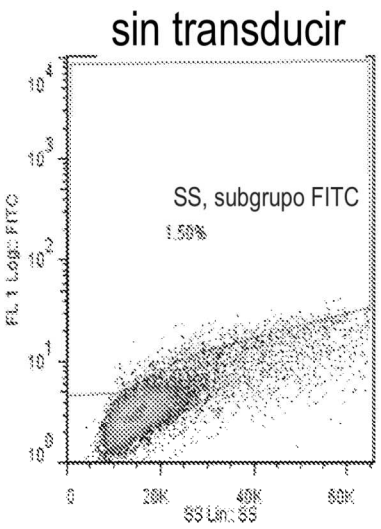
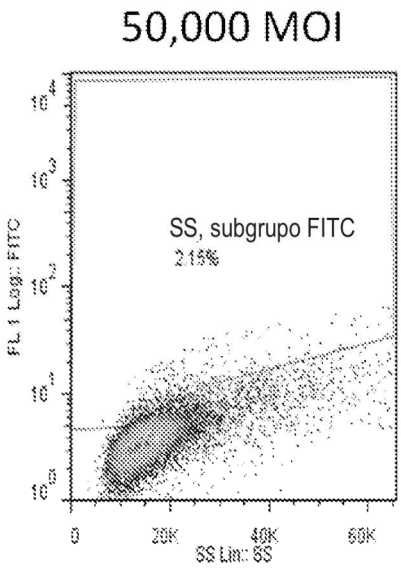


Figura 6

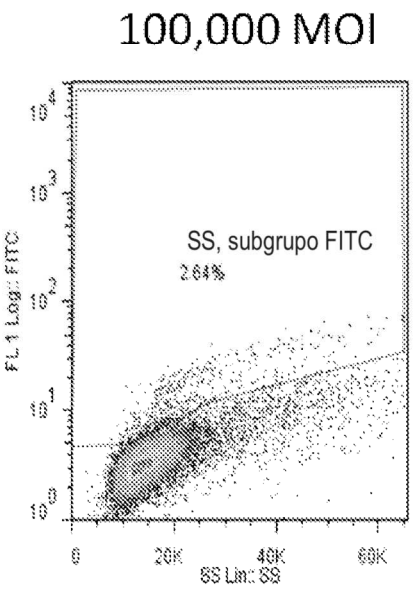
A.



B.



C.



D.

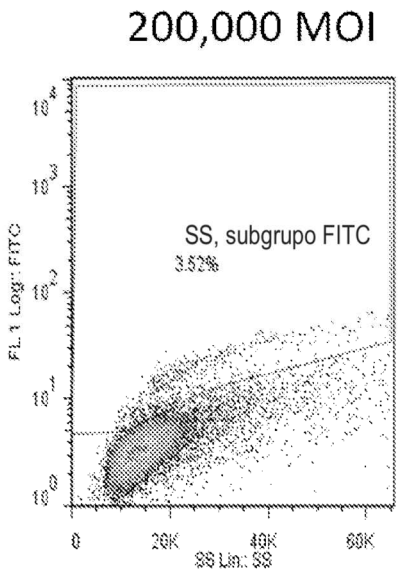


Figura 6 (cont.)

E.

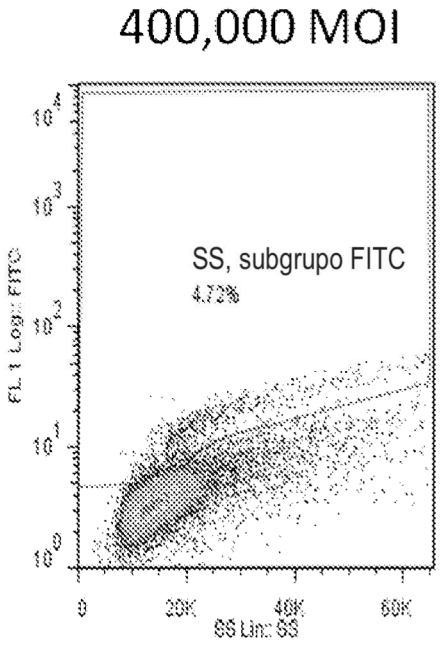
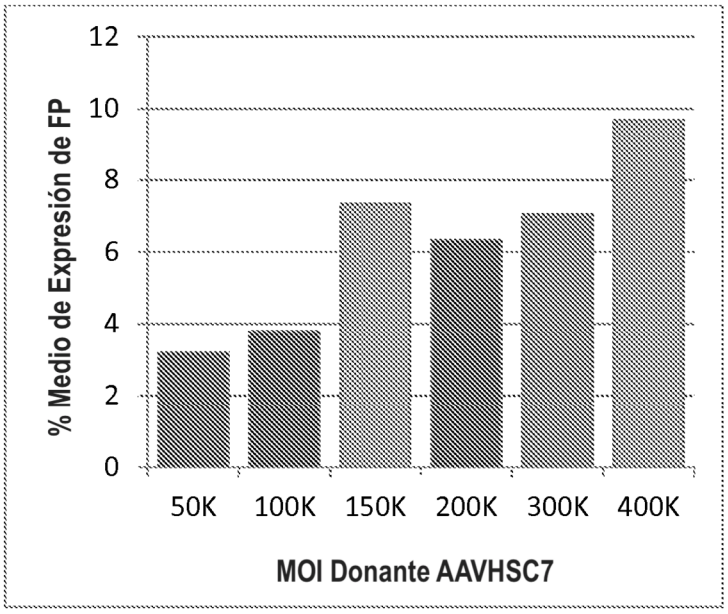


Figura 7

A.


12
10
8
6
4
2
0
% Medio de Expresión de FP
50K
100K
150K
200K
300K
400K
MOI Donante AAVHSC7

B.

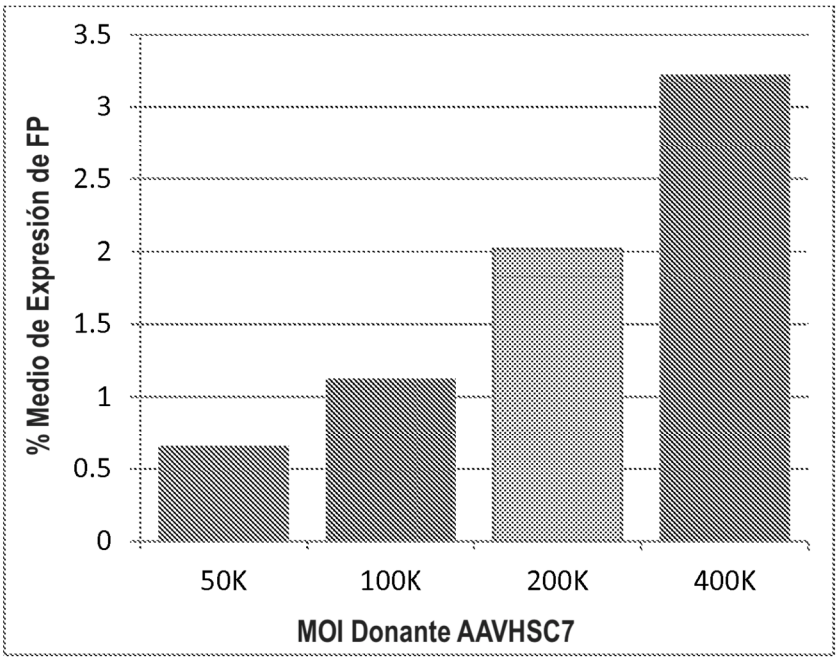
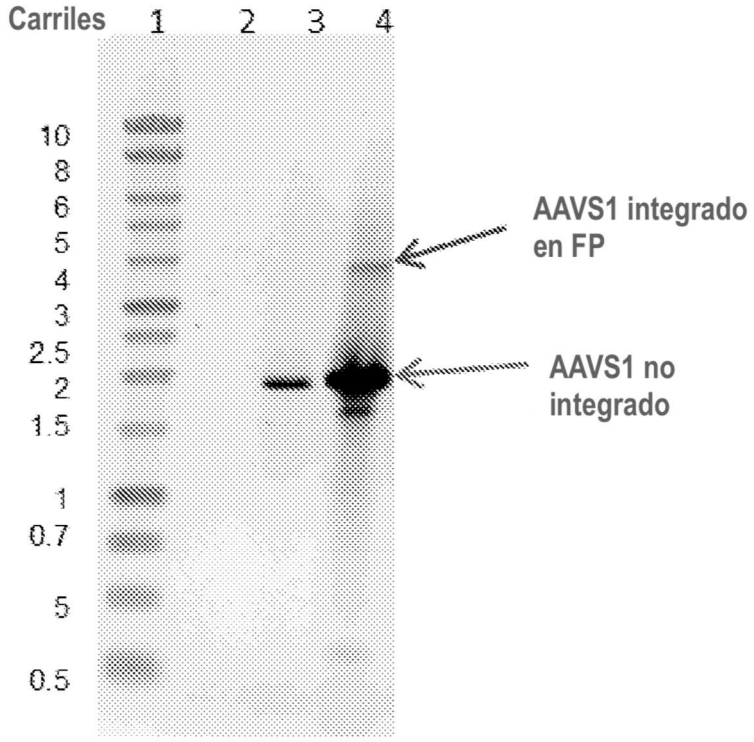

3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
% Medio de Expresión de FP
50K
100K
200K
400K
MOI Donante AAVHSC7

Figura 8

A.


Carriles 1 2 3 4
10
8
6
5
4
3
2.5
2
1.5
1
0.7
5
0.5
AAVS1 integrado en FP
AAVS1 no integrado

B.

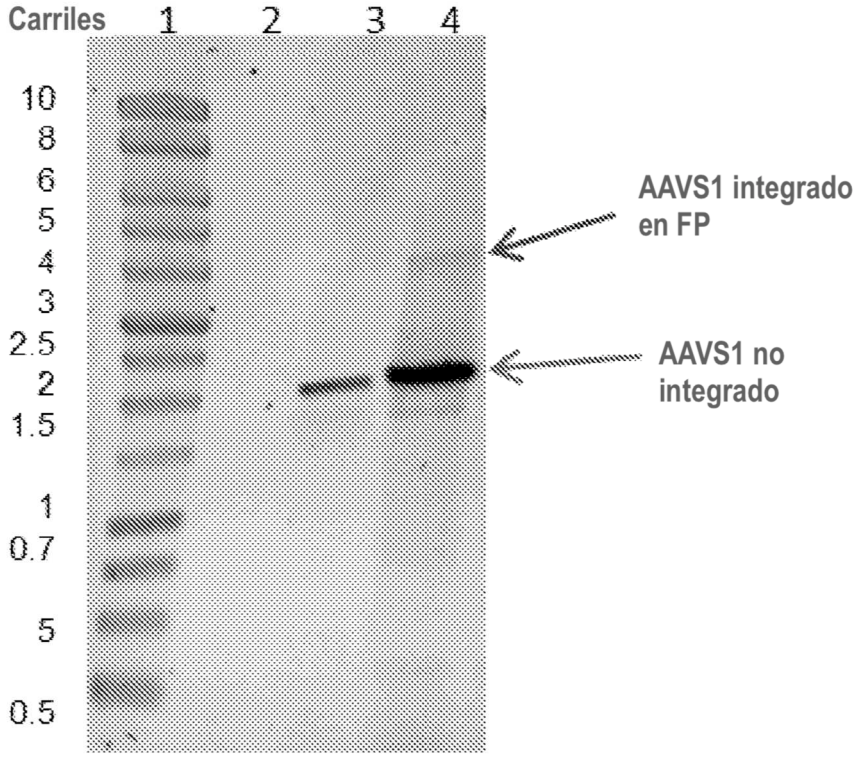
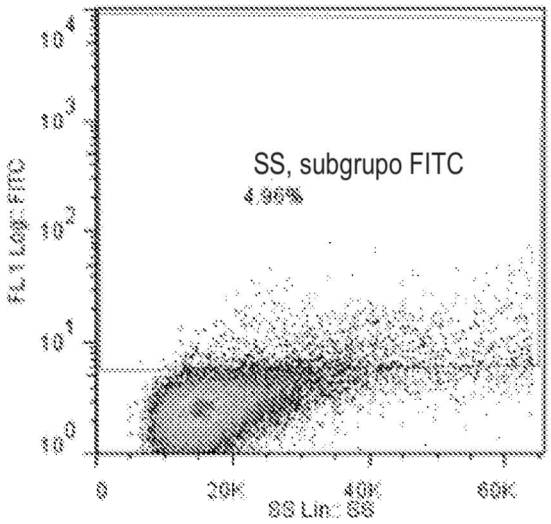
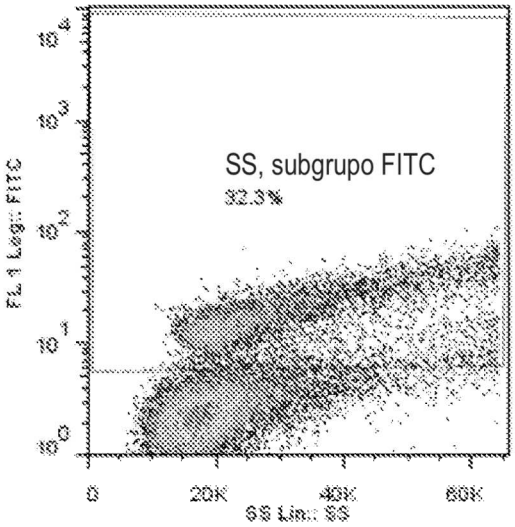

Carriles 1 2 3 4
10
8
6
5
4
3
2.5
2
1.5
1
0.7
5
0.5
AAVS1 integrado en FP
AAVS1 no integrado

Figura 9

A.


SS, subgrupo FITC
4.96%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

B.


SS, subgrupo FITC
32.3%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

C.

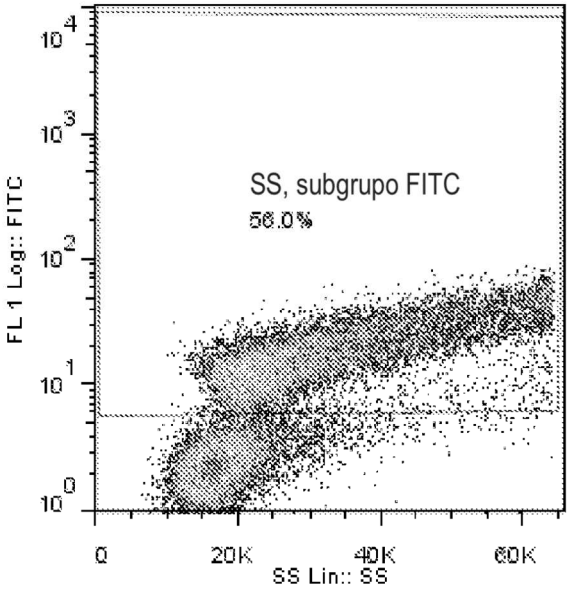
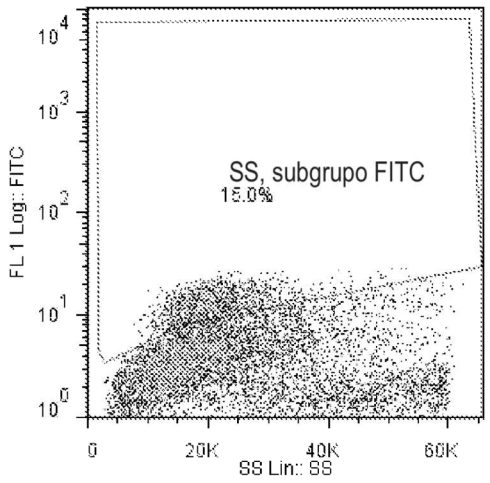
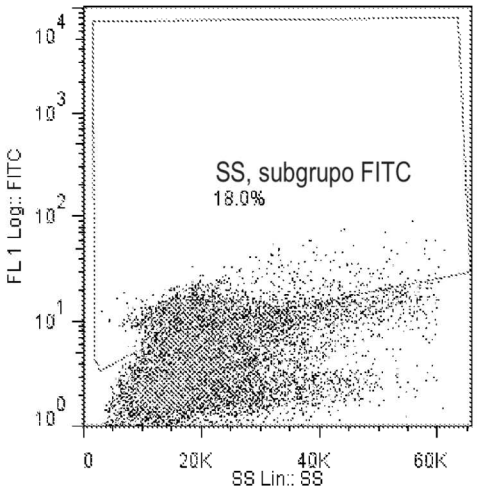

SS, subgrupo FITC
56.0%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

Figura 10

A.



B.



C.

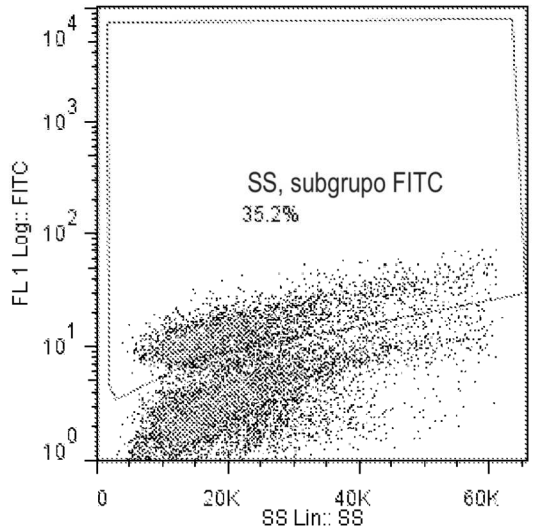
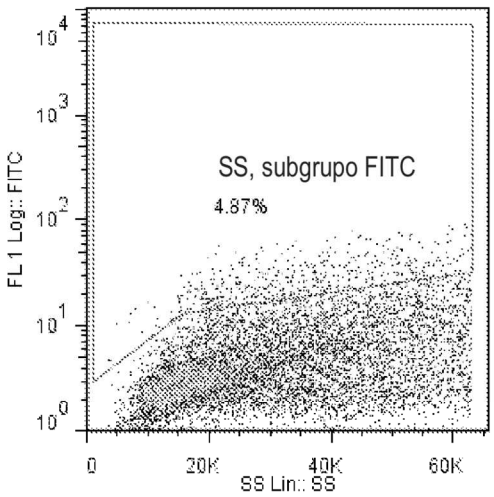
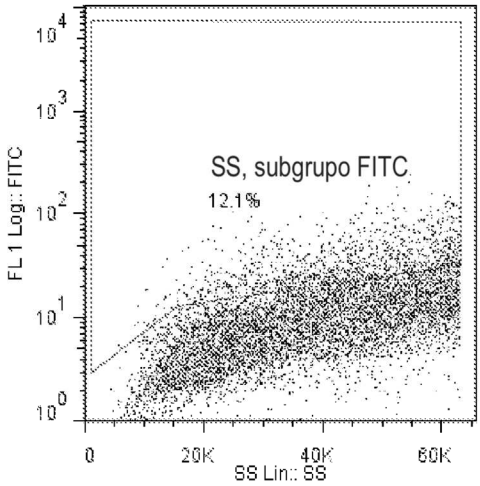


Figura 11

A.



B.



C.

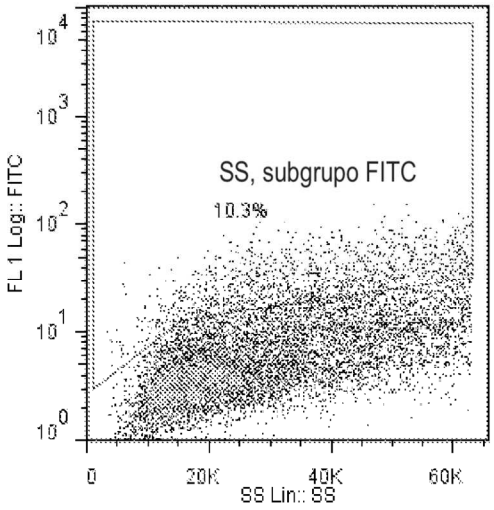


Figura 12

A.

% Células Positivas a FP

	Día 4	Día 18	Día 20	Día 39
Sin transducción	0	0	0	0
Donante de AAVHSC7 FP	3	7.23	4.07	4.61
Donante de AAVHSC17 FP	20.2	5.43	2.85	9.18

B.

