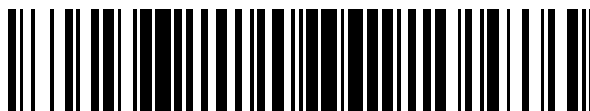


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 918 998**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016 PCT/US2016/066013**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17100704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016 E 16825937 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2022 EP 3387118**

54 Título: **Método de purificación escalable para AAVrh10**

30 Prioridad:

11.12.2015 US 201562266347 P
13.04.2016 US 201662322055 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2022

73 Titular/es:

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
3600 Civic Center Boulevard, 9th Floor
Philadelphia, PA 19104, US

72 Inventor/es:

LOCK, MARTIN y
ALVIRA, MAURICIO

74 Agente/Representante:

ESPIELL GÓMEZ, Ignacio

ES 2 918 998 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de purificación escalable para AAVrh10

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención describe un novedoso método escalable para producir rAAV adecuado para aplicaciones clínicas.

10 Se ha descrito el uso de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) para diversas estrategias de terapia génica y vacunas. Sin embargo, incluso con estas estrategias, siguen faltando métodos escalables para la purificación del rAAV.

15 Los virus adenoasociados (AAV), un miembro de la familia de los parvovirus, es un virus pequeño, no envuelto. Las partículas de AAV comprenden una cápside de AAV compuesta por 60 subunidades de proteína de cápside, VP1, VP2 y VP3, que encierran un genoma de ADN monocatenario de aproximadamente 4,7 kilobases (kb). Estas proteínas VP1, VP2 y VP3 están presentes en una proporción prevista de aproximadamente 1:1:10, y están dispuestas en una simetría icosaédrica.

20 Las partículas individuales portan solo una molécula de hebra de ADN, pero ésta puede ser la hebra positiva o negativa. Las partículas que contienen cualquiera de las dos hebras son infecciosas. El AAV es asignado al género *Dependovirus* ya que se descubrió como contaminante en reservas de adenovirus purificados. El ciclo de vida del AAV incluye una fase latente y una fase infecciosa. La replicación se produce por la conversión del genoma de ADN monocatenario lineal en una forma dúplex, y la posterior amplificación, de la cual se rescata la progenie de hebras individuales, es replicada y es empaquetada en cápsides en presencia de funciones auxiliares. Las propiedades de no patogenicidad, amplio abanico de infectividad del hospedador, lo que incluye células que no están en división y la integración, hacen que los

25 AAV sean un vehículo de suministro atractivo.

30 Las partículas recombinantes de AAV son producidas en cultivos de células hospedadoras permisivas (empaquetadoras) y se requiere la coexpresión de los genes AAV rep y AAV cap del virus colaborador, para la replicación y el empaquetamiento del genoma recombinante en la partícula vírica. Los genes necesarios para la replicación del genoma, la formación de la cápside y el empaquetamiento del genoma pueden expresarse a partir de plásmidos transfectados, integrarse en el genoma de la célula hospedadora o introducirse en la célula mediante virus recombinantes. Normalmente, las células son lisadas para liberar las partículas de rAAV y maximizar el rendimiento del rAAV recuperado. Sin embargo, el lisado celular contiene varios componentes celulares, tales como ADN de la célula

35 hospedadora, proteínas de la célula hospedadora, componentes de los medios, y en algunos casos, virus colaborador o ADN plasmídico del virus colaborador, los cuales deben ser separados del vector rAAV antes de que sea adecuado para su uso *in vivo*. Los avances recientes en la producción de rAAV incluyen el uso de procesos de suspensión células no adherentes en biorreactores de tanque agitado y condiciones de producción en las que los vectores de rAAV son liberados en el medio o sobrenadante reduciendo la concentración de componentes celulares del hospedador presentes en el material de producción, pero que aún contienen cantidades apreciables de impurezas del proceso. Véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.566.118 y la PCT WO 99/11764. Por tanto, las partículas de rAAV pueden recogerse del medio y/o del lisado celular y purificarse adicionalmente.

40 Algunos métodos de purificación del rAAV descritos anteriormente no son escalables y/o no son adaptables a las buenas prácticas de fabricación, incluyendo, por ejemplo, centrifugación en gradiente de cloruro de cesio y separación en gradiente de yodixanol. Véase, por ejemplo, M. Potter *et al*, Molecular Therapy - Methods & Clinical Development (2014), 1: 14034, págs. 1-8.

45 La publicación de patente de los Estados Unidos n.º 2005/0024467 expone que los serotipos de la cápside de rAAV, tales como rAAV-1, 4, 5 y 8 se unen débilmente a resinas aniónicas, ya sea como reservas de virus purificadas o en presencia de impurezas del proceso de producción, tales como ADN de la célula hospedadora, proteínas de la célula hospedadora, seroalbúmina, componentes de los medios y componentes del virus colaborador. Se describe que la purificación de estos serotipos de cápside implica la cromatografía de intercambio aniónico en combinación con otros métodos de purificación, tales como la centrifugación en gradiente de densidad con yodixanol. Véase, por ejemplo, Zolotukhin *et al.*, Methods 28(2):158-167 (2002) y Kaludov *et al.*, Hum. Gene Therapy 13:1235-1243 (2002); y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2004/0110266 A1. Sin embargo, esos métodos no son fácilmente escalables hasta procesos a escala comercial.

50 Se han comunicado otros ejemplos de purificación por cromatografía de intercambio iónico en una o dos etapas para los serotipos 1, 2, 4, 5 y 8 de rAAV. [Brument, N, *et al.* (2002). Mol Ther 6: 678-686; Okada, T, *et al.* (2009). Hum Gene Ther 20: 1013-1021; Kaludov, N, *et al.* (2002). Hum Gene Ther 13: 1235-1243; Zolotukhin, S, *et al.* (2002). Methods 28: 158-167; Davidoff, AM, *et al.* (2004). J Virol Methods 121: 209-215]. Más recientemente, se describió un medio de afinidad que incorporaba un ligando VHH anti-AAV, un derivado del anticuerpo de camélido de un solo dominio, que era útil para

purificar los serotipos 1, 2, 3 y 5. [Hellström, M, *et al.* (2009) *Gene Ther* 16: 521-532]. Este método de captura por afinidad se centra en la purificación de los vectores rAAV a partir de los componentes de producción en proceso del cultivo celular, incluido el virus colaborador, así como las proteínas del virus colaborador, proteínas celulares, ADN de la célula hospedadora y componentes del medio presentes en la reserva de producción del rAAV. El método de captura por afinidad descrito para la purificación de partículas de rAAV1, 2, 3 y 5 está diseñado para purificar el rAAV de los contaminantes de las células hospedadoras y del virus colaborador, pero no para separar las partículas AAV de las cápsides AAV vacías que carecen de secuencias genómicas empaquetadas. Además, en la bibliografía no queda claro que esta separación sea deseable. Véase, por ejemplo, F. Mingozzi *et al*, *Sci Transl med.* 17 de julio de 2013: 5(194), disponible en PMC 14 de julio de 2014, lo que sugiere que puede ser deseable incluir cápsides vacías como señuelos que pueden utilizarse para superar la inmunidad humoral preexistente al AAV, que puede superarse utilizando señuelos de cápside. Sin embargo, otros autores han notificado el aumento de la eficacia de los vectores de rAAV1 cuando son separados de las cápsides de AAV1 vacías. Véase, por ejemplo, M. Urabe *et al*, *Molecular Therapy*, 13(4):823-828 (Abril de 2006).