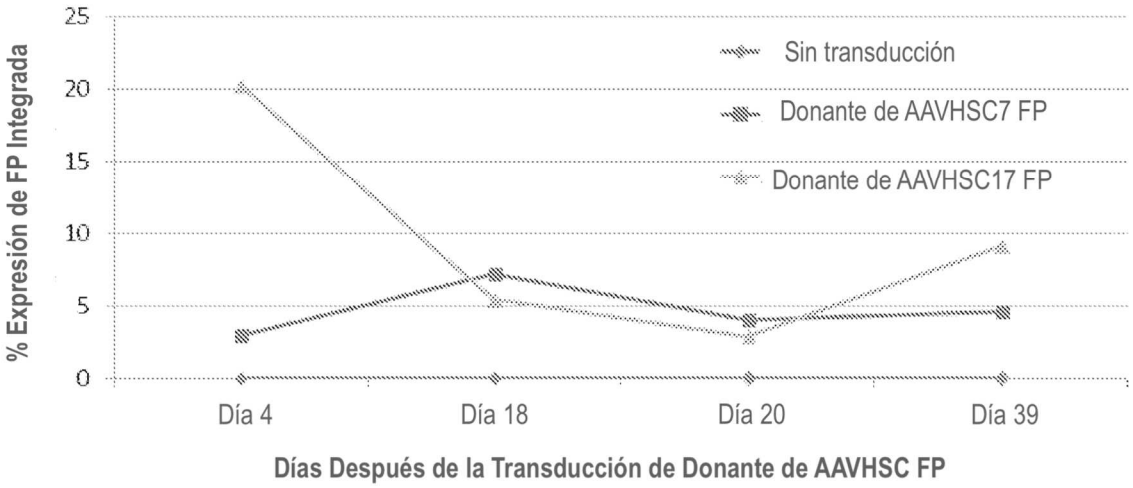


Figura 13

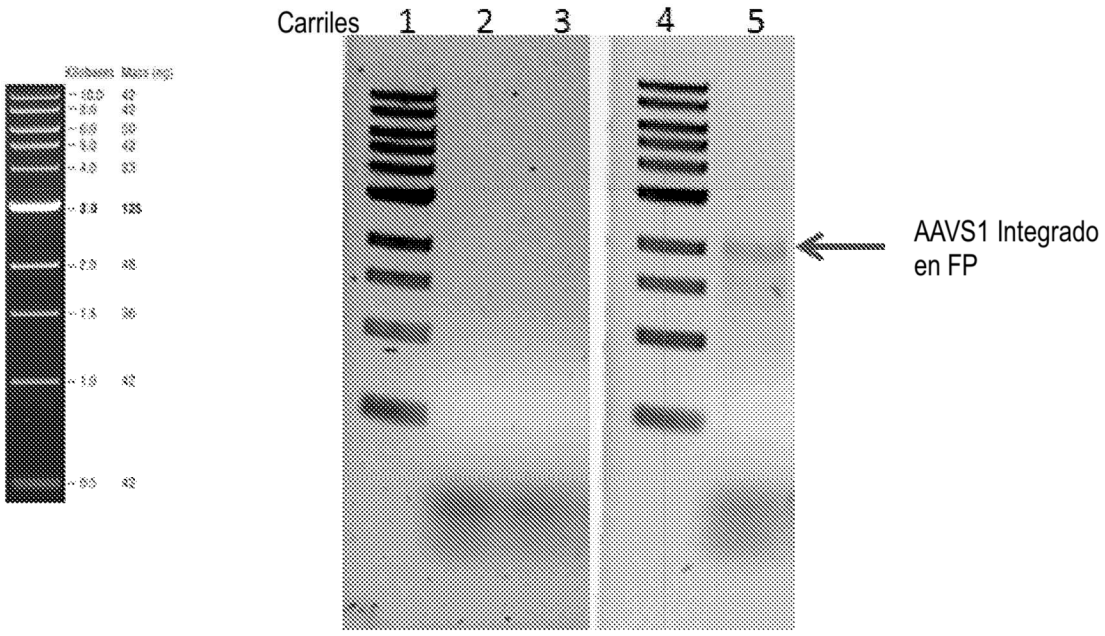


Figura 14

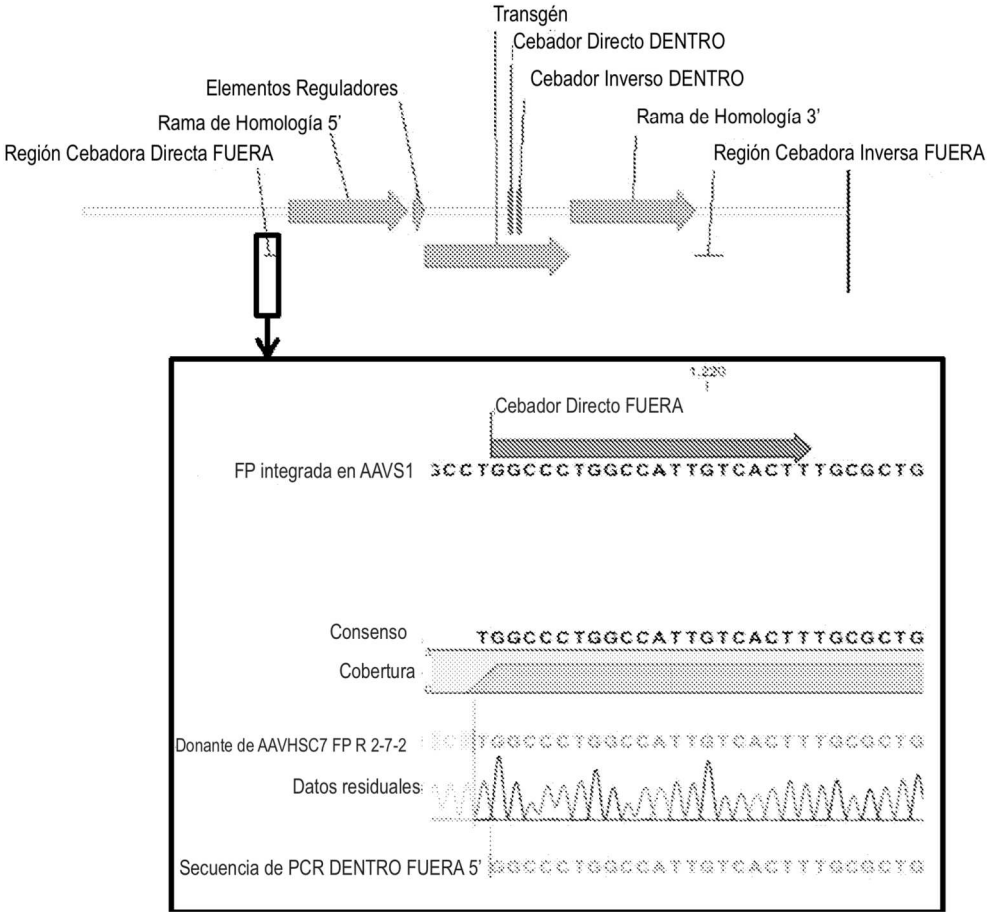

Transgén
Cebador Directo DENTRO
Cebador Inverso DENTRO
Elementos Reguladores
Rama de Homología 5'
Rama de Homología 3'
Región Cebadora Directa FUERA
Región Cebadora Inversa FUERA
Cebador Directo FUERA
FP integrada en AAVS1
Consenso
Cobertura
Donante de AAVHSC7 FP R 2-7-2
Datos residuales
Secuencia de PCR DENTRO FUERA 5'

Figura 15

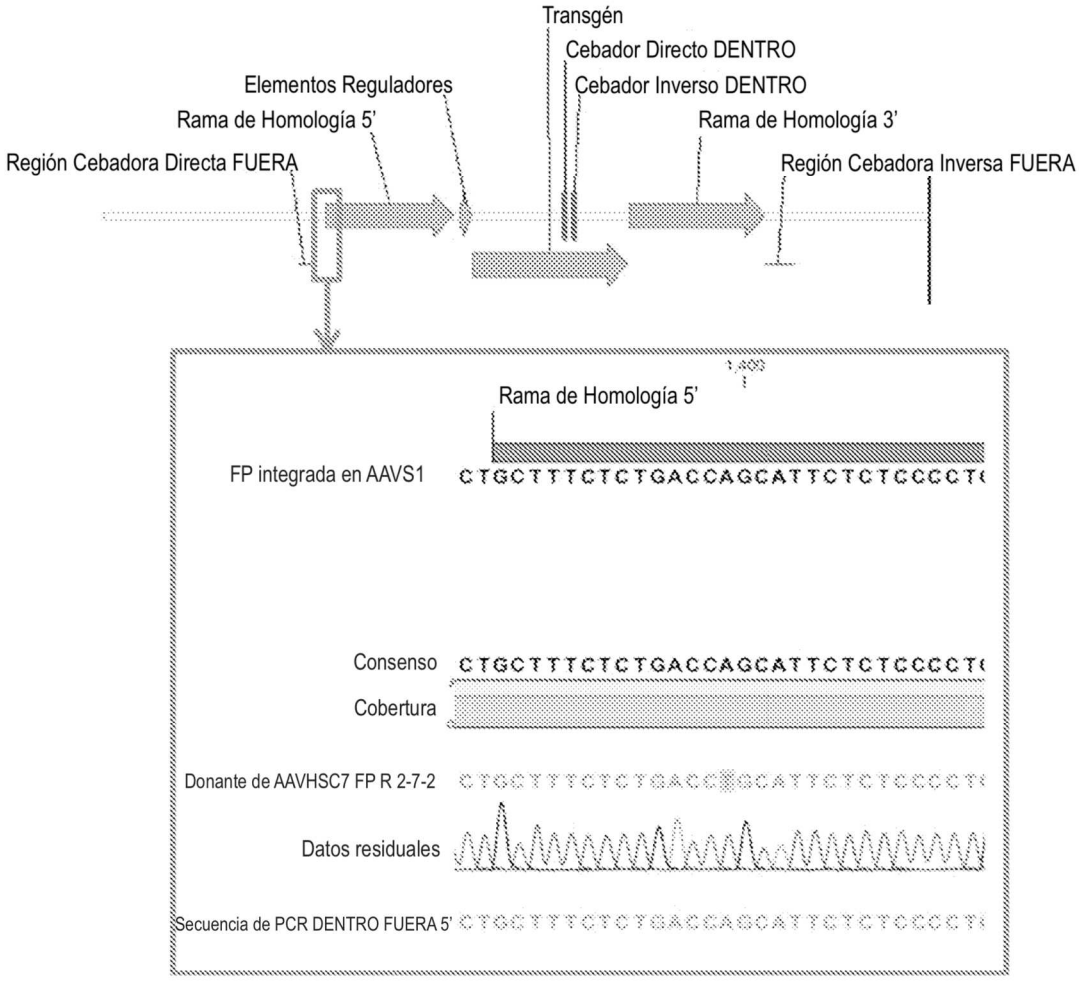

Transgén
Cebador Directo DENTRO
Elementos Reguladores
Cebador Inverso DENTRO
Rama de Homología 5'
Rama de Homología 3'
Región Cebadora Directa FUERA
Región Cebadora Inversa FUERA
Rama de Homología 5'
FP integrada en AAVS1
CTGCTTTCTCTGACCAGCATTCTCTCCCCTC
Consenso
CTGCTTTCTCTGACCAGCATTCTCTCCCCTC
Cobertura
Donante de AAVHSC7 FP R 2-7-2
Datos residuales
Secuencia de PCR DENTRO FUERA 5'

Figura 16

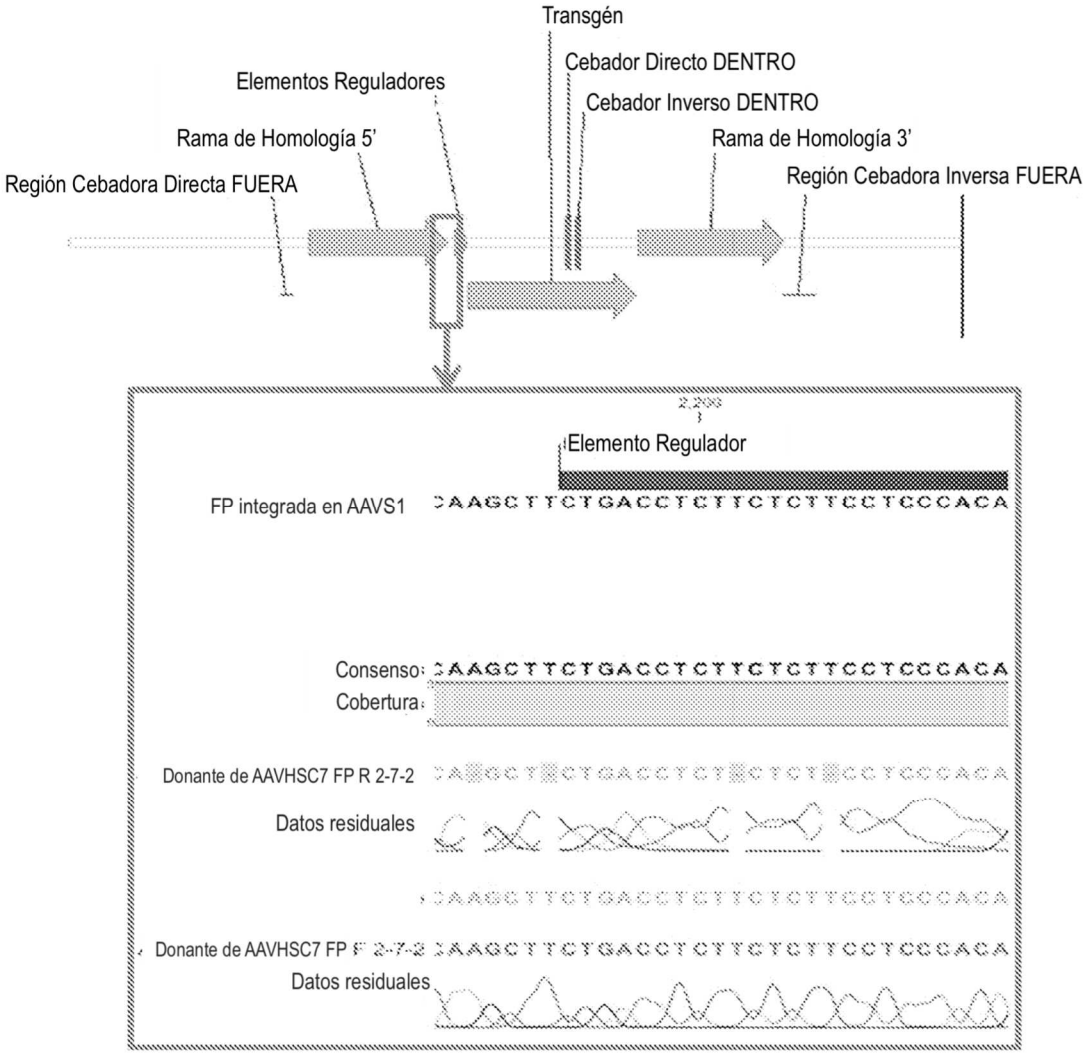

Transgén
Cebador Directo DENTRO
Elementos Reguladores
Cebador Inverso DENTRO
Rama de Homología 5'
Rama de Homología 3'
Región Cebadora Directa FUERA
Región Cebadora Inversa FUERA
2.200
Elemento Regulador
FP integrada en AAVS1
Consenso
Cobertura
Donante de AAVHSC7 FP R 2-7-2
Datos residuales
Donante de AAVHSC7 FP
Datos residuales

Figura 17

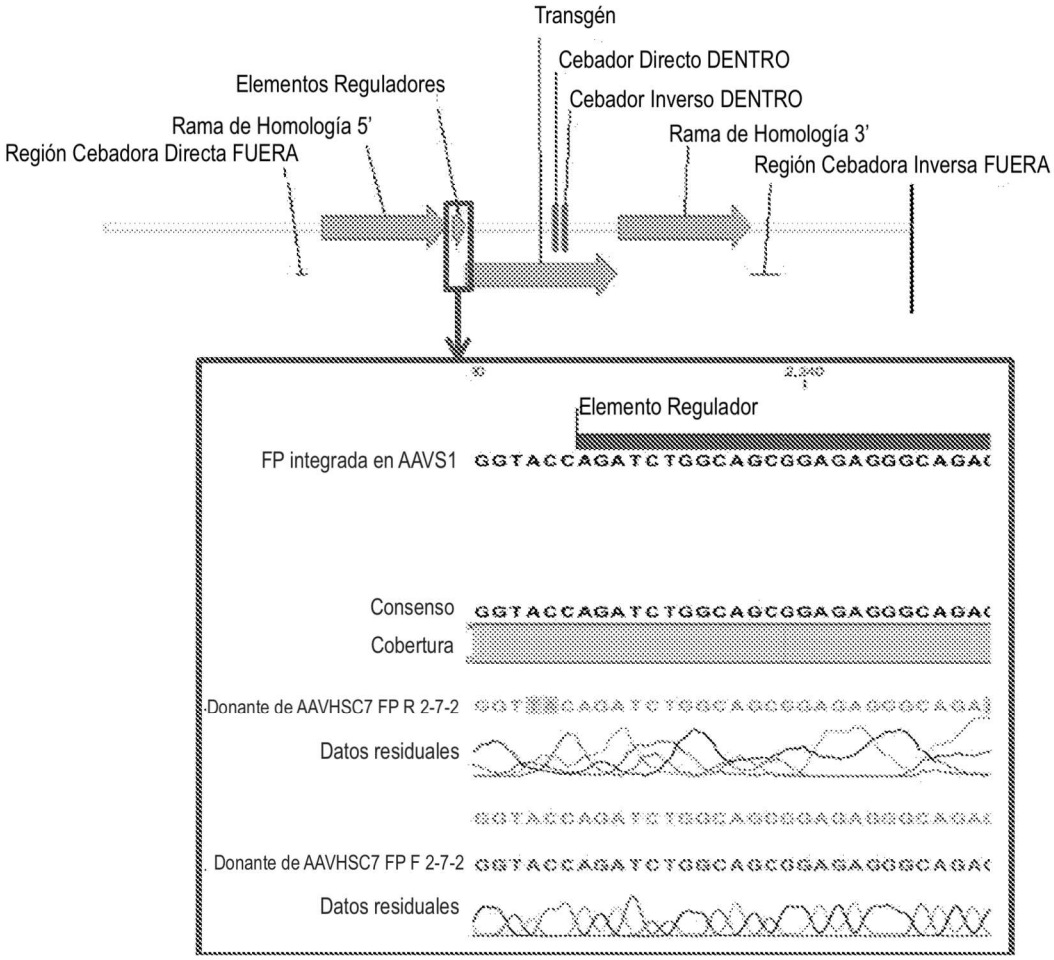

Transgén
Cebador Directo DENTRO
Elementos Reguladores
Cebador Inverso DENTRO
Rama de Homología 5'
Rama de Homología 3'
Región Cebadora Directa FUERA
Región Cebadora Inversa FUERA
Elemento Regulador
FP integrada en AAVS1
Consenso
Cobertura
Donante de AAVHSC7 FP R 2-7-2
Datos residuales
Donante de AAVHSC7 FP F 2-7-2
Datos residuales

Figura 18

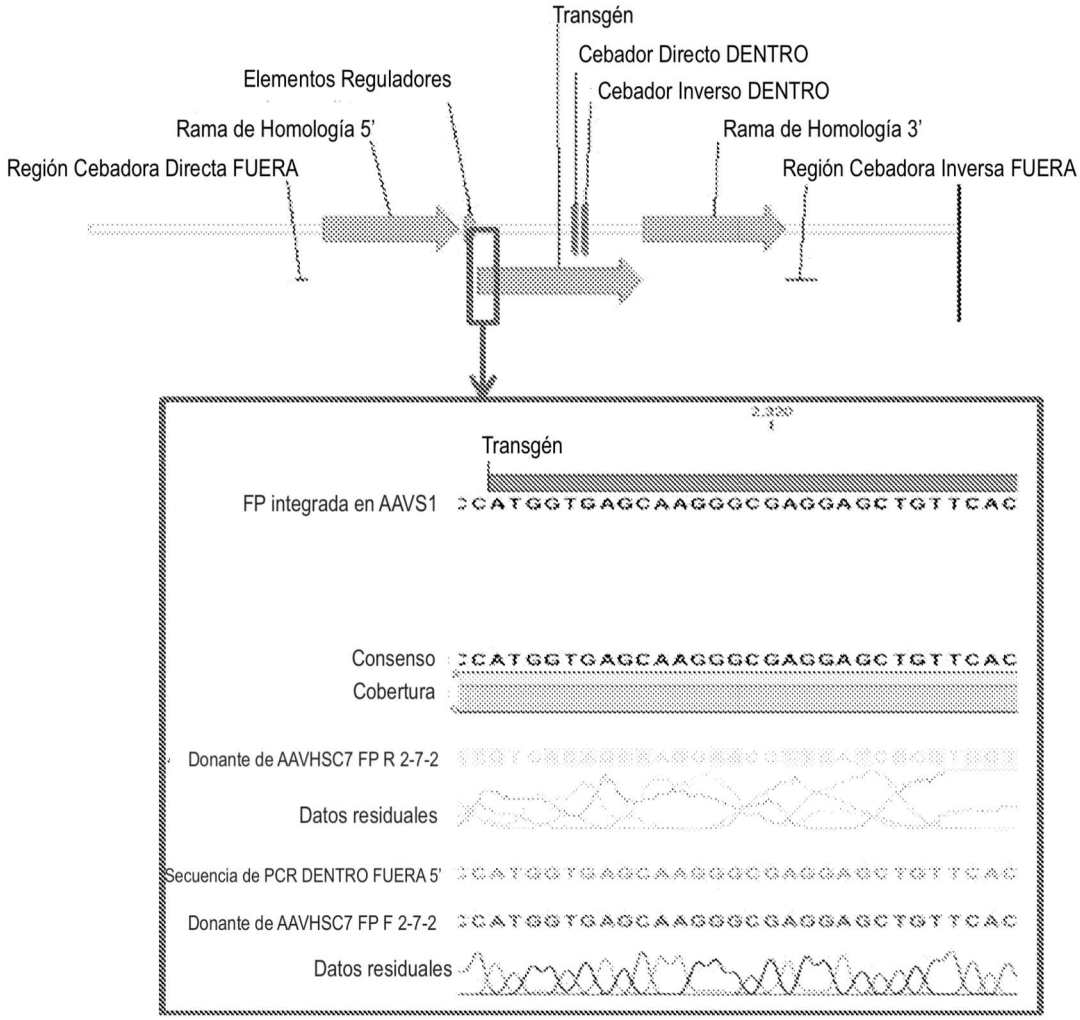

Transgén
Cebador Directo DENTRO
Cebador Inverso DENTRO
Elementos Reguladores
Rama de Homología 5'
Rama de Homología 3'
Región Cebadora Directa FUERA
Región Cebadora Inversa FUERA
Transgén
FP integrada en AAVS1
Consenso
Cobertura
Donante de AAVHSC7 FP R 2-7-2
Datos residuales
Secuencia de PCR DENTRO FUERA 5'
Donante de AAVHSC7 FP F 2-7-2
Datos residuales

Figura 19

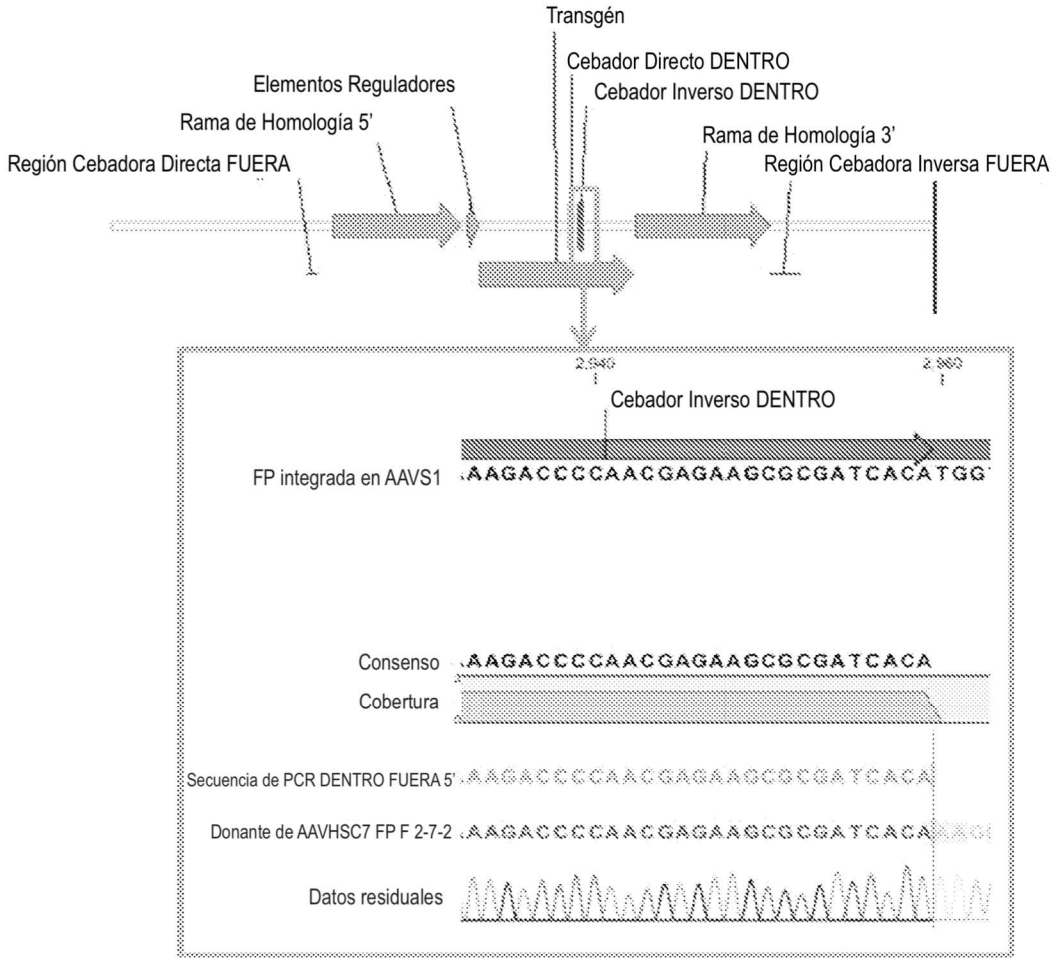

Transgén
Cebador Directo DENTRO
Cebador Inverso DENTRO
Elementos Reguladores
Rama de Homología 5'
Rama de Homología 3'
Región Cebadora Directa FUERA
Región Cebadora Inversa FUERA
2.940
2.960
Cebador Inverso DENTRO
FP integrada en AAVS1
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGG
Consenso
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA
Cobertura
Secuencia de PCR DENTRO FUERA 5'
Donante de AAVHSC7 FP F 2-7-2
Datos residuales

Figura 20

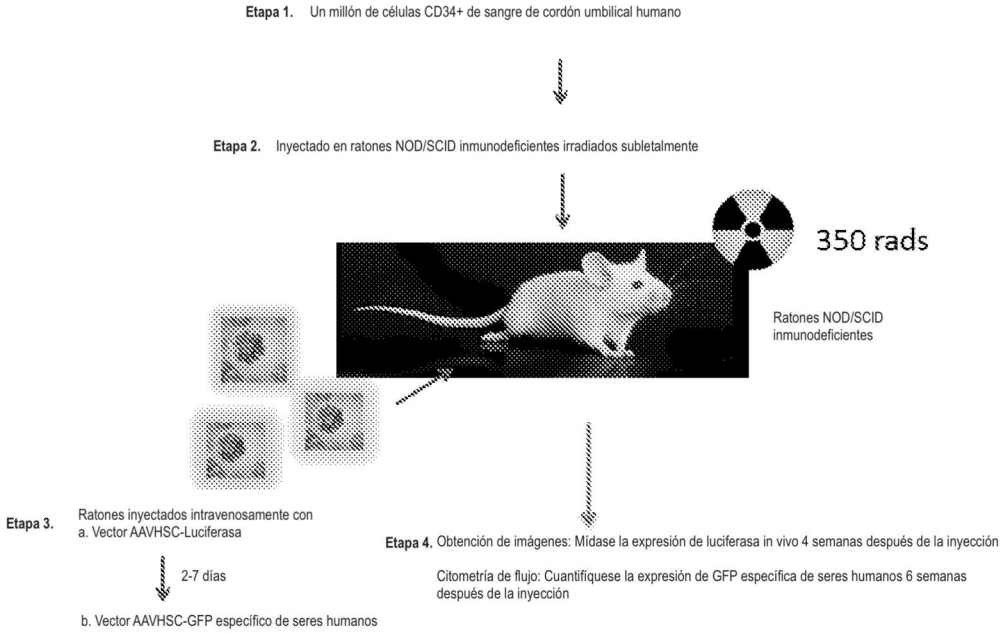

Etapa 1. Un millón de células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano
Etapa 2. Inyectado en ratones NOD/SCID inmunodeficientes irradiados subletalmente
350 rads
Ratones NOD/SCID inmunodeficientes
Etapa 3. Ratones inyectados intravenosamente con
a. Vector AAVHSC-Luciferasa
2-7 días
b. Vector AAVHSC-GFP específico de seres humanos
Etapa 4. Obtención de imágenes: Mídase la expresión de luciferasa in vivo 4 semanas después de la inyección
Citometría de flujo: Cuantifíquese la expresión de GFP específica de seres humanos 6 semanas después de la inyección

Figura 21

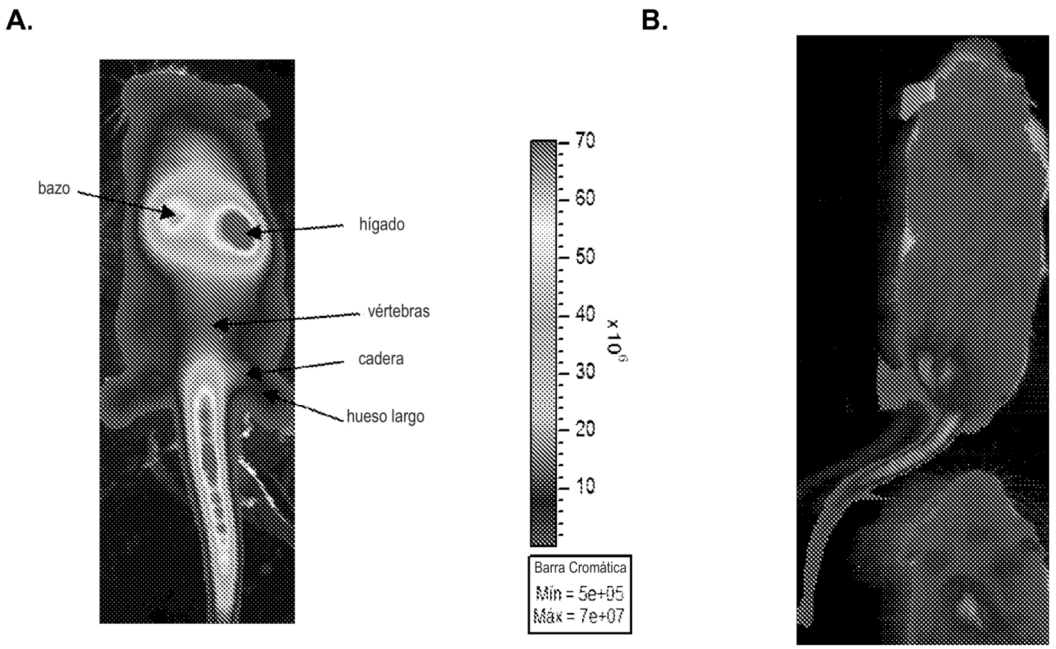
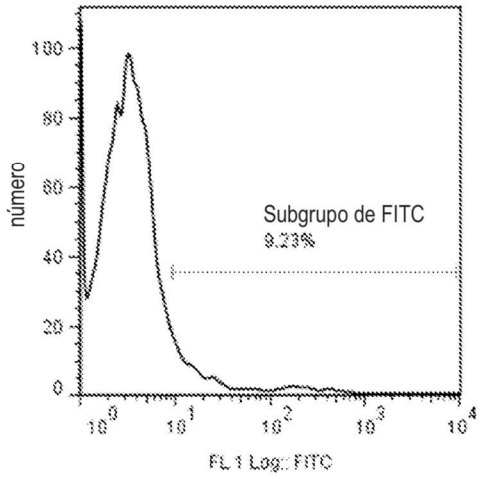
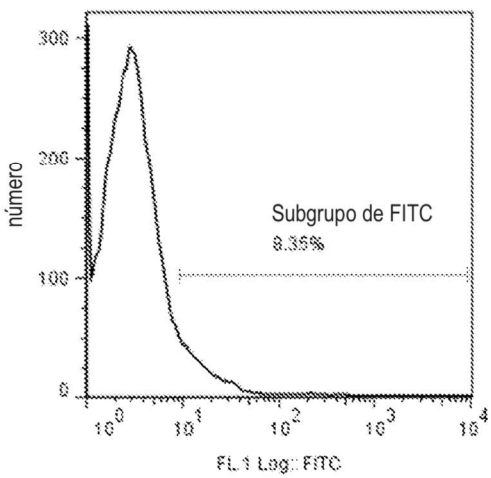

A.
B.
bazo
hígado
vértebras
cadera
hueso largo
70
60
50
40
30
20
10
x10⁶
Barra Cromática
Mín = 5e+05
Máx = 7e+07

Figura 22

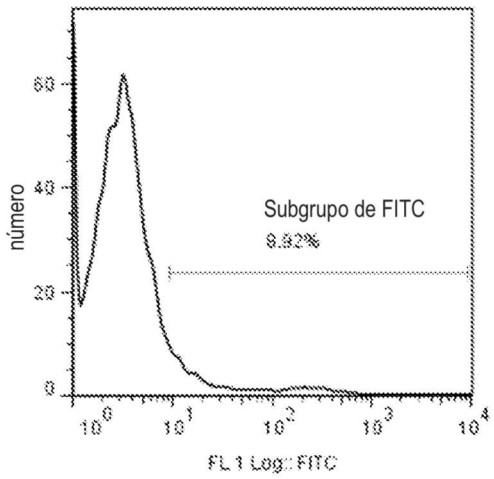
A.



B.



C.



D.

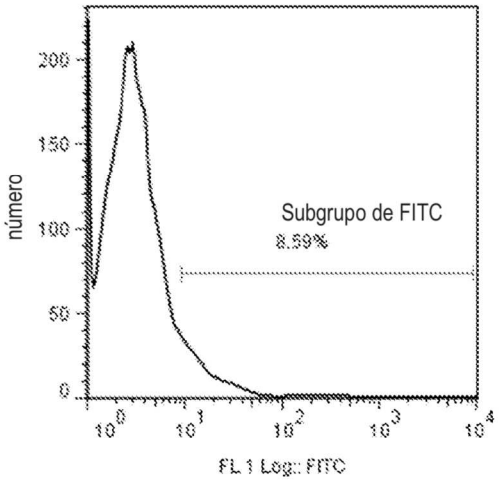
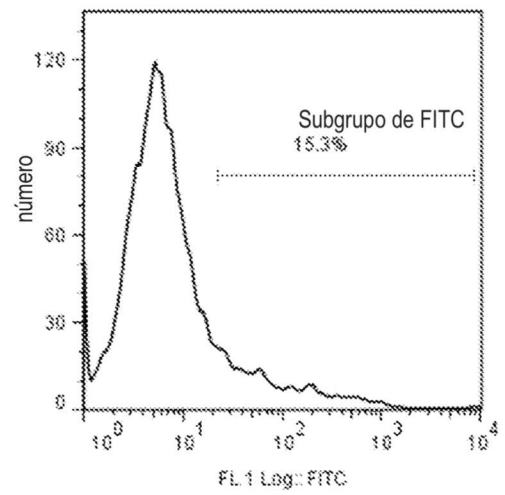
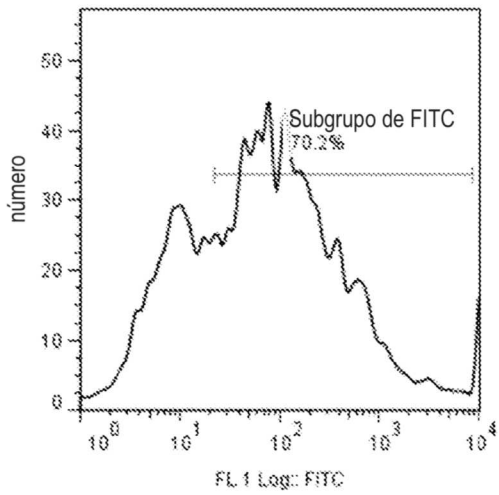


Figura 22 (cont.)

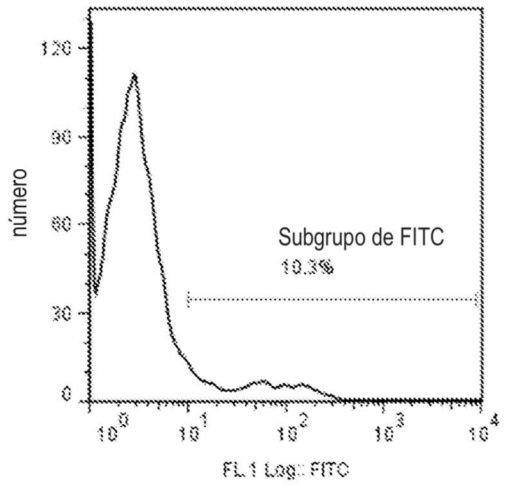
E.



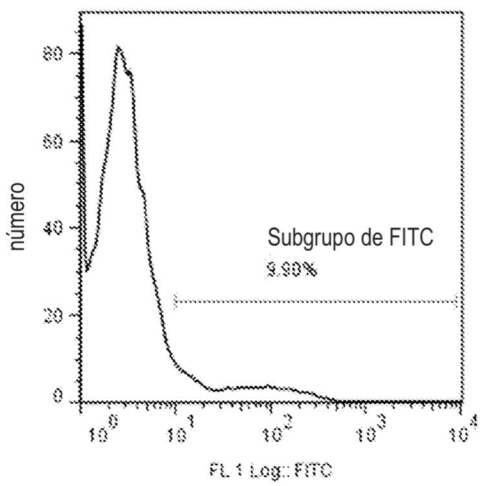
F.

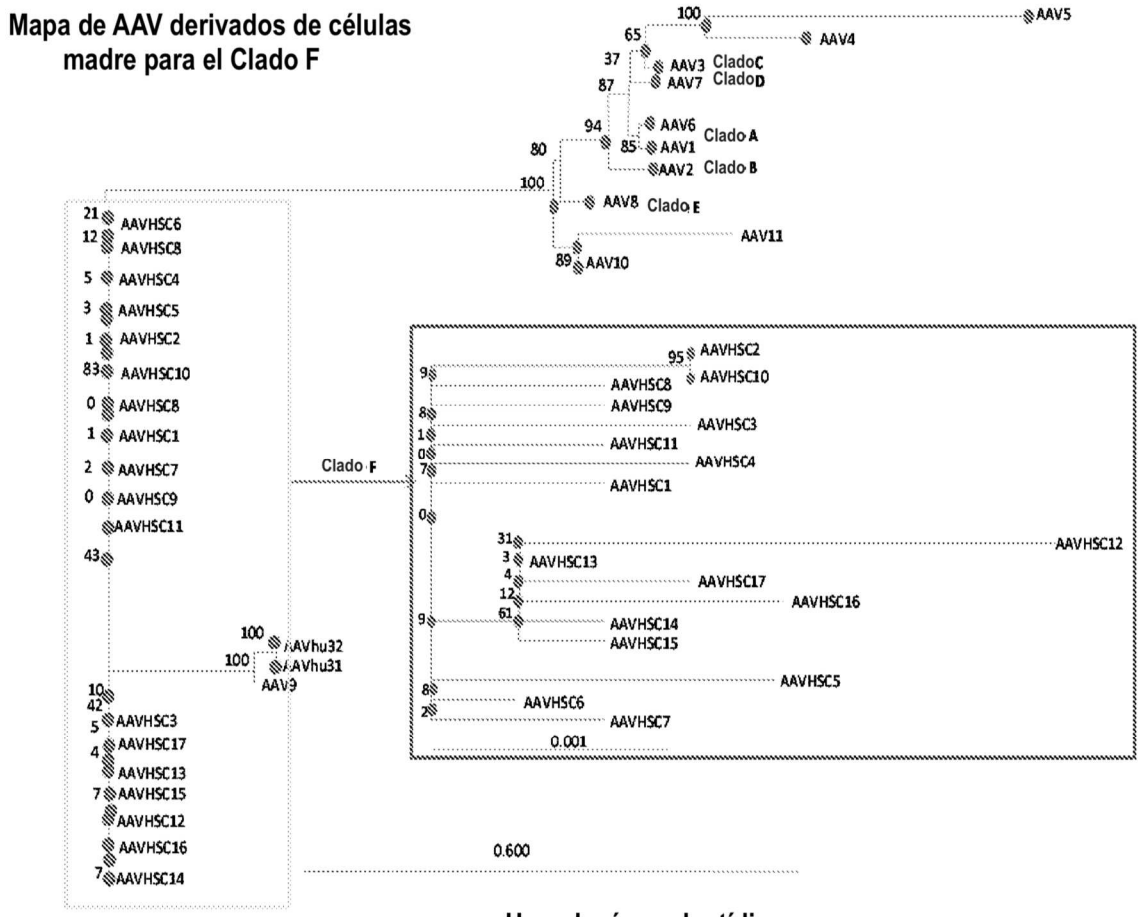


G.