Sigue siendo necesario disponer de métodos escalables para separar las partículas de rAAV farmacológicamente activas (llenas) que tienen el transgén deseado empaquetado de las cápsides de rAAV que carecen del transgén deseado.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método escalable para separar eficientemente las partículas del vector AAVrh10 que contienen el genoma (completo) de los intermedios rAAVrh10 deficientes para el genoma (cápsides vacías).

En un aspecto, la invención proporciona un método para separar partículas virales AAVrh10 recombinantes (rAAVrh10) que contienen ADN que comprende secuencias genómicas farmacológicamente activas de intermedios de cápside AAVrh10 deficientes para el genoma (vacíos), comprendiendo dicho método: (a) separar las partículas virales rAAVrh10 y los intermedios de la cápside de AAVrh10 de los contaminantes que no son AAV, obtenidas a partir de un cultivo de células productoras de AAV que comprenden un casete de expresión que codifica una proteína de la cápside de AAVrh10 unido de forma operable a secuencias de control de la expresión que dirigen la expresión de la misma en la célula productora, un casete de expresión que comprende secuencias para el empaquetamiento en la cápside del AAVrh10, y un casete de expresión que comprende los virus colaboradores necesarios para la producción y el empaquetamiento de la cápside del AAVrh10 en una partícula viral, en donde la separación se realiza mediante una resina de afinidad de alto rendimiento que tiene un anticuerpo para AAVrh10 para obtener los materiales purificados de (a); (b) formar una suspensión de carga que comprende: una suspensión que comprende (i) materiales de la etapa (a) purificados con la resina de afinidad de alto rendimiento y (ii) un primer tampón que comprende Bis-Tris propano (BTP) 20 mM y un pH en el intervalo de 9,8 a 10,2 o un pH de 10,0; (c) cargar la mezcla de la etapa (b) en una resina de intercambio aniónico fuerte, encontrándose dicha resina en un recipiente que tiene una entrada para el flujo de una suspensión y/o solución y una salida que permite el flujo del eluido del recipiente; (d) lavar la resina de intercambio aniónico cargada con un tampón que comprenda NaCl 10 mM y BTP 20 mM con un pH comprendido entre 9,8 y 10,2 o un pH de 10,0; (e) aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la resina de intercambio aniónico cargada y lavada y controlar la fuerza iónica del eluido; y (f) monitorizar el eluido para ver si hay un pico de absorbancia ultravioleta a 260 nm y un pico de 280 nm y recoger las partículas virales de rAAV10 de una fracción que se eluye cuando el pico de 260 nm cruza y supera el pico de 280 nm, purificándose dichas partículas virales de rAAV de los intermedios de la cápside de AAVrh10.

En algunos métodos descritos en el presente documento, para separar las partículas virales AAVrh10 llenas de los intermedios de AAVrh10 vacíos, es sometida una mezcla que comprende partículas virales de AAVrh10 recombinantes e intermedios/subproductos del vector de AAVrh10 a cromatografía líquida de rendimiento rápido (FPLC), en donde las partículas virales AAVrh10 y los intermedios AAVrh10 son unidos a una resina de intercambio aniónico fuerte equilibrada a un pH de aproximadamente 10,0 y sometidas a un gradiente de sal mientras se controla la absorbancia ultravioleta del eluido a aproximadamente 260 nm y a aproximadamente 280 nm. Las cápsides llenas de AAVrh10 son recogidas de una fracción la cual se eluye cuando la relación A260/A280 alcanza un punto de inflexión. Más particularmente, las cápsides llenas son recogidas de las una o más fracciones eluidas caracterizadas por tener un pico más alto (área bajo la curva) a una absorbancia de 260 nm en comparación con el pico (área bajo la curva) a una absorbancia de 280 nm. La mayoría de las fracciones observadas para el proceso de la invención tienen una mayor cantidad de cápsides vacías (mayor pico/área bajo la curva en A280). El pico de absorbancia a 260 nm que es igual o superior al pico de absorbancia a 280 nm es indicativo de la fracción que contiene las cápsides llenas.

En otros métodos descritos en el presente documento, la muestra cargada en el método de cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) contiene partículas virales de AAVrh10 recombinantes llenas e intermedios de AAV rh10 (cápsides vacías) que se habían purificado de los contaminantes del sistema de producción mediante captura por

afinidad. En un ejemplo, la captura por afinidad se realiza utilizando una resina de afinidad de alto rendimiento que presenta un anticuerpo específico para el AAV.

En un ejemplo adicional, se proporciona un método escalable para separar partículas virales recombinantes AAVrh10 farmacológicamente activas que contienen secuencias genómicas de ADN de intermedios de vectores AAVrh10 inertes y deficientes para el genoma (vacíos), comprendiendo dicho método: (a) formar una suspensión de carga que comprende: partículas virales recombinantes de AAVrh10 y cápside vacía de AAV rh10 que han sido purificadas para eliminar los contaminantes de un cultivo celular productor de AAV en la cual se generaron las partículas y los intermedios; y un tampón A que comprende Bis-Tris propano (BTP) 20 mM y un pH de aproximadamente 10,0; (b) cargar la suspensión de (a) en una resina de intercambio aniónico fuerte, encontrándose dicha resina en un recipiente que tiene una entrada para el flujo de una suspensión y/o solución y una salida que permite el flujo del eluido del recipiente; (c) lavar la resina de intercambio aniónico cargada con tampón B al 1 %, la cual comprende NaCl 10 mM y BTP 20 mM con un pH de aproximadamente 10,0; (d) aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la resina de intercambio aniónico cargada y lavada, en donde el gradiente de sal se encuentra en el intervalo de NaCl 10 mM a aproximadamente 190 mM, incluyendo los extremos, o un equivalente; y (e) recoger las partículas de rAAV del eluido recogido en un punto de inflexión, purificándose dichas partículas de rAAV de los intermedios de rh10.