H.





- Homología nucleotídica

Figura 23

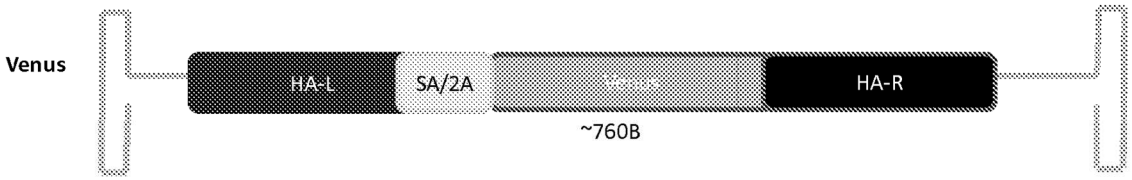


Figura 24

Esquema: Integración dirigida de Indicador sin Promotor en el INTRÓN PPP1r12C (AAVS1)

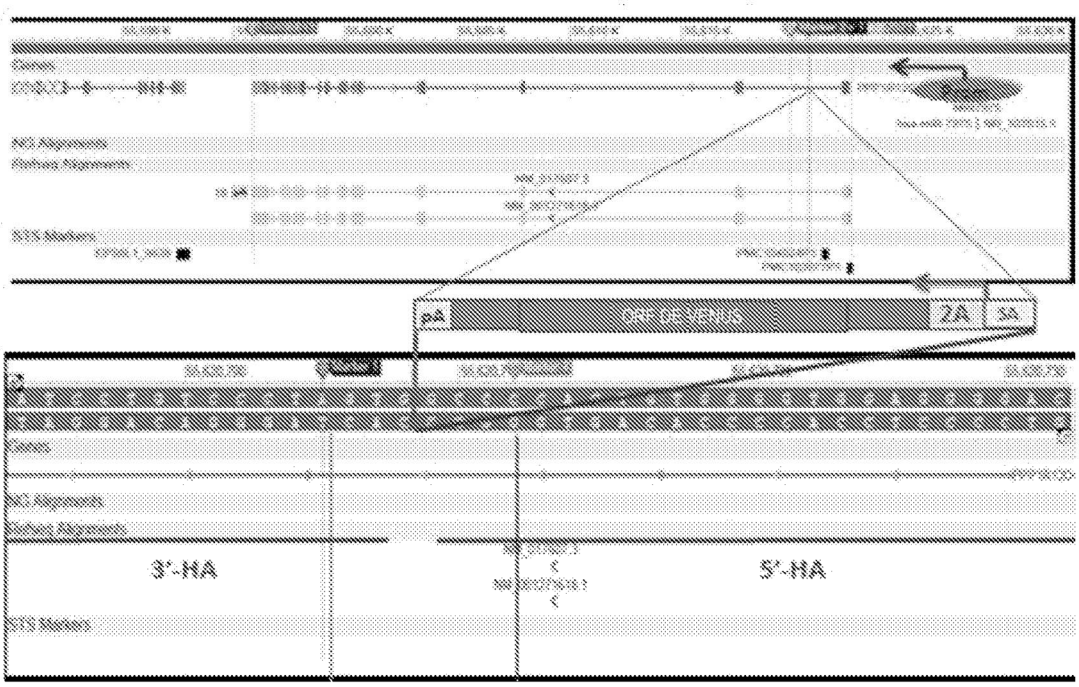


Figura 25

Figura 26A

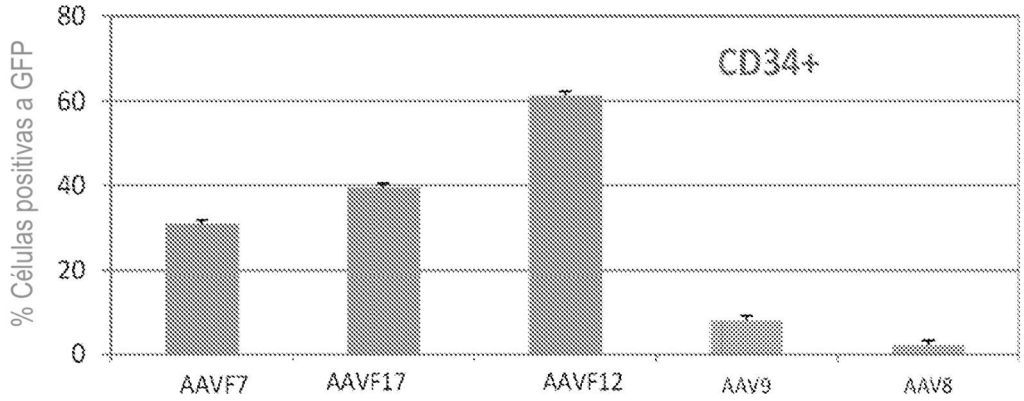


Figura 26B

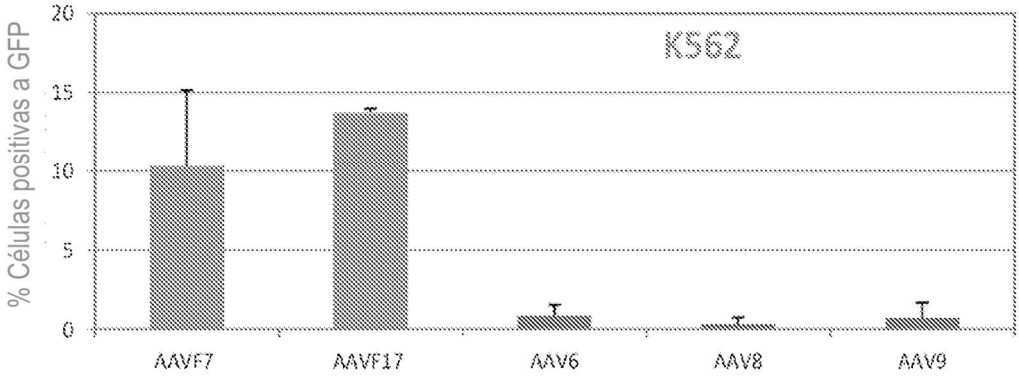
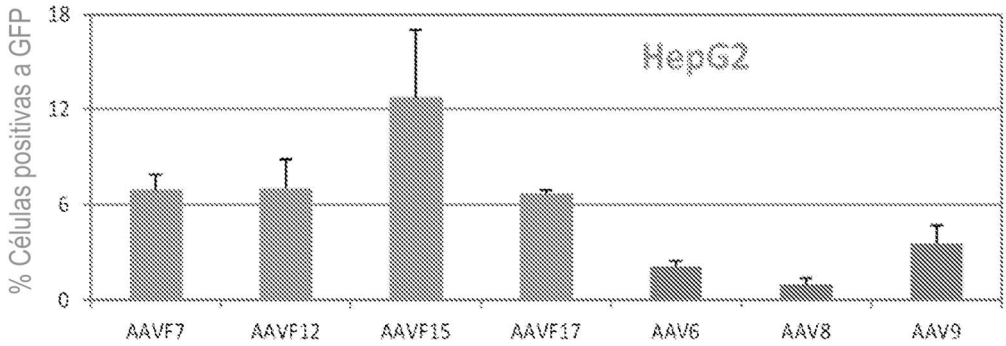
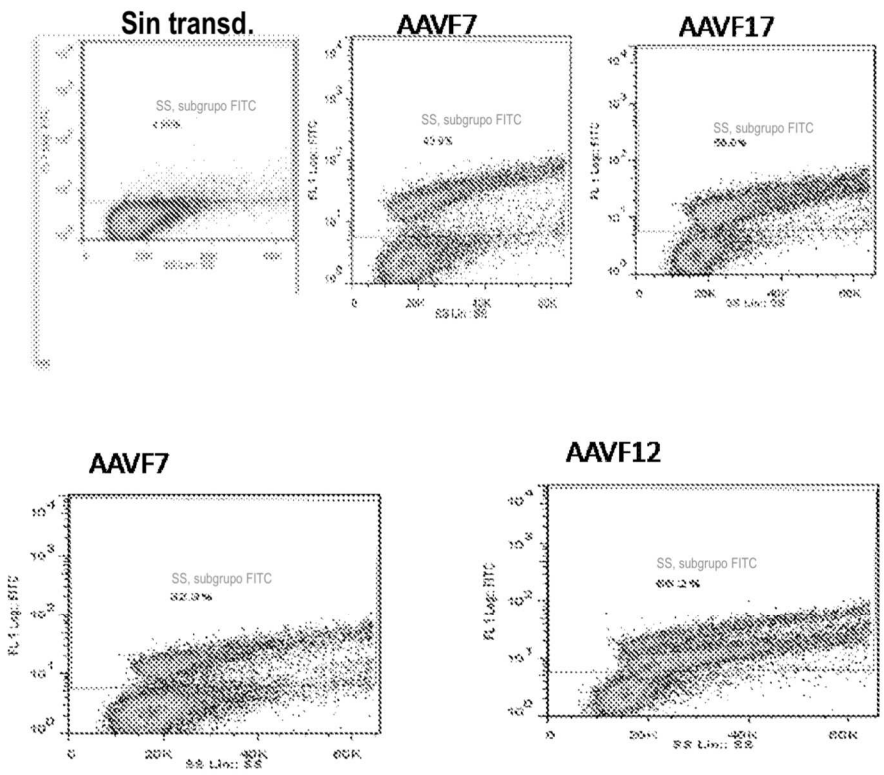


Figura 26C





- **AAVF media en el direccionamiento génico eficaz en células CD34+ primarias**
- **Se observa direccionamiento de alta eficacia en líneas celulares leucémicas y hepáticas humanas**
- **La edición de AAVF no requiere síntesis de ADN**

Figura 26D

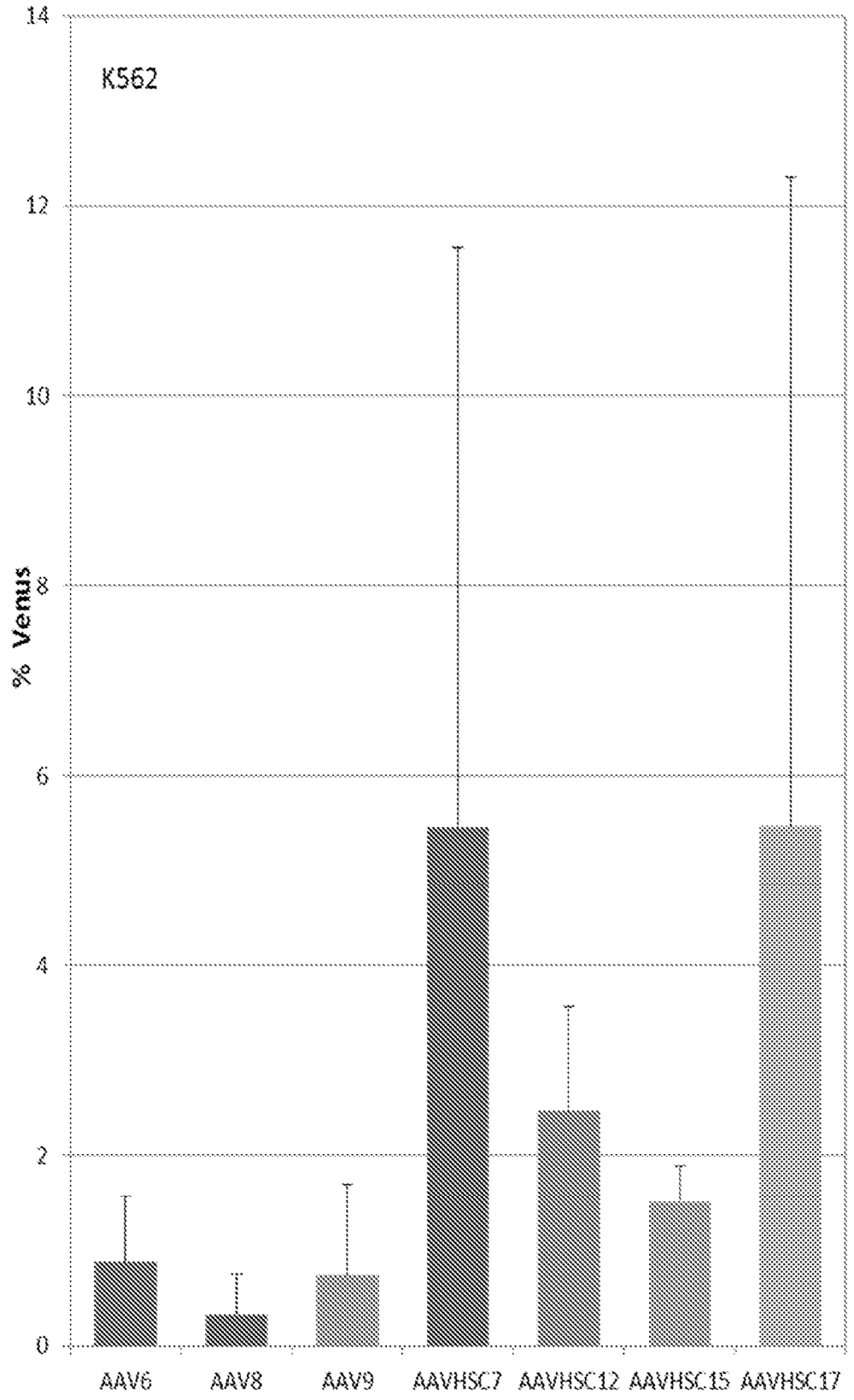

K562
% Venus
14
12
10
8
6
4
2
0
AAV6
AAV8
AAV9
AAVHSC7
AAVHSC12
AAVHSC15
AAVHSC17

Figura 26E

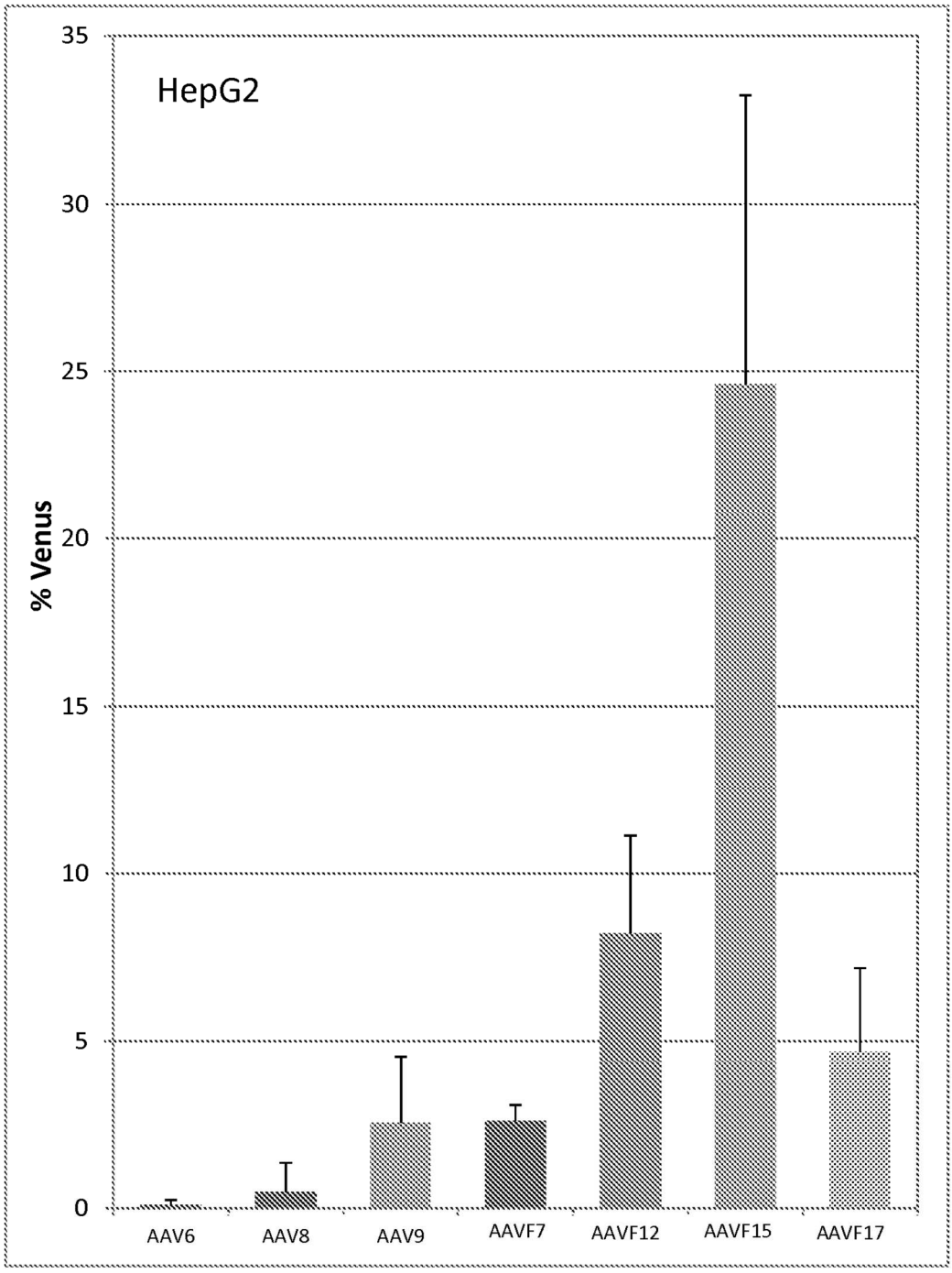

HepG2
% Venus
35
30
25
20
15
10
5
0
AAV6
AAV8
AAV9
AAVF7
AAVF12
AAVF15
AAVF17

Figura 26F

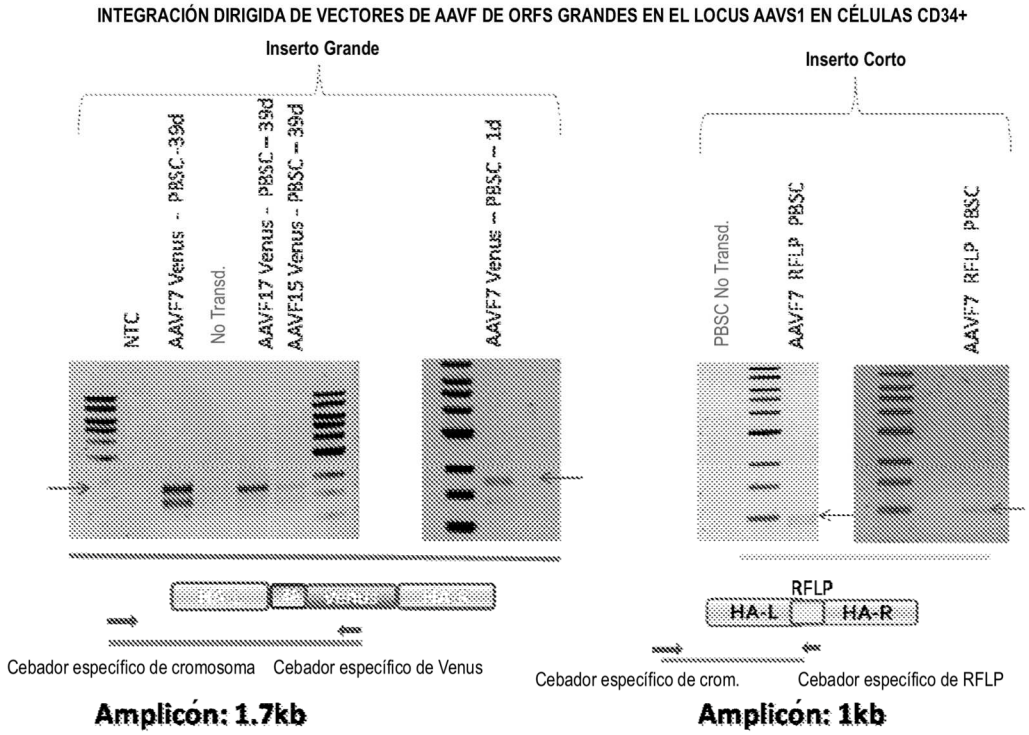
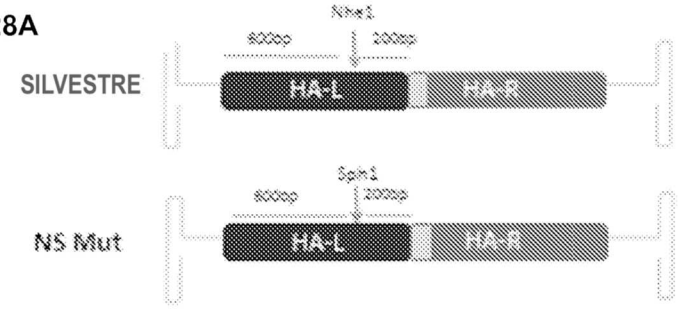


Figura 27

HA-L: Rama de Homología 5'
HA-R: Rama de Homología 3'
NTC: Control Sin Plantilla
No Transd.: Células No Transducidas

VECTORES DE AAVF PARA SUSTITUCIÓN DE NUCLEÓTIDOS

Figura 28A



- Muta TA en AT
- Cambia un sitio Nhe1 por un sitio Sph1

Nhe 1 ⟶ Sph 1
GCTAGC ⟶ GCATGC

Figura 28B

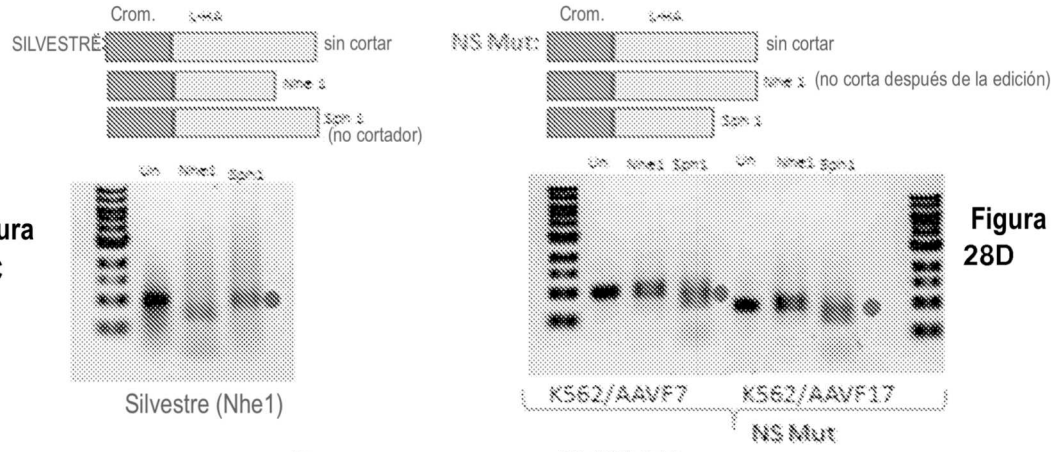
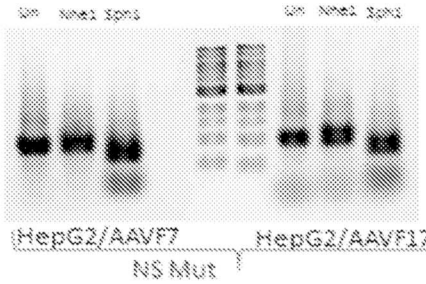


Figura 28C

Figura 28D

Figura 28E



RFLP: Nhe1 corta. Sph1 no corta
NS Mut: Sph 1 corta. Nhe 1 no corta

AAVF MEDIA EN LA SUSTITUCIÓN DE NUCLEÓTIDOS PRECISA

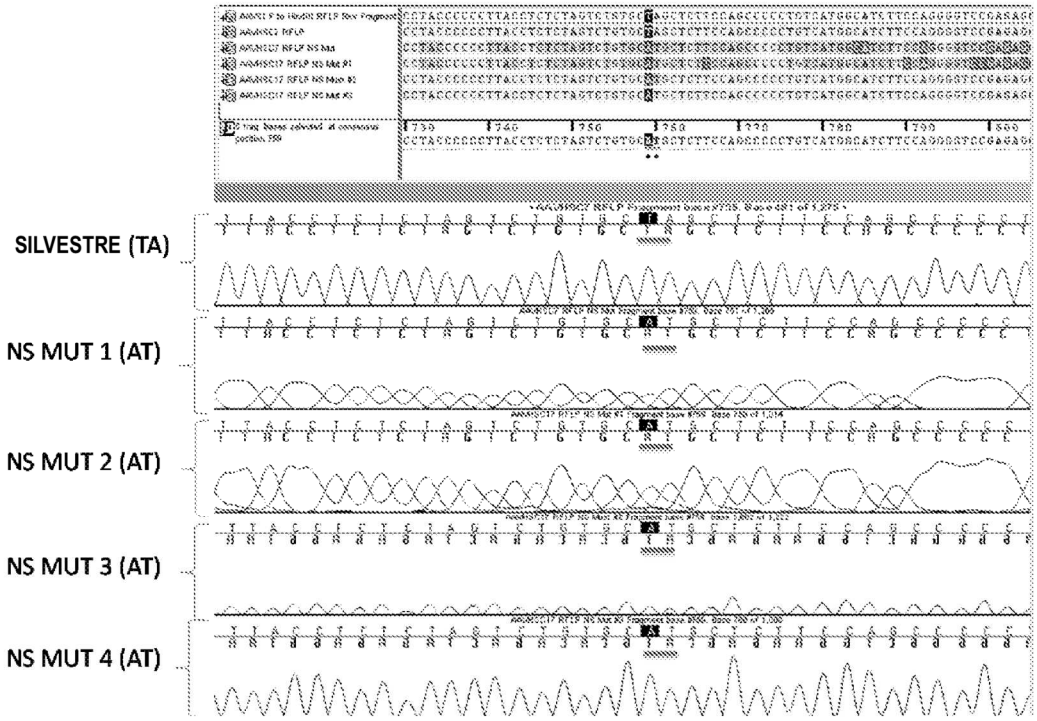


Figura 29

	GFP+ BrdU- (Células que No se Dividen)	GFP+BrdU+ (Células que se Dividen)
AAVHSC7	**12**	14.6
AAVHSC17	**6.15**	6.9
AAV9	**4.31**	3.73
AAV8	**1.37**	0.839

Figura 30

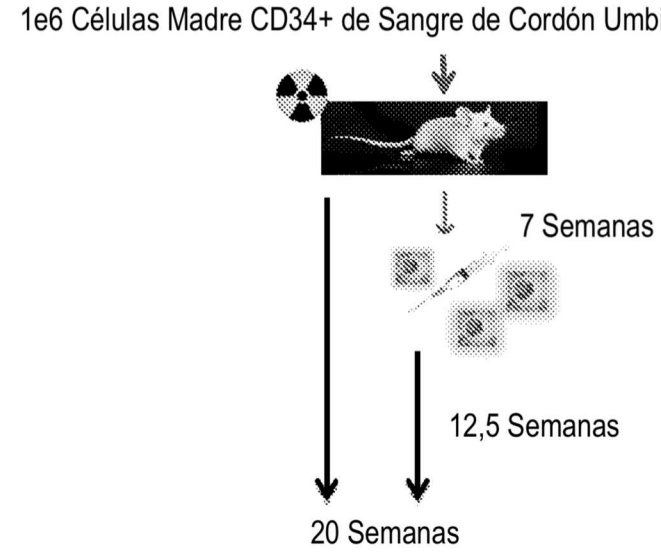


Figura 31A

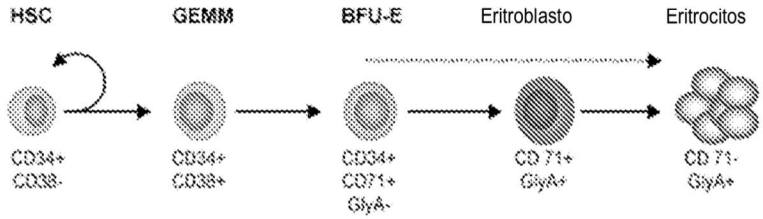


Figura 31B

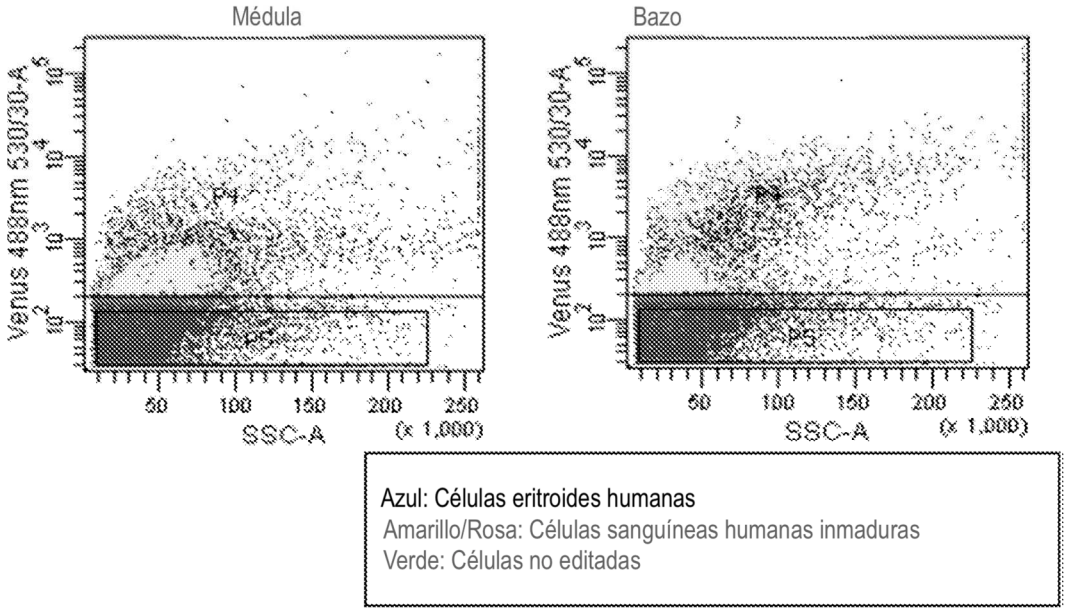
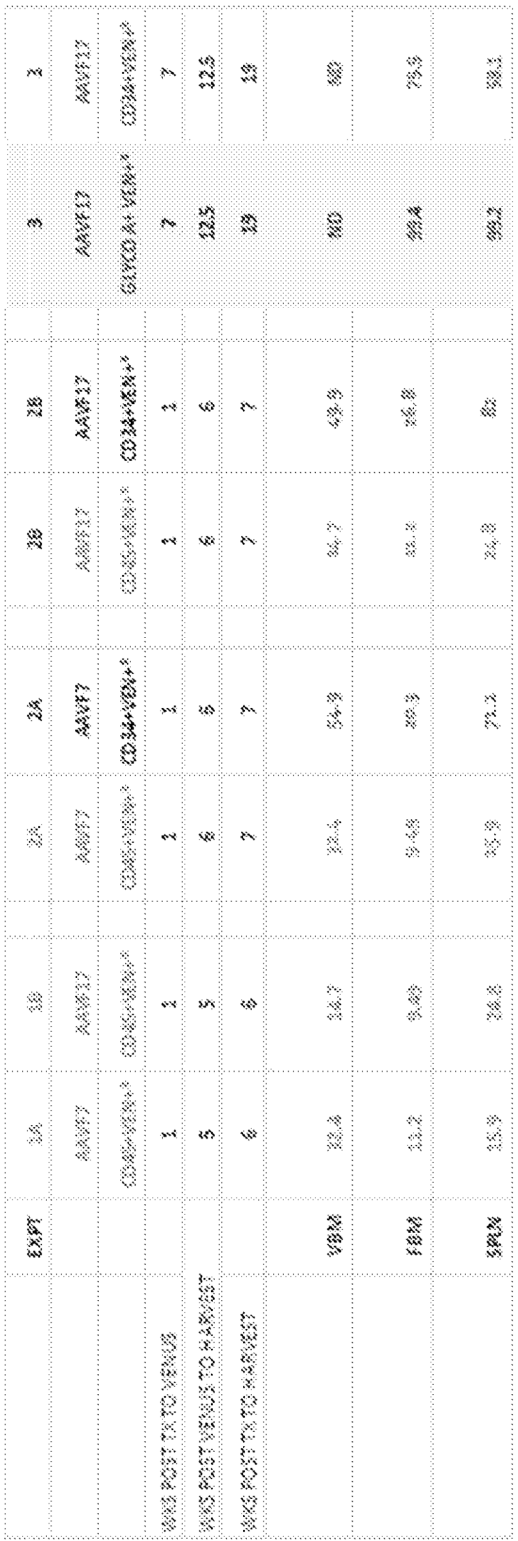

Médula
Bazo
Venus 488nm 530/30-A
SSC-A
(x 1,000)
P4
P5
Azul: Células eritroides humanas
Amarillo/Rosa: Células sanguíneas humanas inmaduras
Verde: Células no editadas

Figura 31C



	EXPT	1A	1B	2A	2A	2B	2B	3	3
		AAV57	AAV57	AAV57	AAV57	AAV57	AAV57	AAV57	AAV57
		CD45+VCN+	CD45+VCN+	CD45+VCN+	CD34+VCN+	CD45+VCN+	CD34+VCN+	GYPA+ VCN+	CD34+VCN+
WKS POST TXT TO VENUS		1	1	1	1	1	1	7	7
WKS POST VENUS TO HARVEST		5	5	6	6	6	6	125	125
WKS POST TXT TO HARVEST		6	6	7	7	7	7	19	19
	MEAN	10.4	14.7	12.4	54.8	34.7	48.9	ND	ND
	SEM	13.2	9.49	9.48	29.3	31.1	26.8	89.4	79.9
	SPAN	15.9	19.6	15.9	72.2	24.8	82	99.2	98.1

Figura 32A

% Positivas a Venus	Medio Plazo AAVF7 CD34+	Medio Plazo AAVF7 CD45+	Medio Plazo AAVF17 CD34+	Medio Plazo AAVF17 CD45+	Largo Plazo AAVF17 CD34+	Largo Plazo AAVF17 GlycoA+
Médula Vertebral	54.9	32.4	49.9	14.7	ND*	ND*
Médula Femoral	20.3	9.49	26.8	11.2	75.5	99.4
Bazo	71.1	15.9	82	24.8	58.1	99.2

* ND: No Realizado

Figura 32B

ANÁLISIS DE SECUENCIAS QUE MUESTRA LA INSERCIÓN CROMOSÓMICA DE VENUS EN EL INTRÓN 1 DE PPP1R12C MEDIANTE VECTORES DE AAVF