En un ejemplo adicional, la separación con resina de afinidad comprende: (i) equilibrar la resina de afinidad con el tampón A1, el cual comprende NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 600 mM, Tris-Cl a aproximadamente 20 mM y un pH neutro antes de aplicar el material a la resina de afinidad; (ii) lavar la resina cargada de (a) con el tampón C1 el cual comprende entre NaCl de aproximadamente 800 mM a aproximadamente 1200 mM, Tris-Cl 20 mM y un pH neutro; (iii) lavar la resina lavada con el tampón C1 de (b) con el tampón A1 para reducir la concentración de sal; (iv) lavar la resina de afinidad de (c) con el tampón B, el cual comprende NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 600 mM, citrato de sodio 20 mM, pH de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 3; y (v) recoger el eluido de (iv) que comprende las partículas de AAVrh10 llenas y la fracción de cápside de AAVrh10 vacía para cargarla en la resina de intercambio aniónico.

Otras ventajas más de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIG. 1A - 1H proporcionan la separación de poblaciones de partículas de vectores AAV rh10 en columnas monolíticas de AEX. La FIG. 1A es un cromatograma de un desarrollo en una columna CIMmultus™ QA. se cargaron 2×10^{14} partículas de vector de GC en una columna de 8 ml y se eluyeron con un gradiente salino lineal (Sistema: Avant 150, carga: eluido de AVB, carga: 2E+14GC; caudal: 40 ml/min (133 cm/h); Tampón A: BTP 20 mM a pH 10; Tampón B: BTP 20 mM, pH 10/NaCl 1 M, lavado: B al 2 %; gradiente: NaCl 20-180 mM en 60 VC (2,7 mM/VC). Se muestran los perfiles de A260 (línea que se extiende más alta en los picos P2 - P3 y segunda más alta en los picos P1, P4 y P5), A280 (línea que se extiende en segundo lugar más alta en los picos P2 - P3 y más alta en los picos P1, P4 y P5) y la conductividad (línea suave que se extiende desde el eje y y que alcanza ~227 mUA cuando el volumen de ejecución es de ~1300 ml). La absorbancia (mUA) es mostrada en el eje y y el volumen de ejecución (ml) en el eje x. El porcentaje de GC cargado (% de recuperación de GC) detectado en cada fracción principal (carga, lavado, eluido, desnudado de las columnas) se indica en la parte inferior de la figura. Varios picos observados en el gradiente de sal y en la tira de columna de alta sal están etiquetados como P1-P5. La FIG. 1B ofrece una vista ampliada de la porción de gradiente lineal del cromatograma que muestra los dos picos principales obtenidos, P1 (partículas vacías) y P2 (partículas llenas). Se muestran los perfiles de A260 (línea que se extiende más alta en los picos P2 - P3 y la segunda más alta en el pico P1), A280 (línea que se extiende más alta en los picos P1 y la segunda más alta en los picos P2 - P3) y de conductividad (línea que atraviesa el pico P2 horizontalmente). La absorbancia (mUA) se muestra en el eje y. El volumen de ejecución (ml) se muestra como línea sólida debajo del eje x, mientras que el tampón se indica en el eje x por encima del volumen de ejecución. La FIG. 1C es una fotografía del gel de SDS-PAGE que muestra el contenido de proteínas del AAV (VP1, VP2 y VP3); el contenido de GC de cada fracción se indica debajo del cromatograma. La FIG. 1D es una fotografía de un gel de un ensayo de cuantificación de cápsides en SDS PAGE, en la cual el gel se cargó con diluciones en serie de un patrón "completo" purificado en gradiente de yodixanol (WL618) junto con diluciones similares de fracciones de "pico completo" agrupadas de dos desarrollos de vectores Rh10 (PD005 y PD008) sobre columnas CIMmultus™ QA. La FIG. 1E muestra la curva patrón de WL618 con los volúmenes cuantificados de la banda de VP3 trazados frente al número de partículas (pt). Las FIG. 1F y 1G proporcionan los números de pt de PD005 y PD008, respectivamente, determinado por la comparación de los volúmenes de los picos de VP3 con los volúmenes de VP3 de la curva patrón de WL618. pt: las proporciones de GC y el porcentaje de cápsides vacías se obtienen por comparación de la carga de GC y el número de pt determinado. La FIG. 1H es un cromatograma de gradiente lineal de una columna CIMmultus™ QA de 8 ml ejecutada con una carga de vector Rh10 aumentada (sistema: Avant 25, carga: eluido de AVB; 5,5E_14 GC; caudal: 10 ml/min (35 cm/h); Tampón A: BTP 20 mM a pH 10; Tampón B: BTP 20 mM, pH 10/NaCl 1 M; lavado con 1 % de B; gradiente: NaCl 10-180 mM en 60 VC (2,8 mM/VC). Se muestran los perfiles de A260 (línea que se extiende más alta en los picos P2 - P3 y segunda más alta en los picos P1 y P5), A280 (línea que se extiende en

segundo lugar más alta en los picos P2 - P3 y más alta en los picos P1 y P5) y conductividad (línea que atraviesa horizontalmente el pico P2 y que alcanza un máximo tras el pico P5). La absorbancia (mUA) se muestra en el eje y. El volumen de ejecución (ml) se muestra como línea sólida debajo del eje x, mientras que el tampón se indica en el eje x por encima del volumen de ejecución. Se indican las conductividades de elución de los picos principales (proporcionadas con la unidad de mS/cm y debajo de los números de identificación de los picos P1 y P2) y el máximo de absorbancia (proporcionado con la unidad de mUA y debajo del número de identificación del pico P2) del "pico completo" principal. Las recuperaciones de GC para los picos principales, así como el contenido de partículas y las proporciones de vacíos se indican debajo del cromatograma.

Las FIG. 2A-F muestran el efecto del caudal en los perfiles de elución del vector rh10 en las columnas CIMmultus™ QA. La FIG. 2A es un cromatograma de elución del vector AAVrh10 a partir de columnas CIMmultus QA de 1 ml a 0,4 ml/min (16 cm/h), 60 VC, pH 10. A260 es la línea que forma el pico más alto en P2, P3 y P4. A280 es la línea que forma el pico inferior en P2 y P3. La conductividad programada es la línea inferior que pasa por P2 y se vuelve vertical. La conductividad real es la línea superior que pasa por P2 y se curva en P5. La FIG. 2B es un cromatograma de elución del vector AAVrh10 a partir de columnas CIMmultus QA de 1 ml a 0,9 ml/min (35 cm/h), 60 VC, pH 10. A260 es la línea que forma el pico más alto en P2 y P3 y es más baja en P1 y P5. A280 es la línea que forma el pico más alto en P1 y P5. La conductividad programada es la línea inferior que pasa por P2 y se vuelve vertical. La conductividad real es la línea superior que pasa por P2 y se curva en P5. La FIG. 2C es un cromatograma de elución del vector AAVrh10 a partir de columnas CIMmultus QA de 1 ml a 1,7 ml/min (66 cm/h), 60 VC, pH 10. A260 es la línea que forma el pico más alto en P2 y P3. La A280 está representada por la línea que forma el pico más alto en P1 y P5. La conductividad programada es la línea inferior que pasa por P2 y se vuelve vertical. La conductividad real es la línea superior que pasa por P2 y se curva en P5. La FIG. 2D es un cromatograma de elución del vector AAVrh10 a partir de columnas CIMmultus QA de 1 ml a 3,4 ml/min (133 cm/h), 60 VC, pH 10. La A260 está representada por la línea que forma el pico más alto en P2 y P3. La A280 está representada por la línea más alta en P1 y P5. Todas las ejecuciones se realizaron con Bis-Tris-propano (BTP) 20 mM a pH 10 como tampón de carga (tampón A) y BTP 20 mM a pH 10 - NaCl 1 M como tampón de desnudado de la columna (tampón B). Se utilizó un gradiente salino lineal del 1 al 18 % de tampón B para eluir el vector. La columna se desnudó con tampón B al 100 %. La absorbancia (mUA) es mostrada en el eje y y el volumen de ejecución (ml) en el eje x. Se indican las conductividades (mS/cm) y las posiciones de elución (% de B) de los picos principales (etiquetados como P1-PS). La FIG. 2E es una superposición de los perfiles de absorbancia a A280 generados a diferentes caudales: 0,4 ml/min (16 cm/h); 0,9 ml/min (35 cm/h), 1,7 ml/min (66 cm/h), 3,4 ml/min (133 cm/h). La A280 a 3,4 ml/min (133 cm/h) está representada por la línea que es la más alta a aproximadamente 137 ml y es la más baja en el pico final a aproximadamente 170-172 ml (desnudado). La A280 a 0,9 ml/min (35 cm/h) está representada por la línea que forma el pico inferior a aproximadamente 137 ml y es la segunda más alta en el desnudado. La A280 a 1,7 ml/min (66 cm/h) está representada por la línea que forma el pico ligeramente superior a aproximadamente 138 ml y es la tercera más alta en el desnudado. La A280 a 0,4 ml/min (16 cm/h) está representada por el pico inferior que comienza un poco más allá de 138 ml y forma el pico más alto en el desnudado. La FIG. 2F es una vista ampliada de un pico de desnudado de la columna, mostrando más claramente la separación, con los picos a A280 de mayor a menor: 0,4 ml/min, 0,9 ml/min; 1,7 ml/min; 3,4 ml/min.

Las FIG. 3A - 3G muestran el efecto del pH en los perfiles de elución del vector rh10 en las columnas CIMmultus™ QA. La FIG. 3A proporciona un cromatograma de elución del vector AAVrh10 a partir de columnas CIMmultus™ QA de 1 ml (0,9 ml/min (35 cm/h), 60 VC, pH 10). La A260 está representada por la línea que forma el pico más alto en P2 y P3. La A280 está representada por la línea que forma el pico más alto en P1 y P5. La FIG. 3B proporciona un cromatograma de elución del vector AAVrh10 a partir de columnas CIMmultus™ QA de 1 ml (0,9 ml/min (35 cm/h), 60 VC, pH 9,8). La A260 está representada por la línea que forma el pico más alto en P2 y P3. La A280 está representada por la línea que forma el pico más alto en P1 y P5. La FIG. 3C proporciona un cromatograma de elución del vector AAVrh10 a partir de columnas CIMmultus™ QA de 1 ml (0,9 ml/min (35 cm/h), 60 VC, pH 9,0). La FIG. 3D proporciona un cromatograma de elución del vector AAVrh10 a partir de columnas CIMmultus™ QA de 1 ml (0,9 ml/min (35 cm/h), 60 VC, pH 9,5). La A260 está representada por la línea que forma el pico más alto en P2. La A280 está representada por la línea que forma el pico más alto en P1 y P5. Todas las ejecuciones se realizaron con Bis-Tris-propano (BTP) 20 mM a pH 9-10 como tampón de carga (tampón A) y BTP 20 mM a pH 9-10 - NaCl 1 M como tampón de desnudado de la columna (tampón B). Se utilizó un gradiente salino lineal del 1 al 18 % de tampón B para eluir el vector. La columna fue desnudada con tampón B. La absorbancia (mUA) es mostrada en el eje y y el volumen de ejecución en el eje x. Se indican las conductividades (mS/cm) y las posiciones de elución (% de B) de los picos principales (etiquetados como P1 - P5). La FIG. 3E es una superposición de los perfiles de absorbancia a A280 generados a diferentes valores de pH. Los datos indican que cada reducción del pH por debajo de 10 hizo que tanto las partículas llenas como las vacías se unieran con menos fuerza a la columna y eluyeran antes en el gradiente de elución, reduciendo la separación entre cápsides llenas y vacías.

La FIG. 4 muestra la distribución del genoma del vector entre las fracciones de la columna AVB para AAVrh10, AAVhu37, AAVrh64R1, AAV8 y AAV3B. Los vectores AAV se diluyeron en el tampón de unión AVB. A (para AAV3B, el sobrenadante del cultivo se cambió por el tampón de unión) y luego se cargó en la columna AVB. Se recogieron las

fracciones de flujo continuo (FT), lavado de AVB.A (W1), lavado de AVB.C (W2) y elución (AVB.B) (E). Las copias del genoma del vector se determinaron mediante PCR en tiempo real.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describe una tecnología escalable para la producción de rAAVrh10 purificado para su uso en una variedad de transferencia de genes y/u otras aplicaciones. De manera adecuada, el método purifica las partículas virales rAAVrh10 de los contaminantes del cultivo de producción, como el virus colaborador, las proteínas del virus colaborador, plásmidos, proteínas y ADN celular, componentes de los medios, proteínas séricas, proteínas rep de AAV, proteínas AAV VP1, AAV VP2 y AAV VP3 no ensambladas, y similares. Además, el método proporcionado en el presente documento es particularmente adecuado para separar partículas víricas de rAAVrh10 llenas de los intermedios de rAAV. Además de ser útil para el AAV1 como se define en el presente documento, el método es útil para algunos AAV diferentes que comparten ciertos requisitos estructurales con el AAVrh10 como se describe en el presente documento.

En un ejemplo, el método para separar las partículas virales de AAVrh10 completas de los intermedios de AAVrh10 vacíos comprende someter una mezcla que comprende partículas virales de AAVrh10 recombinantes y vectores intermedios de AAV rh10 a una cromatografía líquida de alto rendimiento, en donde las partículas virales de AAVrh10 y los intermedios de AAVrh10 se unen a una resina de intercambio aniónico fuerte equilibrada a un pH de 9,5 a aproximadamente 10,2 y es sometida a un gradiente salino mientras se supervisa la absorbancia en el ultravioleta del eluido a aproximadamente 260 nm y aproximadamente 280 nm, respectivamente.