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DIRIGIDAS A AAV EN AAVS1

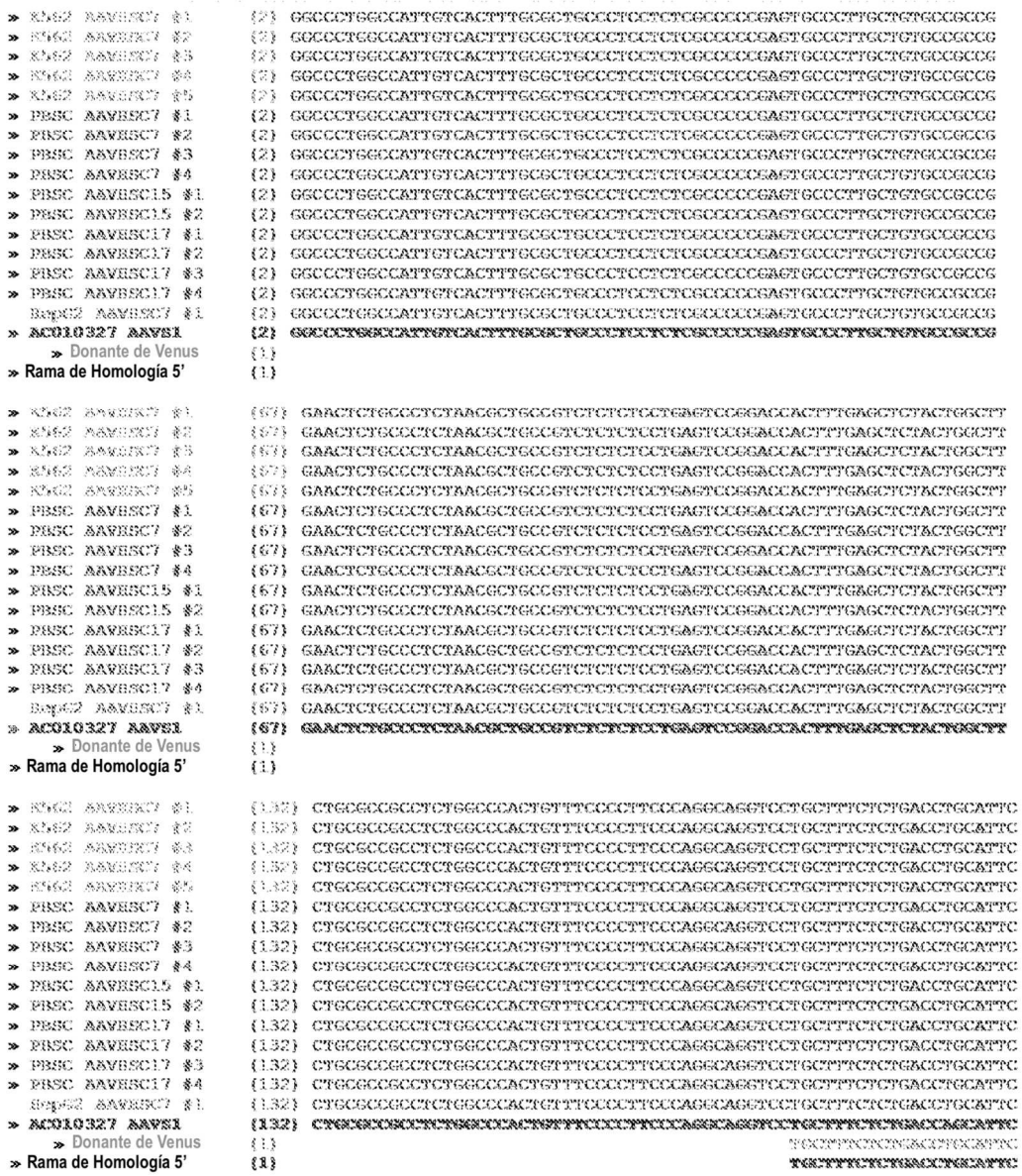


Figura 33

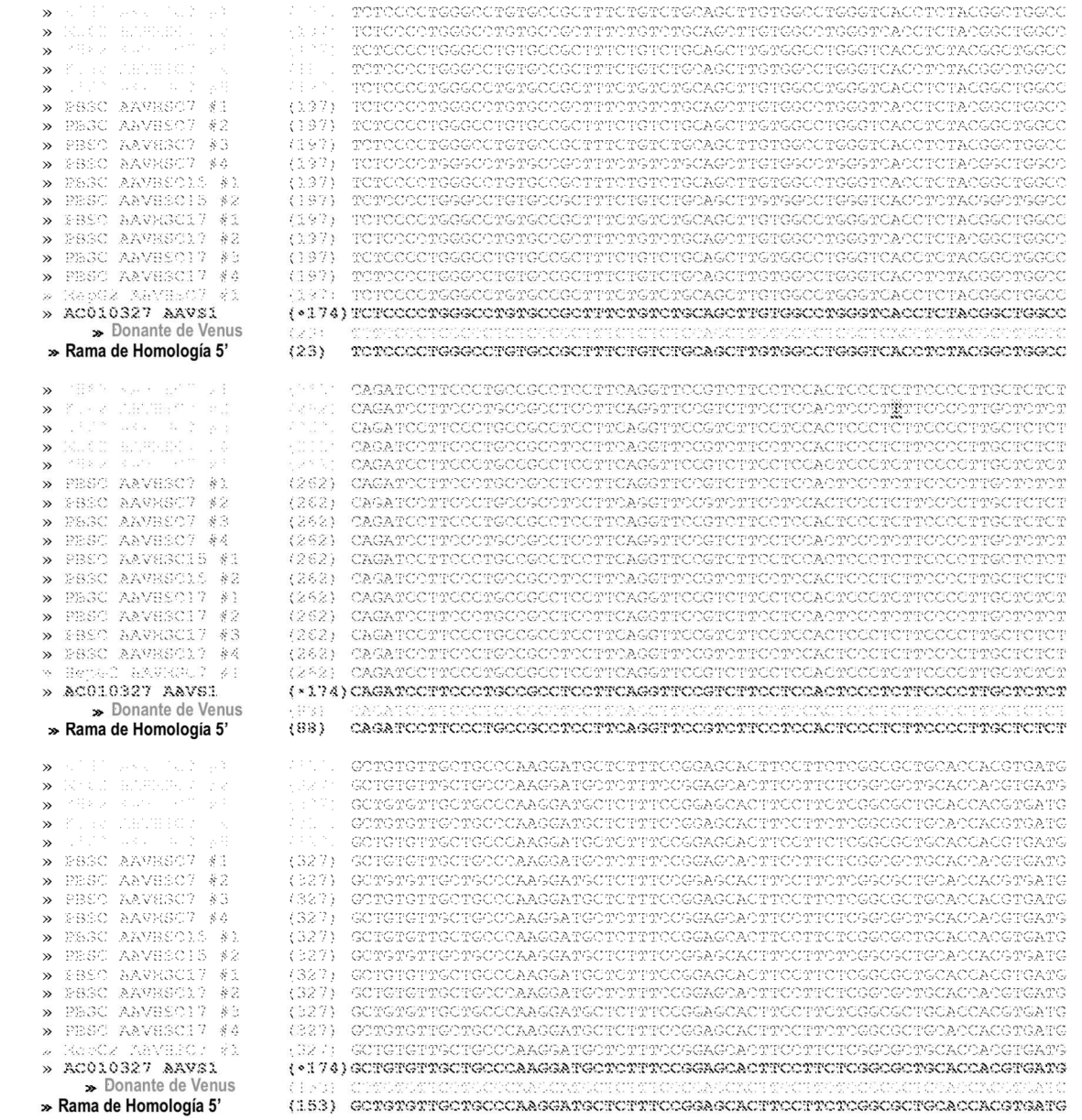


Figura 33 (cont.)

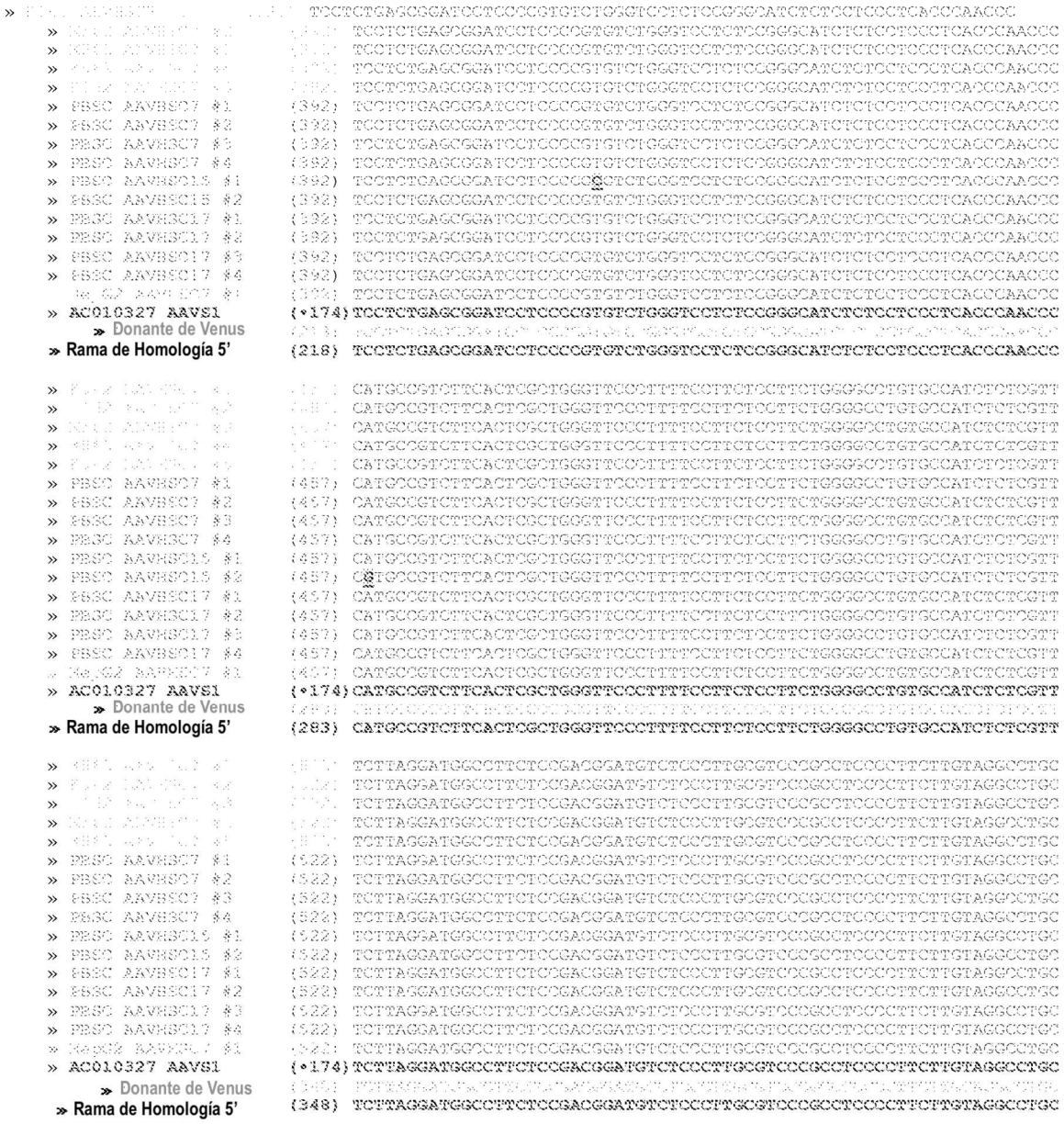


Figura 33 (cont.)



Figura 33 (cont.)

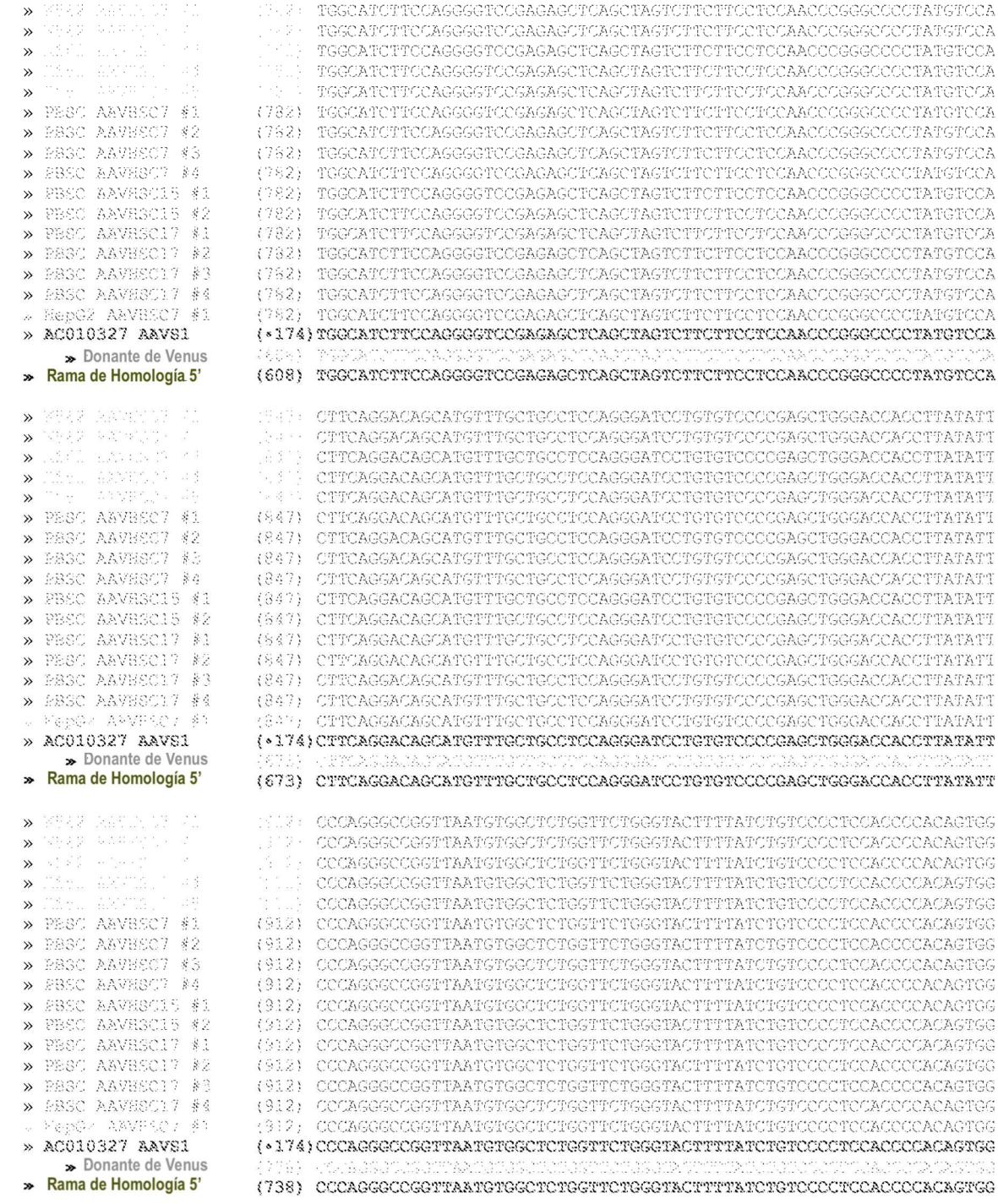


Figura 33 (cont.)



Figura 33 (cont.)

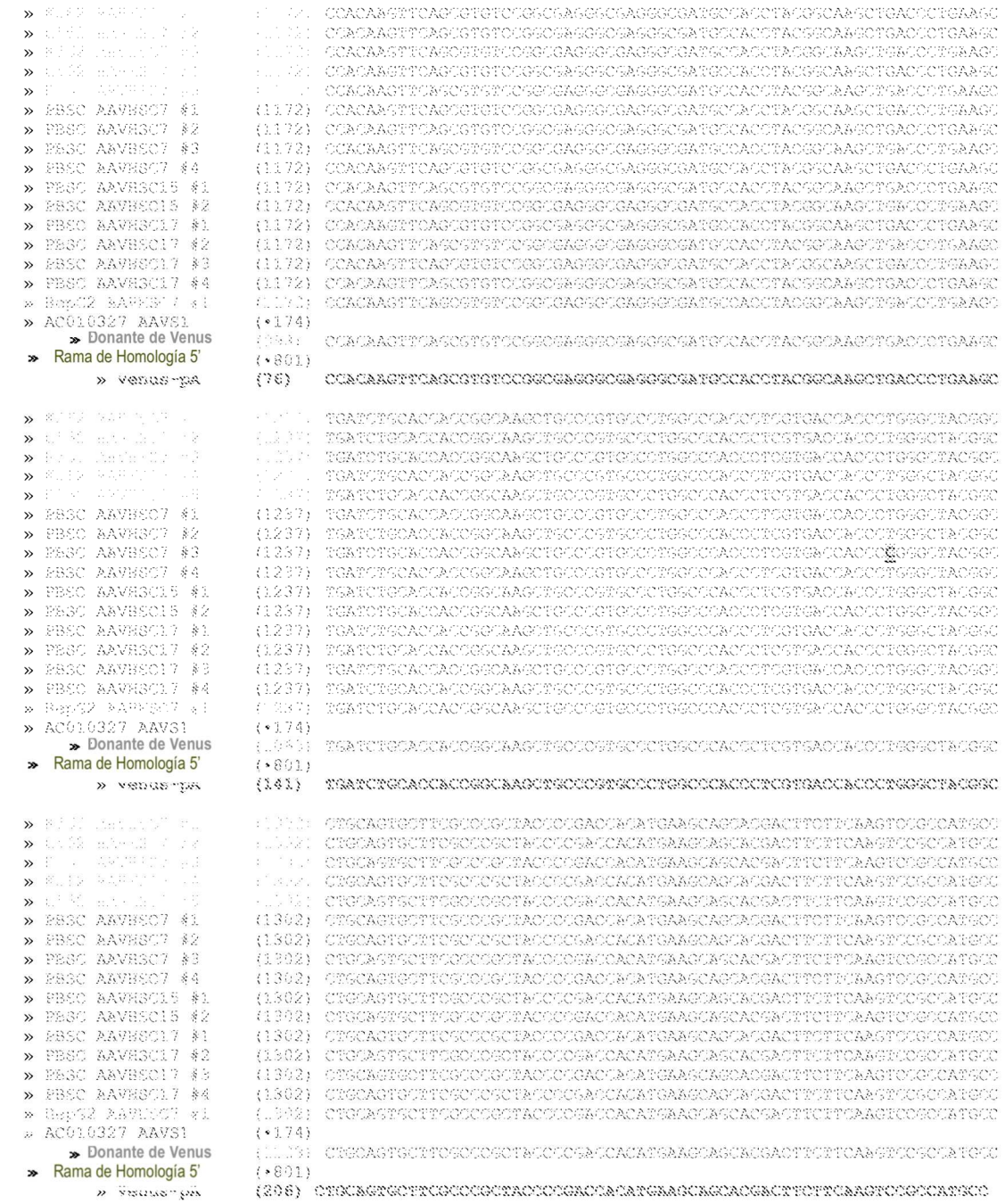


Figura 33 (cont.)



Figura 33 (cont.)



Figura 33 (cont.)

Análisis de Secuencias que Muestra la Inserción Cromosómica de una Secuencia Corta en el Intrón 1 de PPP1R12C mediante Vectores de AAVF

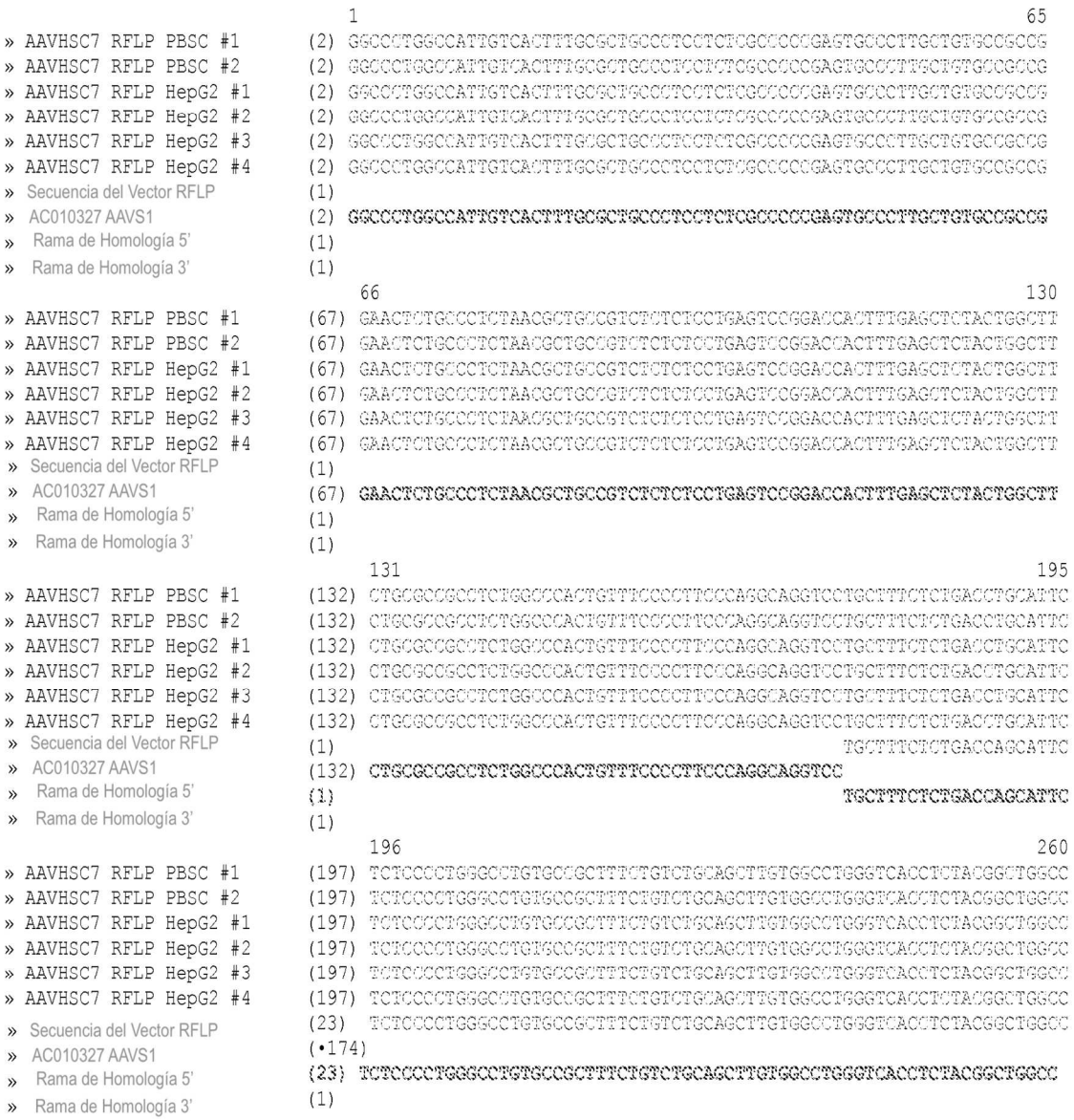


Figura 34

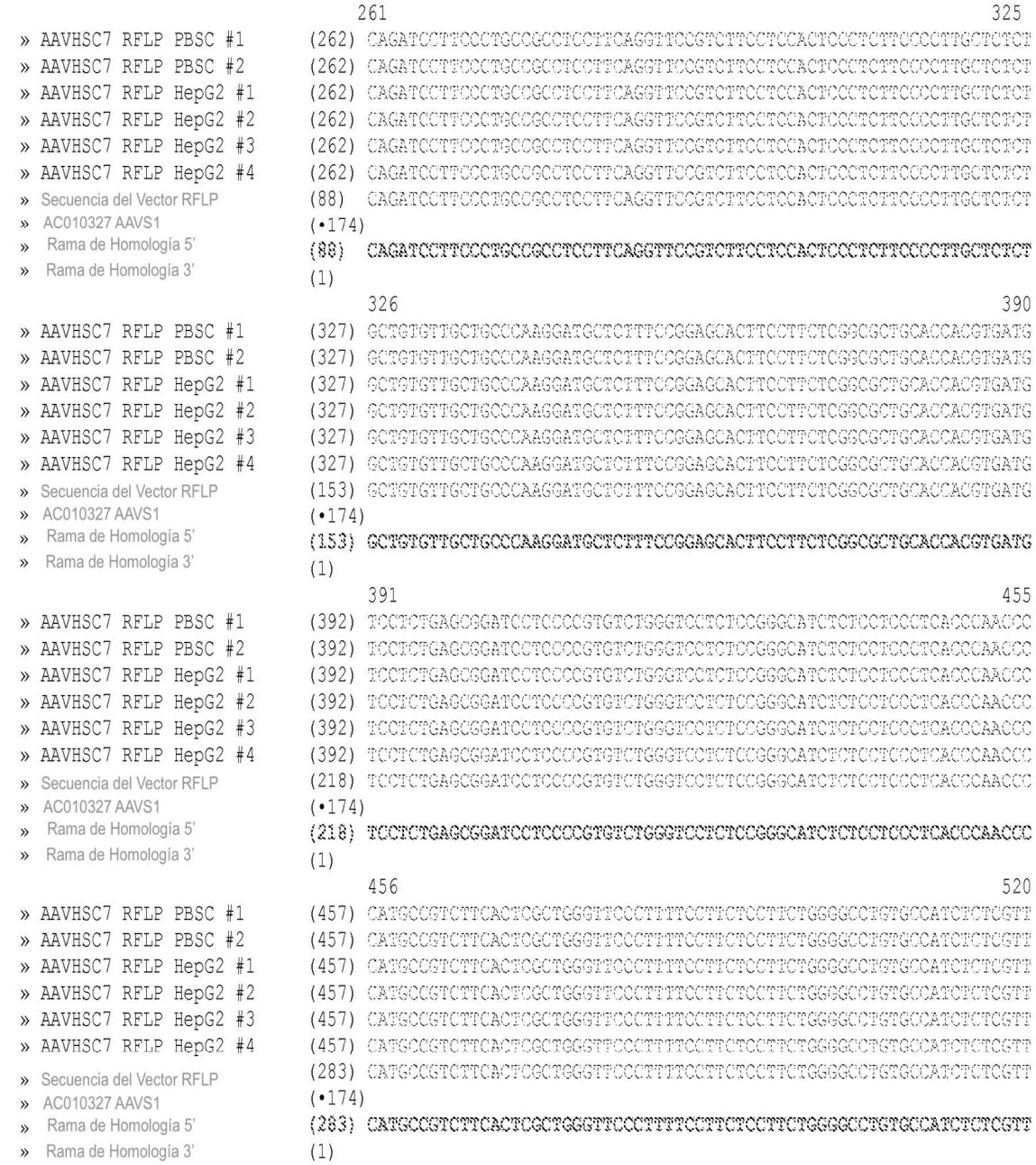


Figura 34 (cont.)