Más particularmente, la presencia de cápsides de AAVrh10 con secuencias genómicas empaquetadas en ellas ("llenas") y las relaciones de absorbancia 260/280 inferiores a 1 es característica de los intermedios de AAVrh10 definidos en el presente documento. En general, el cultivo celular de producción puede producir una mezcla de rAAVrh10 "lleno" y rAAVrh10 "vacío" u otros intermedios en los que el 50 % o más sean intermedios (incluidos los vacíos), al menos el 60 % son intermedios, o más del 70 % son intermedios. En otros ejemplos, más o menos de las copias del genoma están "vacías"; como consecuencia, una cantidad correspondiente de fracciones eluidas se caracteriza por tener picos a 280 nm (y las correspondientes áreas mayores bajo la curva que son mayores que los picos a 260 nm). Las fracciones caracterizadas por picos (y las correspondientes áreas más grandes bajo la curva) a una absorbancia de aproximadamente 260 nm (A260) que son más altas que los picos correspondientes a 260 nm (la relación A260/280 es >1) están altamente enriquecidas en partículas llenas de rAAVrh10. Las cápsides llenas de AAVrh10 se recogen de una fracción que se eluye cuando el pico de A260 cruza y supera el pico de A280 (es decir, alcanza un punto de inflexión).

Como se usa en el presente documento, "partícula viral recombinante de AAVrh10" se refiere a la partícula resistente a nucleasas (NRP) la cual tiene una cápside de AAVrh10, la cápside tiene empaquetada en ella una molécula de ácido nucleico heterólogo que comprende un casete de expresión para un producto génico deseado. Dicho casete de expresión normalmente contiene una secuencia de repetición terminal invertida 5' y/o 3' que flanquea una secuencia génica, en la cual la secuencia genética está unida operablemente a secuencias de control de la expresión. Estos y otros elementos adecuados del casete de expresión se describen con mayor detalle a continuación y pueden denominarse como alternativa en el presente documento como secuencias genómicas del transgén. Esto también puede denominarse cápside de AAV "llena". Dicha partícula viral de rAAV se denomina "farmacológicamente activa" cuando suministra el transgén a una célula hospedadora que es capaz de expresar el producto génico deseado portado por el casete de expresión.

En muchos casos, las partículas de rAAV se denominan resistentes a DNAsas (DRP). Sin embargo, además de esta endonucleasa (DNasa), también pueden utilizarse exonucleasas en las etapas de purificación descritas en el presente documento, para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes. Dichas nucleasas pueden ser seleccionadas para degradar ADN monocatenario y/o ADN bicatenario y ARN. Dichas etapas pueden contener una sola nucleasa, o mezclas de nucleasas selectivas para diferentes dianas, y pueden ser endonucleasas o exonucleasas.

La expresión "resistente a nucleasas" indica que la cápside de AAV se ha ensamblado por completo alrededor del casete de expresión, el cual está diseñado para suministrar un transgén a una célula hospedadora y protege a estas secuencias genómicas empaquetadas frente a la degradación (digestión) durante las etapas de incubación con nucleasas diseñadas para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes los cuales pueden estar presentes del proceso de producción.

Como es utilizado en el presente documento, "cápside de AAVrh10" se refiere a rh. 10 que posee la secuencia de aminoácidos de GenBank, registro: AAO88201, el cual es producido en la SEQ ID NO: 6. Por lo tanto, además, los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para purificar otros AAV que presentan una cápside altamente relacionada con la cápside de AAV1. Por ejemplo, los AAV que tienen aproximadamente un 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia en AAO88201 y en la patente US 2013/0045186A1 (es decir, menos de aproximadamente un 1 % de variación con respecto a la secuencia de referencia) pueden ser

purificados utilizando los métodos descritos en el presente documento, siempre que se mantenga la integridad del sitio de unión al ligando para la purificación por captura de afinidad y que el cambio de secuencias no altere sustancialmente el intervalo de pH de la cápside para la purificación con resina de intercambio iónico. Por ejemplo, los serotipos AAVhu37, rh.39, rh.20, rh.25, AAV10, bb.1, bb.2 y pi.2 deberían unirse a la columna de resina de afinidad ilustrada porque su secuencia en la región de unión a anticuerpos de la resina comercial es idéntica o muy similar a la de rh10. Se han descrito métodos de generación de la cápside, secuencias de la cápside de los mismos y métodos de producción de vectores virales de rAAV. Véase, por ejemplo, Gao, *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) y la patente US 2013/0045186A1.

El término "identidad" o "porcentaje de identidad de secuencia" puede determinarse fácilmente para las secuencias de aminoácidos, sobre la longitud total de una proteína, una subunidad o un fragmento de las mismas. De manera adecuada, un fragmento tiene al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud y puede tener hasta aproximadamente 700 aminoácidos. En el presente documento se describen ejemplos de fragmentos adecuados. En general, cuando se hace referencia a la "identidad", "homología" o "similitud" entre dos virus adenoasociados diferentes, la "identidad", "homología" o "similitud" se determina en referencia a las secuencias "alineadas". Las secuencias "alineadas" o "alineaciones" se refieren a múltiples secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de proteínas (aminoácidos), que contienen a menudo correcciones para bases o aminoácidos ausentes o adicionales en comparación con una secuencia de referencia. Las alineaciones son realizadas utilizando diversos programas de alineación de múltiples secuencias disponibles pública o comercialmente. Los ejemplos de dichos programas incluyen, "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "MAP" y "MEME", los cuales son accesibles a través de servidores web en Internet. Los expertos en la materia conocen otras fuentes para dichos programas. Como alternativa, también se utilizan las utilidades Vector NTI. También hay varios algoritmos conocidos en la técnica que pueden ser utilizados para medir la identidad de secuencias de nucleótidos, incluidos los contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, se pueden comparar secuencias de polinucleótidos utilizando Fasta™, un programa en GCG Versión 6.1. Fasta™ proporciona alineaciones y un porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y búsqueda. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico se puede determinar utilizando Fasta™ con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) como se proporciona en GCG Versión 6.1. También están disponibles múltiples programas de alineación de secuencias para secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" y "Match-Box". En general, cualquiera de estos programas son utilizados con la configuración predeterminada, aunque un experto en la materia puede modificar estos ajustes según sea necesario. Como alternativa, un experto en la materia puede utilizar otro algoritmo o programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad o alineación que proporcionan los algoritmos y programas a los que se ha hecho referencia. Véase, por ejemplo, J. D. Thomson *et al*, Nucl. Acids Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

Como se usa en el presente documento, "intermedio de AAVrh10" o "intermedio de vector de AAVrh10" se refiere a una cápside de rAAV ensamblada que carece de secuencias genómicas empaquetadas en el mismo. También puede denominarse cápside "vacía". Dicha cápside puede no contener secuencias genómicas detectables de un casete de expresión, o solo secuencias genómicas parcialmente empaquetadas que son insuficientes para lograr la expresión del producto génico. Estas cápsides vacías no son funcionales para transferir el gen de interés a una célula hospedadora.

En un ejemplo, se describe un método para separar las partículas de rAAVrh10 que presentan secuencias genómicas empaquetadas de los intermedios AAVrh10 deficientes para el genoma. Este método consiste en someter una suspensión que comprende partículas virales recombinantes de AAVrh10 y productos intermedios de la cápside de AAV rh10 a una cromatografía líquida de alto rendimiento rápida, en donde las partículas virales de AAVrh10 y los intermedios de AAVrh10 son unidos a una resina de intercambio aniónico fuerte equilibrada a un pH de aproximadamente 10,0 y son sometidos a un gradiente salino mientras se supervisa la absorbancia en el ultravioleta del eluido a aproximadamente 260 y aproximadamente 280. Aunque es menos óptimo para el rAAVrh10, el pH puede ser tan bajo como 9,8 o tan alto como 10,2. En este método, las cápsides llenas de AAVrh10 son recogidos de una fracción la cual se eluye cuando la relación A260/A280 alcanza un punto de inflexión.

La cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC), es una forma de cromatografía líquida que a menudo se utiliza para analizar o purificar mezclas de proteínas. Como en otras formas de cromatografía, la separación es posible porque los diferentes componentes de una mezcla tienen diferentes afinidades por dos materiales, un fluido en movimiento (la "fase móvil") y un sólido poroso (la fase estacionaria). En el presente método, la fase móvil es una solución acuosa, o "tampón". El caudal del tampón puede ser controlado por gravedad o mediante una bomba (por ejemplo, una bomba de desplazamiento positivo) y puede ser mantenido constante o variar. De manera adecuada, la composición del tampón puede variarse extrayendo fluidos en diferentes proporciones de dos o más depósitos externos. La fase estacionaria descrita en el presente documento es una resina de intercambio aniónico fuerte, normalmente compuesta por microesferas. Estas microesferas pueden empaquetarse en un recipiente, por ejemplo, una columna cilíndrica de vidrio o plástico, u otro recipiente adecuado. Tal como se proporciona en el presente documento, los volúmenes de la fase

móvil son descritos como "volúmenes de columna". Estos volúmenes pueden extrapolarse a otras formas y diseños del recipiente.

En el eluido de la columna de resina de intercambio aniónico o de otro recipiente es controlada la absorbancia ultravioleta a aproximadamente 260 nm y 280 nm. Tal como se proporciona en el presente documento, las cápsides de AAVrh10 "llenas" son caracterizadas por tener una absorbancia UV de aproximadamente 260 nm, mientras que las cápsides "vacías" se caracterizan por tener una absorbancia UV de aproximadamente 280 nm. Normalmente, la mayoría de las fracciones eluidas contienen cápsides vacías y a medida que avanza el gradiente salino, la mayor parte del eluido es caracterizada por una curva para A280 que supera a la de A260. Al supervisar la absorbancia UV cuando el eluido se caracteriza por la curva de A260 que cruza la curva de A280 (relación de A260/A280 mayor que 1), se pueden recoger de manera selectiva las "cápsides llenas", hasta el momento en que la relación A280/A260 vuelva a ser mayor que 1.

En un ejemplo, estas una o más fracciones recogidas de manera selectiva en el punto de inversión se caracterizan porque el rAAV recolectado total contiene al menos aproximadamente un 90 % de "cápsides llenas" y preferentemente, al menos un 95 % de "cápsides llenas". En un ejemplo adicional, estas fracciones pueden caracterizarse por tener una relación de "intermedias" a "llenas" menor que 0,75, más preferentemente de 0,5, preferiblemente menor que 0,3.

Como se usa en el presente documento, una "resina de intercambio aniónico" se refiere a una matriz insoluble o a un soporte sólido (por ejemplo, microesferas) capaz de tener una ionización superficial en un intervalo de pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 14. En un ejemplo, una resina de intercambio aniónico fuerte es un soporte sólido que tiene una superficie recubierta de polietilenimina cuaternizada. Un ejemplo de este tipo de resina de intercambio aniónico fuerte es el soporte sólido de la columna CIMultus QA™. Por ejemplo, la resina de intercambio aniónico puede ser una resina de intercambio iónico de amina cuaternaria. En un ejemplo adicional, la resina de intercambio aniónico comprende trimetilamina y una matriz de soporte que comprende poliglicidil metacrilato - dimetacrilato de co-etileno. Sin embargo, pueden seleccionarse otras resinas de intercambio aniónico adecuadas. Un ejemplo de este tipo de resina de intercambio aniónico fuerte es el de la columna POROS HQT™. Las resinas para las columnas mencionadas pueden obtenerse de Amersham/Pharmacia (Piscataway, N.J.), PerSeptive Biosystems (Foster City, Calif.), TosoHaas (Montgomeryville, Pa.) y otros proveedores.

El material de intercambio aniónico puede tener la forma de una columna de monolitos o de una columna tradicional basada en microesferas. El material de intercambio iónico puede estar en una columna con una capacidad de 0 a 0,5 ml, una columna de 1 ml y más preferiblemente, una columna de al menos 8 ml, una columna de 10 ml, una columna de 20 ml, una columna de 30 ml, una columna de 50 ml, una columna de 100 ml, una columna de 200 ml, una columna de 300 ml, una columna de 400 ml, una columna de 500 ml, una columna de 600 ml, una columna de 700 ml, una columna de 800 ml, una columna de 900 ml, una columna de 1000 ml (1 l), una columna de 2000 ml (2 l), una columna de 10 l, una columna de 20 l, una columna de 30 l, una columna de 40 l, una columna de 50 l, una columna de 60 l, una columna de 70 l, una columna de 80 l, una columna de 90 l, una columna de 100 l, una columna de 140 l, o una columna con una capacidad superior a 140 l, así como cualquier otra columna con una capacidad comprendida entre los volúmenes indicados anteriormente. Como alternativa, puede utilizarse otro tipo de recipiente para contener el soporte sólido de resina de intercambio aniónico.

Como se muestra en los ejemplos, la regulación de la carga y el caudal mejora la separación de las cápsides vacías y llenas. En un ejemplo, el caudal de carga de la muestra es menor o igual al caudal de elución. Por ejemplo, el caudal de carga puede encontrarse en el intervalo de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 40 ml/min, de aproximadamente 15 ml/min a aproximadamente 30 ml/min o de aproximadamente 20 ml/min a aproximadamente 25 ml/min, aproximadamente 10 ml/min, aproximadamente 20 ml/min o de aproximadamente 30 cm/h a aproximadamente 135 cm/h, para una columna de monolitos de 8 ml. Los caudales adecuados pueden extrapolarse para una columna sin monolitos.