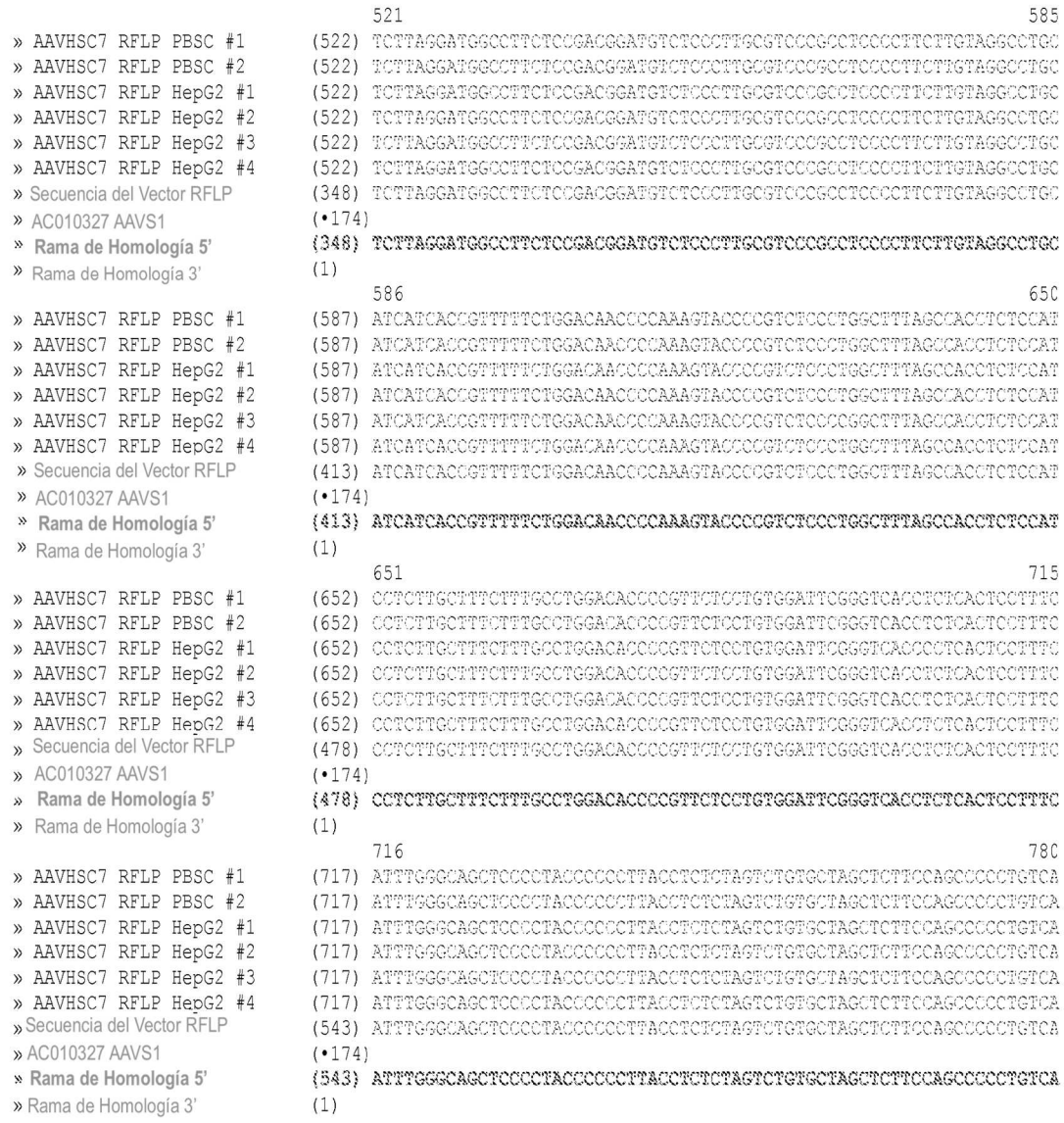


Figura 34 (cont.)

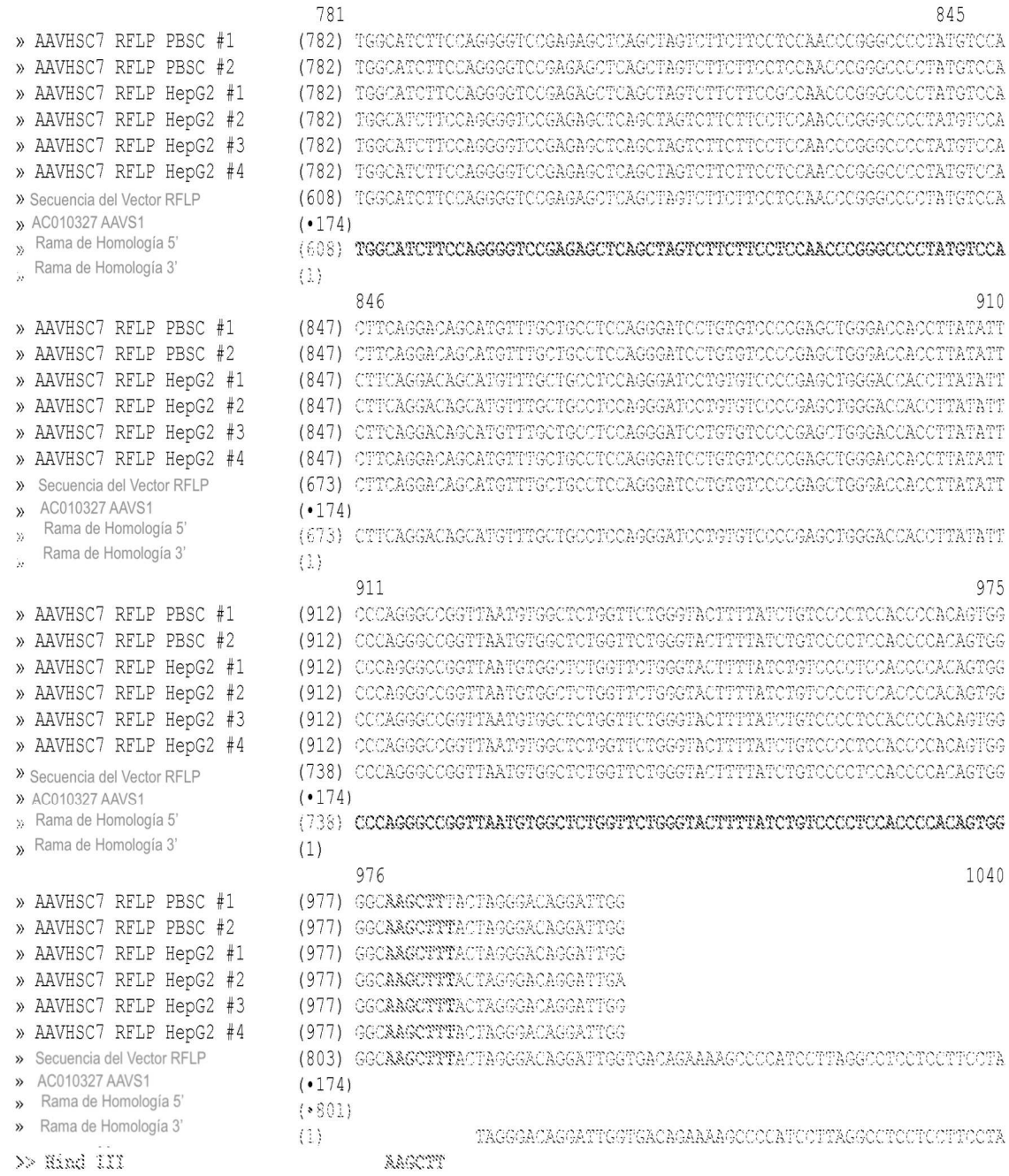


Figura 34 (cont.)

AAVF DIRIGE LA INTEGRACIÓN DE PEQUEÑOS INSERTOS EN AAVS1 - CÉLULAS CD34+

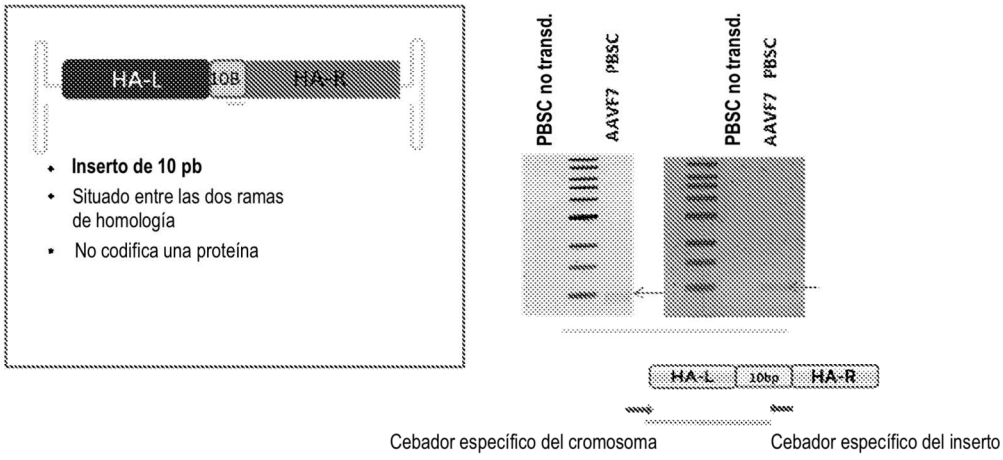


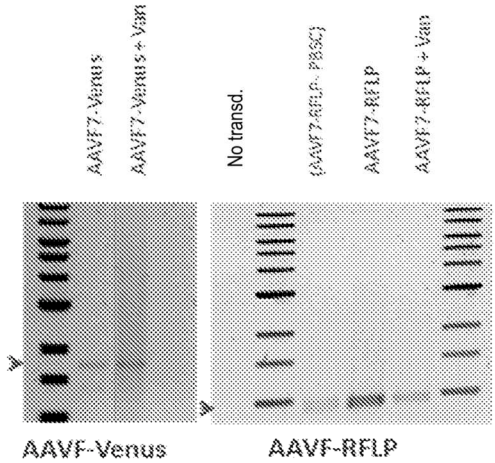
Figura 35

Figura 36

Expresión de GFP (% de Células)

	24H	48H
AAVF7	18.5	15.2
AAVF17	31.6	26.4
AAV6	0	ND
AAV8	0	ND
AAV9	2.81	ND

Integración genómica



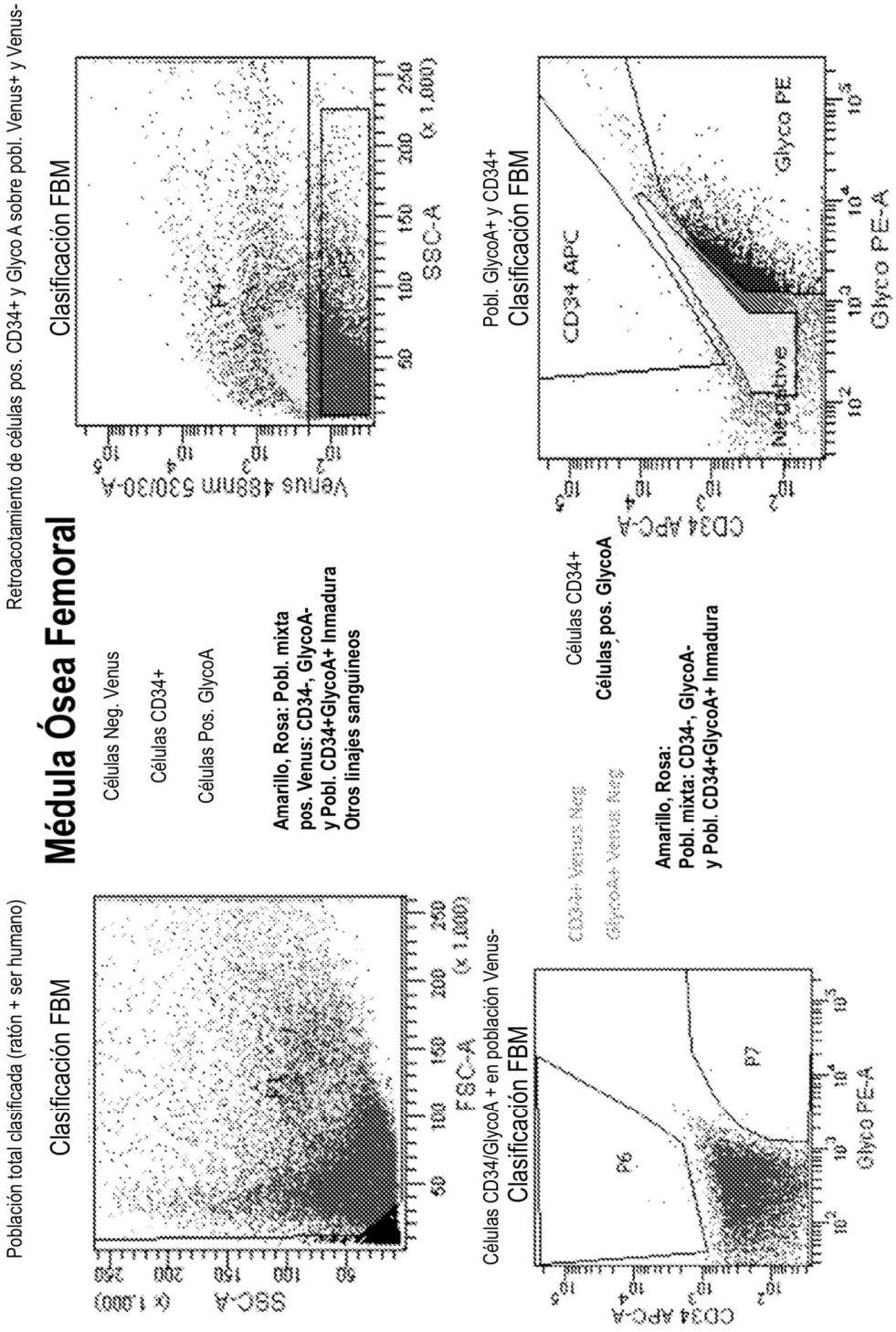

Población total clasificada (ratón + ser humano)
Clasificación FBM
SSC-A (x 1.000)
FSC-A (x 1.000)
Médula Ósea Femoral
Células Neg. Venus
Células CD34+
Células Pos. GlycoA
Amarillo, Rosa: Pobl. mixta pos. Venus: CD34-, GlycoA- y Pobl. CD34+GlycoA+ Inmadura
Otros linajes sanguíneos
Retroacotamiento de células pos. CD34+ y Glyco A sobre pobl. Venus+ y Venus-
Clasificación FBM
Venus 488nm 530/30-A
SSC-A (x 1.000)
Células CD34/GlycoA + en población Venus-
Clasificación FBM
CD34+ Venus Neg
GlycoA+ Venus Neg
P6
P7
CD34 APC-A
Glyco PE-A
Células CD34+
Células pos. GlycoA
Amarillo, Rosa:
Pobl. mixta: CD34-, GlycoA-
y Pobl. CD34+GlycoA+ Inmadura
Pobl. GlycoA+ y CD34+
Clasificación FBM
CD34 APC
Negative
Glyco PE
CD34 APC-A
Glyco PE-A
· Sin células CD34+ o gA+ en población negativa a Venus
· La mayoría de células gA+ expresan Venus