La memoria descriptiva describe las concentraciones salinas en el presente documento en referencia al NaCl por conveniencia. Sin embargo, se entenderá que esta puede sustituirse por otra sal con una fuerza iónica equivalente (por ejemplo, KCl), otra sal que tenga una fuerza iónica diferente, pero su concentración ajustada a una fuerza iónica equivalente (por ejemplo, NH₄Ac) o puede sustituirse por una combinación de sales. La fórmula para calcular la fuerza iónica es bien conocida por los expertos en la materia:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2,$$

donde c_i es la concentración molar del ion i (M, mol/l), z_i es el número de carga de dicho ion y la suma es tomada sobre todos los iones en la solución. Para un electrolito 1:1 tal como el cloruro de sodio (NaCl), el cloruro de potasio (KCl), el

formiato (HCO_2^-), o acetato (CH_3CO_2^-) (por ejemplo, NH_4AC o NaAc), la fuerza iónica es igual a la concentración. Sin embargo, para un sulfato (SO_4^{2-}), la fuerza iónica es cuatro veces mayor. Por lo tanto, cuando se hace referencia a una concentración específica de NaCl o a un intervalo de concentraciones, un experto en la materia puede sustituirlo por otra sal o una mezcla de sales adecuadas, ajustado a la concentración adecuada para proporcionar una fuerza iónica equivalente a la prevista para el NaCl . Como se usa en el presente documento, esto puede determinarse un "equivalente de sal", por ejemplo, " NaCl o equivalente". Se entenderá que incluye tanto una sal única, una mezcla de NaCl con otras sales, o una mezcla de sales las cuales no incluyen NaCl , pero que son compatibles con los aparatos y procesos (por ejemplo, procesos de resina de afinidad y/o de intercambio aniónico) descritos en el presente documento.

La novedosa estrategia de FPLC proporcionada en este documento utiliza un complejo de resina de intercambio aniónico fuerte como se describe en el presente documento. La resina de intercambio aniónico se une a las cápsidas vacías y llenas del rAAVrh10 mediante una interacción de carga mientras está en el tampón A (el tampón de ejecución). En un ejemplo, la columna de resina de intercambio aniónico es equilibrada utilizando el tampón A, el cual contiene NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 700 mM, o NaCl de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 650 mM, o su equivalente de sal. Los tampones adecuados pueden incluir iones aportados por diversas fuentes, tales como, por ejemplo, N-metilpiperazina; piperazina; Bis-Tris; Bis-Tris propano; MES, Hepes, BTP o un tampón fosfato N-metildietanolamina; 1,3-diaminopropano; etanolamina; ácido acético y similares. Dichos tampones se utilizan generalmente a un pH neutro (por ejemplo, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8, preferiblemente, de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5 o aproximadamente 7,5). En un ejemplo, es seleccionado un componente de tampón Tris. En un ejemplo, el tampón A contiene Tris-Cl a aproximadamente 20 mM, NaCl a aproximadamente 400 mM o equivalente, pH 7,5.

Las partículas del rAAV e intermedias se disocian y vuelven a la solución (suspensión) en el tampón B (el tampón de elución). El tampón B es utilizado para equilibrar la resina de intercambio aniónico. Tal como se proporciona en el presente documento, el tampón B se encuentra preferiblemente a un pH de aproximadamente 10,0 (preferiblemente de 10,0). En un ejemplo, el tampón contiene Bis-Tris propano (BTP) a aproximadamente 20 mM de y NaCl de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM (o su equivalente en sal).

Se puede suspender una mezcla que contenga partículas vacías y llenas de rAAVrh10 en aproximadamente un 100 % de tampón A y aplicarla a la columna (recipiente). Las partículas rAAVrh10 y los intermedios se unen a la resina, mientras que los otros componentes son arrastrados en el tampón. En un ejemplo, el caudal total del tampón se mantiene constante; sin embargo, la proporción de tampón B (el tampón de "elución") es incrementado gradualmente del 0 % al 100 % según un cambio programado de concentración (el "gradiente").

En un ejemplo, al menos una etapa de digestión con nucleasas es realizado antes de cargar la mezcla en la resina de intercambio aniónico, es decir, durante la recolección de las partículas de rAAV y los productos intermedios del cultivo celular de producción. En un ejemplo adicional, es realizada una segunda etapa de digestión con nucleasas (por ejemplo, benzonasa) antes de cargar la mezcla en la resina de intercambio aniónico. De manera adecuada, esto puede realizarse durante la captura por afinidad. Por ejemplo, puede incorporarse al método de afinidad un paso de lavado adicional en el que las una o más nucleasas son mezcladas previamente con un tampón y son usadas en la etapa de lavado. De manera adecuada, el tampón presenta un pH neutro y una concentración de sal relativamente baja, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM, NaCl aproximadamente 30 mM en aproximadamente 50 ml o aproximadamente 40 mM, basado en la fuerza iónica del NaCl o una sal equivalente a cualquiera de los rangos o cantidades anteriores. En un ejemplo, el caudal para esta etapa de lavado es realizada a una velocidad más lenta que las otras etapas de lavado para permitir una mayor exposición de la nucleasa a las partículas e intermedios del rAAV cargados.

En un ejemplo, el gradiente salino tiene una fuerza iónica equivalente a al menos NaCl de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM o su equivalente en sal. En otro ejemplo, el gradiente salino posee una fuerza iónica equivalente a NaCl de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 190 mM o NaCl de aproximadamente 70 mM a aproximadamente 170 mM. En un ejemplo, los intermedios de AAVrh10 son separados de la resina de intercambio aniónico cuando el gradiente salino alcanza una fuerza iónica equivalente a 50 mM o más, o aproximadamente 70 mM de NaCl o más.

En diferentes momentos de este proceso, como se describe en el presente documento, las partículas rAAVrh10 unidas y los intermedios rAAVrh10 vacíos se disocian y aparecen en el efluente. El efluente pasa por dos detectores los cuales miden la concentración de sal (por conductividad) y la concentración de proteínas (por absorción de luz ultravioleta a una longitud de onda predeterminada). Sin embargo, pueden utilizarse otros medios de detección adecuados. A medida que se eluye cada proteína, aparece en el efluente como un "pico" de concentración de proteínas y puede recogerse para su uso posterior.

Como se describe en el presente documento, las fracciones bajo el pico de elución de 260 nm que contienen las partículas virales rAAVrh10 ("llenas") son recogidas y procesadas para su uso posterior. En un ejemplo, la preparación o reserva de rAAVrh10 resultante contiene una relación de partículas a genomas del vector de 1. Opcionalmente, las partículas virales de rAAVrh10 son colocadas en una suspensión que tiene un pH más cercano a un pH neutro el cual se utilizará para el almacenamiento a largo plazo y/o la administración a los pacientes. Dicho pH puede encontrarse en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5.

En un ejemplo, las partículas son eluidas en un pH de aproximadamente 10,0 y las partículas de rAAV son purificadas al menos en un 50-90 % de los intermedios de AAVrh10, o a un pH de 10,0 y en un 90 % a un 99 % de los intermedios de AAVrh10. Una reserva o preparación de partículas de rAAVrh10 (genomas empaquetados) está "sustancialmente libre" de cápsides de AAV vacías cuando las partículas de rAAVrh10 en la reserva representan al menos de aproximadamente un 75 % a aproximadamente un 100 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos un 99 % del rAAVrh10 en la reserva y las "cápsides vacías" son menos de aproximadamente un 1 %, menos de aproximadamente un 5 %, menos de aproximadamente un 10 %, menos de aproximadamente un 15 % del rAAVrh10 en la reserva o preparación.