Figura 37

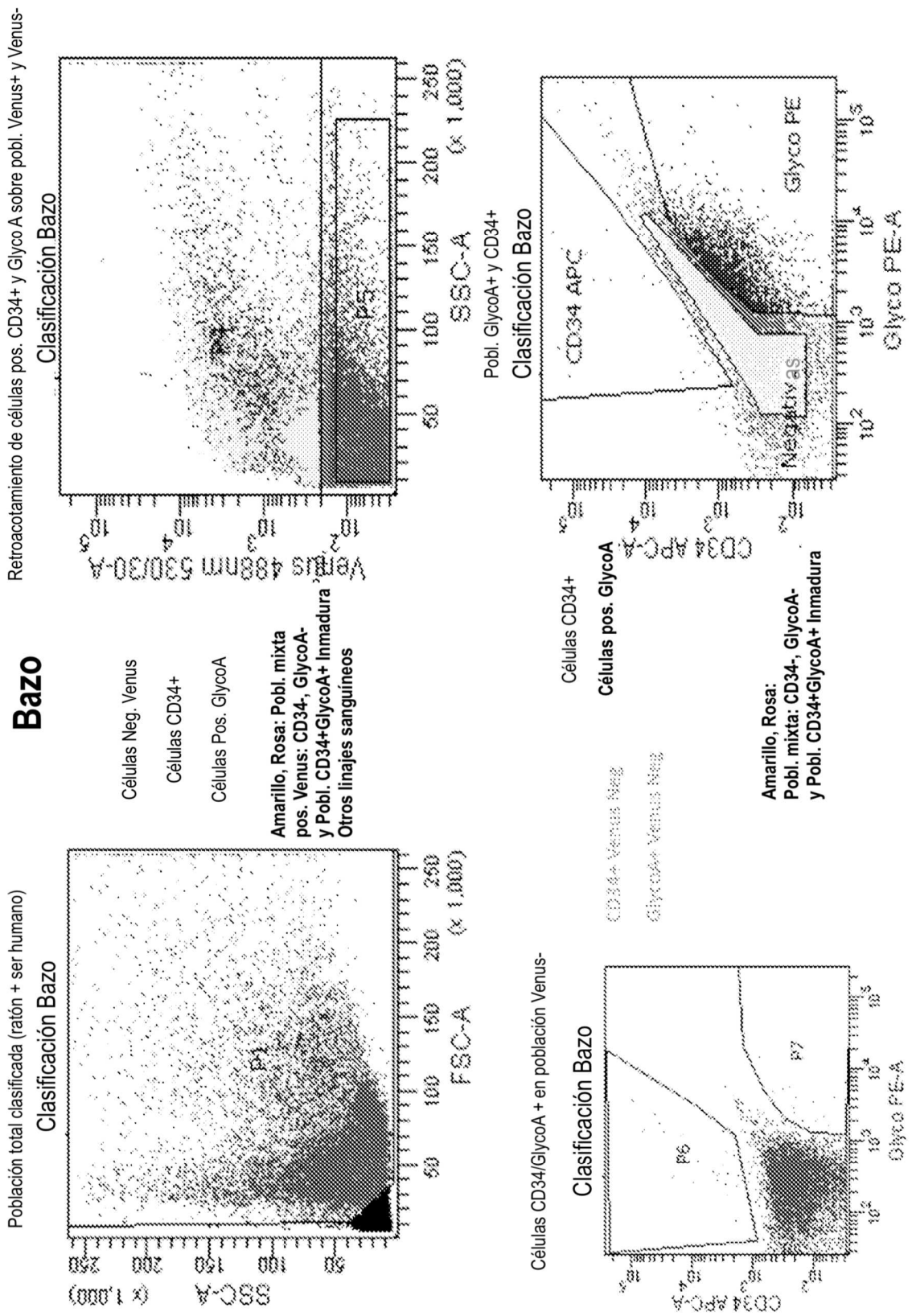

Bazo
Población total clasificada (ratón + ser humano)
Clasificación Bazo
SSC-A (x 1.000)
FSC-A (x 1.000)
P1
Células Neg. Venus
Células CD34+
Células Pos. GlycoA
Amarillo, Rosa: Pobl. mixta pos. Venus: CD34-, GlycoA- y Pobl. CD34+GlycoA+ Inmadura
Otros linajes sanguíneos
Retroacotamiento de células pos. CD34+ y Glyco A sobre pobl. Venus+ y Venus-
Clasificación Bazo
Venus 488nm 530/30-A
SSC-A (x 1.000)
P5
Pobl. GlycoA+ y CD34+
Clasificación Bazo
CD34 APC
Glyco PE
Negativas
CD34 APC-A
Glyco PE-A
Células CD34+
Células pos. GlycoA
Amarillo, Rosa:
Pobl. mixta: CD34-, GlycoA-
y Pobl. CD34+GlycoA+ Inmadura
Células CD34/GlycoA + en población Venus-
Clasificación Bazo
P6
P7
CD34 APC-A
Glyco PE-A

Figura 38

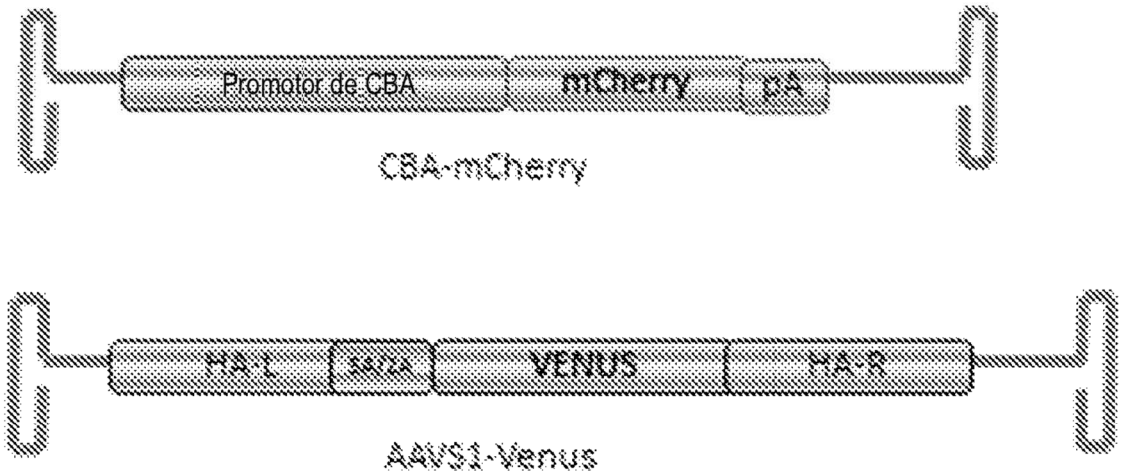

Promotor de CBA
mCherry
pA
CBA-mCherry
HA-L
SA/2A
VENUS
HA-R
AAVS1-Venus

Figura 39

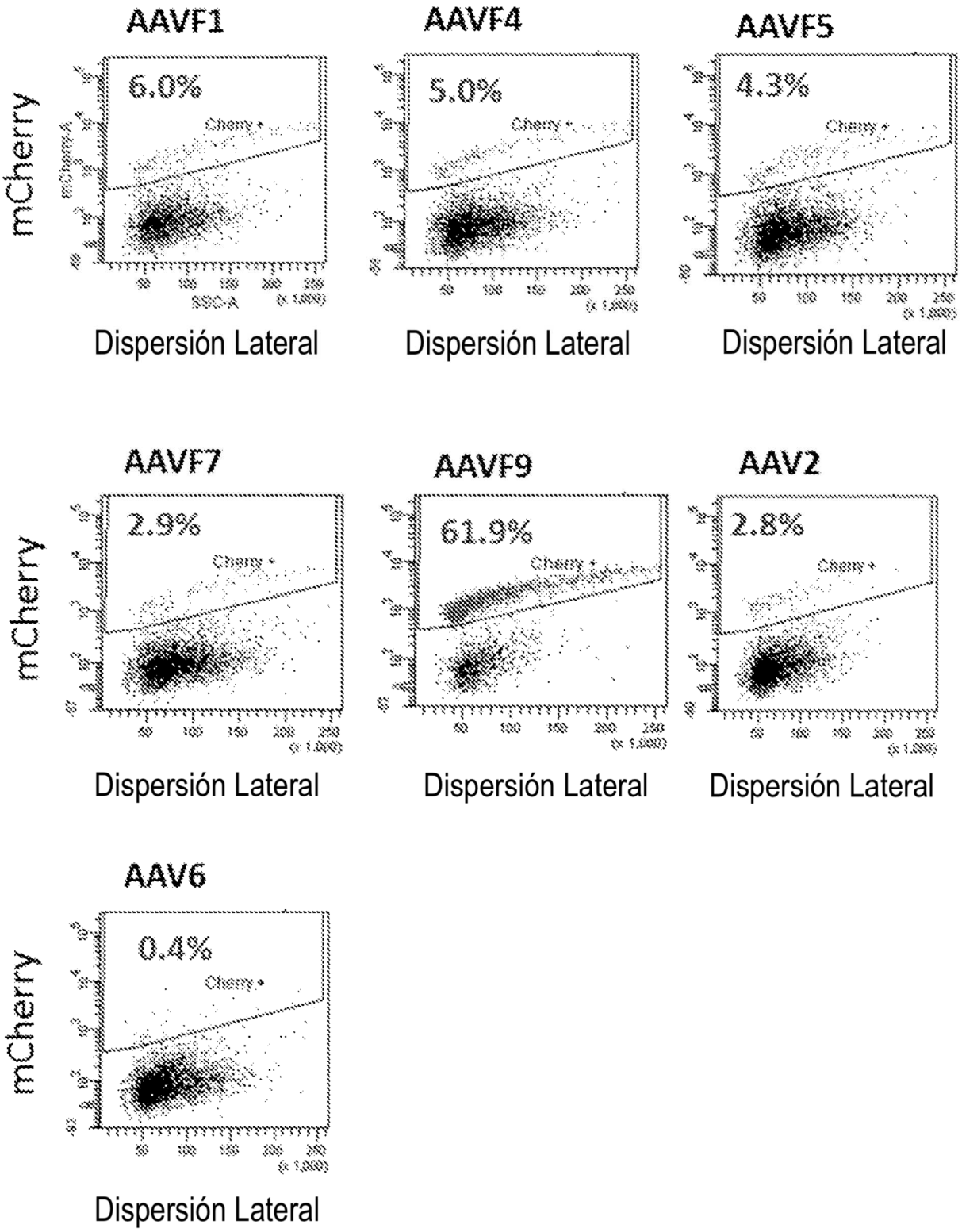

AAVF1
6.0%
Cherry +
mCherry
Dispersión Lateral
AAVF4
5.0%
Cherry +
Dispersión Lateral
AAVF5
4.3%
Cherry +
Dispersión Lateral
AAVF7
2.9%
Cherry +
mCherry
Dispersión Lateral
AAVF9
61.9%
Cherry +
Dispersión Lateral
AAV2
2.8%
Cherry +
Dispersión Lateral
AAV6
0.4%
Cherry +
mCherry
Dispersión Lateral

Figura 40A

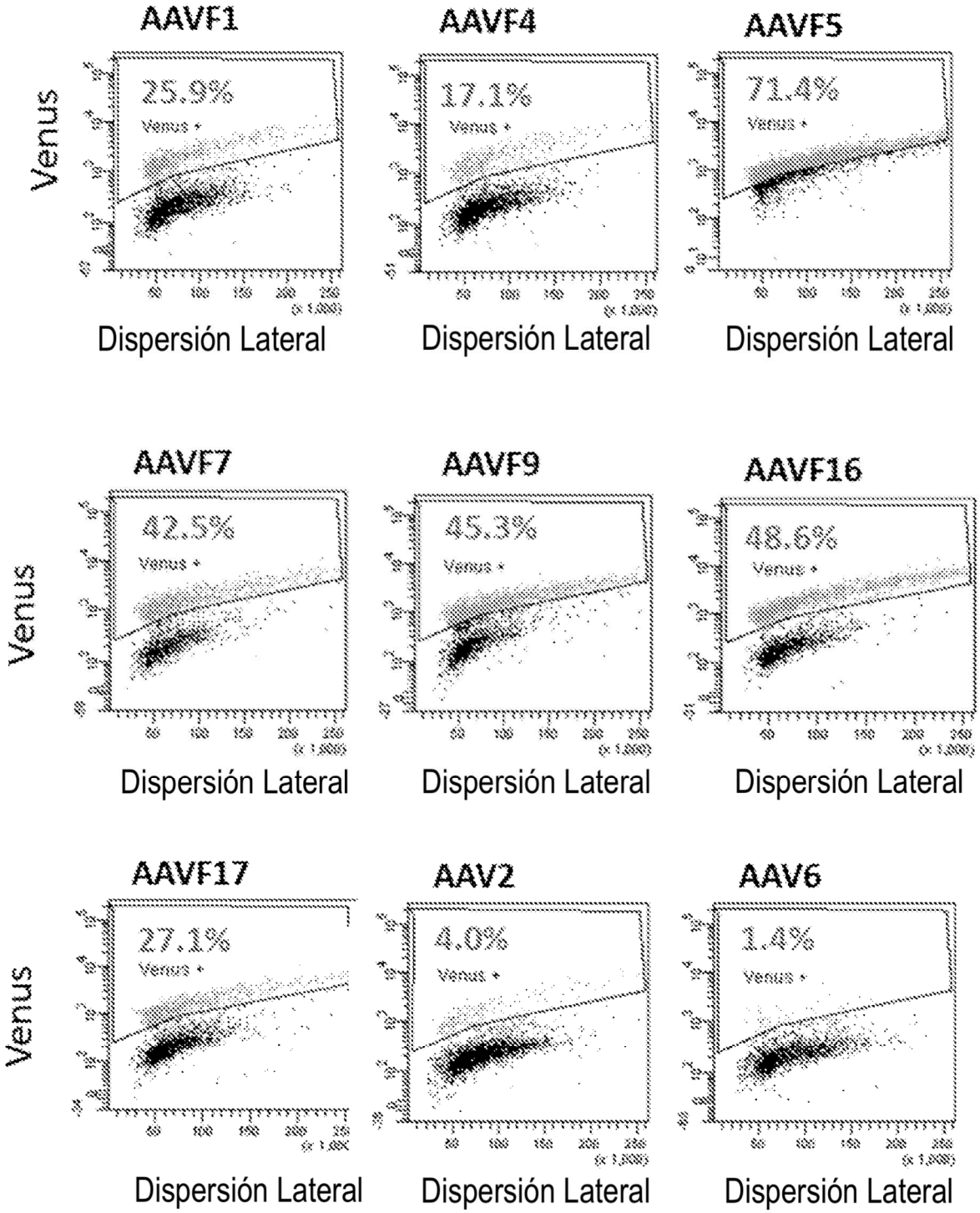

AAVF1
25.9%
Venus +
AAVF4
17.1%
Venus +
AAVF5
71.4%
Venus +
AAVF7
42.5%
Venus +
AAVF9
45.3%
Venus +
AAVF16
48.6%
Venus +
AAVF17
27.1%
Venus +
AAV2
4.0%
Venus +
AAV6
1.4%
Venus +
Venus
Dispersión Lateral

Figura 40B

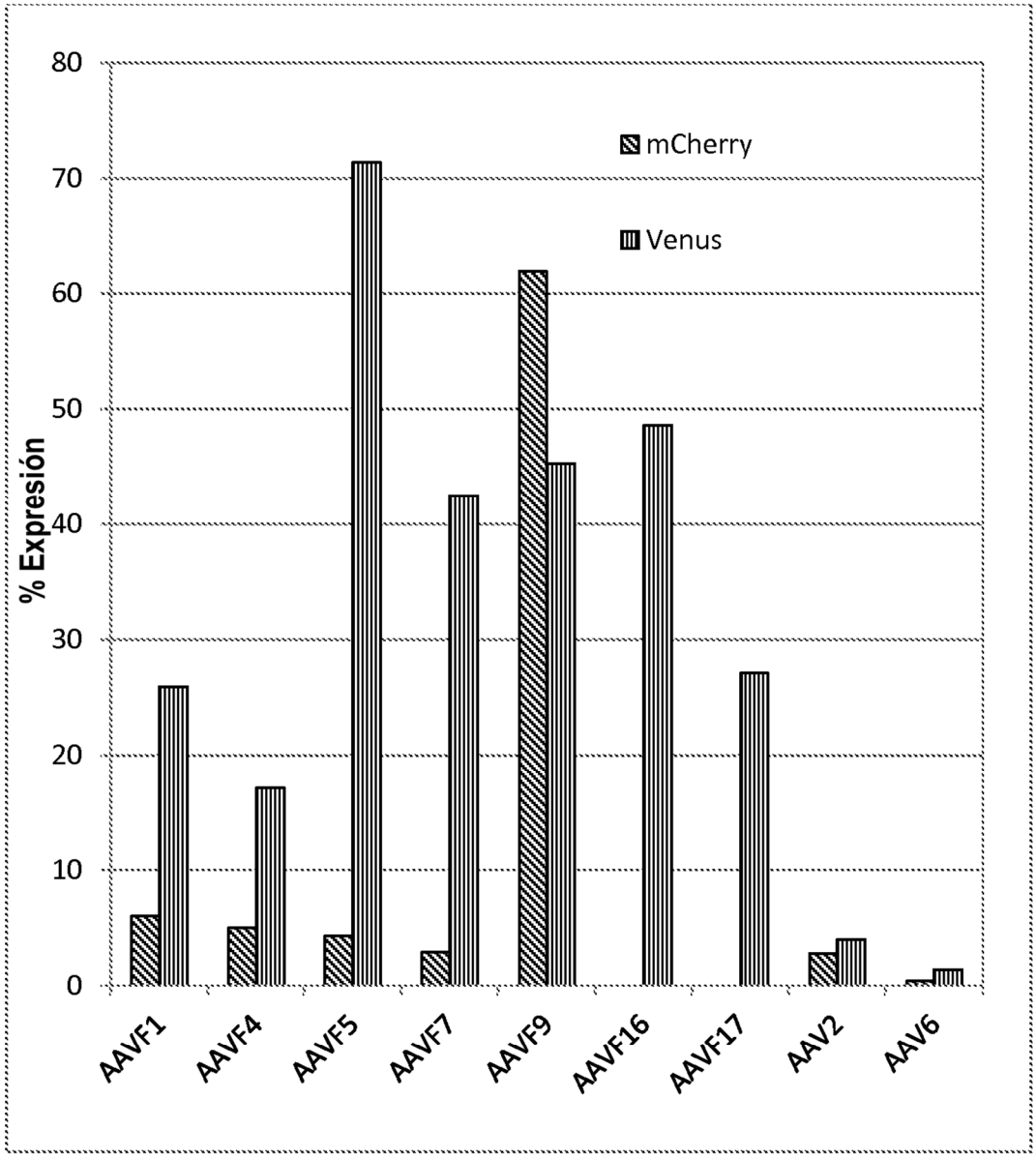

80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Expresión
mCherry
Venus
AAVF1
AAVF4
AAVF5
AAVF7
AAVF9
AAVF16
AAVF17
AAV2
AAV6

Figura 40C

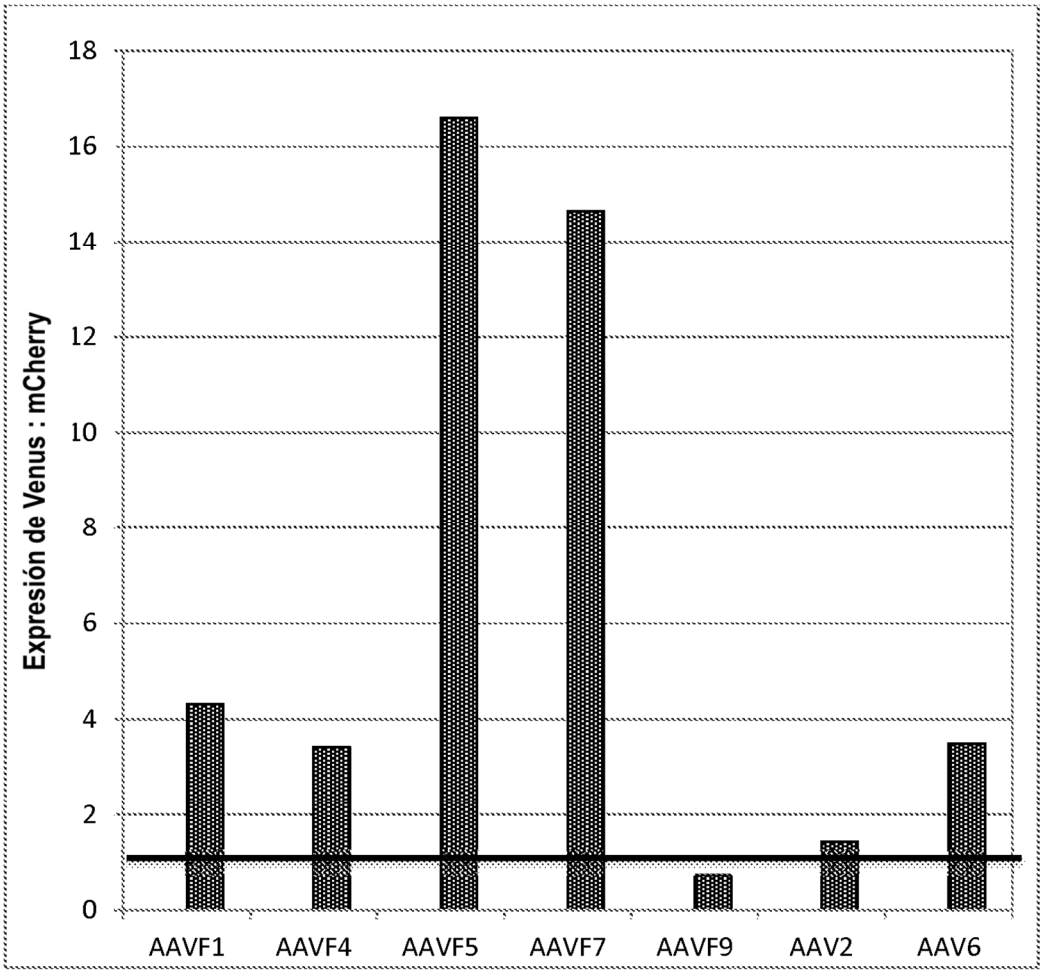

Expresión de Venus : mCherry
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
AAVF1
AAVF4
AAVF5
AAVF7
AAVF9
AAV2
AAV6

Figura 40D