En un ejemplo adicional, el rendimiento medio de las partículas de rAAV a partir del material cargado es de al menos un 70 %. Esto puede calcularse determinando el título (copias del genoma) en la mezcla cargada en la columna y la cantidad presente en las eluciones finales. Además, estas pueden determinarse basándose en el análisis q-PCR y/o en técnicas de SDS-PAGE tales como las descritas en el presente documento (véase las leyendas de las figuras) o las que se han descrito en la técnica.

Por ejemplo, para calcular el contenido de partículas vacías y llenas, los volúmenes de las bandas de VP3 para una muestra seleccionada (por ejemplo, en los ejemplos del presente documento, una preparación purificada por gradiente de yodixanol donde el $n.^{\circ}$ de GC = $n.^{\circ}$ de partículas) son trazadas contra las partículas de GC cargadas. La ecuación lineal resultante ($y = mx + c$) es utilizada para calcular el número de partículas en los volúmenes de banda de los picos del artículo de prueba. El número de partículas (pt) por 20 μ l cargados es multiplicado entonces por 50 para obtener las partículas (pt)/ml. El valor de pt/ml dividido entre el valor de GC/ml da la relación entre las partículas y las copias del genoma (pt/GC). Pt/ml-GC/ml proporciona el valor de pt vacías/ml. Las pt vacías/ml, divididas entre las pt/ml y x 100 proporciona el porcentaje de partículas vacías.

En general, son conocidos métodos de análisis de cápsides vacías y partículas de vectores AAV con genomas empaquetados. Véase, por ejemplo, Grimm *et al.*, *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer *et al.*, *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Para analizar las cápsides desnaturalizadas, los métodos incluyen someter la reserva de AAV tratada a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, que consiste en cualquier gel capaz de separar las tres proteínas de la cápside, por ejemplo, un gel de gradiente que contenga un 3-8 % de Tris-acetato en el tampón, después correr el gel hasta que se separa el material de la muestra y transferir el gel sobre membranas de nailon o nitrocelulosa, preferiblemente nailon. Posteriormente se utilizan anticuerpos dirigidos contra la cápside del AAV como anticuerpos primarios que se unen a proteínas de la cápside desnaturalizadas, preferiblemente un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cápside del AAV, lo más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal B1 dirigido contra AAV-2 (Wobus *et al.*, *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). Posteriormente es utilizado un anticuerpo secundario, uno que se une al anticuerpo primario y contiene un medio para detectar la unión con el anticuerpo primario, más preferiblemente un anticuerpo anti-IgG que contenga una molécula de detección unida covalentemente a él, lo más preferiblemente un anticuerpo IgG de oveja anti-ratón unido covalentemente a la peroxidasa de rábano picante. Se utiliza un método de detección de la unión para determinar semicuantitativamente la unión entre los anticuerpos primarios y secundarios, preferiblemente un método de detección capaz de detectar las emisiones de isótopos radiactivos, radiación electromagnética, o cambios colorimétricos, más preferiblemente un kit de detección por quimioluminiscencia.

Por ejemplo, para la SDS-PAGE, se pueden tomar muestras de las fracciones de la columna y calentarlas en tampón de carga SDS-PAGE que contenga agente reductor (por ejemplo, DTT), y las proteínas de la cápside se resolvieron en geles de poliácridamida de gradiente precolado (por ejemplo, Novex). La tinción de plata puede realizarse con SilverXpress (Invitrogen, CA) según las instrucciones del fabricante. En un ejemplo, la concentración de genomas de vectores AAV (vg) en las fracciones de la columna puede medirse mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Las muestras se diluyen y se digieren con DNasa I (u otra nucleasa adecuada) para eliminar el ADN exógeno. Tras la inactivación de la nucleasa, las muestras se diluyen y amplifican aún más utilizando cebadores y una sonda fluorogénica TaqMan™ específica para la secuencia de ADN entre los cebadores. El número de ciclos necesarios para alcanzar un nivel definido de fluorescencia (ciclo umbral, Ct) se mide para cada muestra en un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems Prism 7700. El ADN plasmídico que contiene secuencias idénticas a las del vector AAV es empleada para generar una curva patrón en la reacción Q-PCR. Los valores del ciclo umbral (Ct) obtenidos de las muestras son utilizados para determinar el título del genoma del vector normalizándolo con el valor de Ct de la curva patrón del plásmido. También pueden utilizarse ensayos de punto final basados en la PCR digital.

En un ejemplo, en el presente documento se describe un método de q-PCR optimizado que utiliza un amplio espectro de serina proteasas, por ejemplo, proteinasa K (como la disponible comercialmente en Qiagen). Más particularmente, el ensayo optimizado del título genómico de la qPCR es similar a un ensayo estándar, excepto que después de la digestión con DNasa I, las muestras son diluidas con tampón de proteinasa K y tratadas con proteinasa K, seguido de inactivación por calor. Las muestras se diluyen convenientemente con tampón de proteinasa K en una cantidad igual al tamaño de la muestra. El tampón de proteinasa K puede concentrarse hasta 2 veces o más. Normalmente, el tratamiento con proteinasa K es de aproximadamente 0,2 mg/ml, pero puede variarse de 0,1 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml. La etapa de tratamiento se realiza generalmente a aproximadamente 55 °C durante aproximadamente 15 minutos, pero puede realizarse a una temperatura más baja (por ejemplo, de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 50 °C) durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 30 minutos), o a una temperatura más alta (por ejemplo, hasta aproximadamente 60 °C) durante un periodo de tiempo más corto (por ejemplo, de aproximadamente 5 a 10 minutos). De manera similar, la inactivación por calor es generalmente a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 15 minutos, pero la temperatura puede reducirse (por ejemplo, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 °C) y prolongarse el tiempo (por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos). A continuación, las muestras son diluidas (por ejemplo, 1000 veces) y se someten al análisis TaqMan como se describe en el ensayo estándar.

Además o como alternativa, se puede utilizar la PCR digital de gota (ddPCR). Por ejemplo, se han descrito métodos para determinar los títulos del genoma del vector AAV monocatenario y autocomplementario mediante ddPCR. Véase, por ejemplo, M. Lock *et al.*, *Hu Gene Therapy Methods*, *Hum Gene Ther Methods*. abr de 2014;25(2): 115-25. doi:10.1089/htgb.2013.131. Epub 14 de febrero de 2014.

En un ejemplo, la mezcla que se aplica a la resina de intercambio aniónico ha sido purificada de la contaminación con materiales presentes en el sistema de producción. De manera adecuada, la mezcla que comprende las partículas virales recombinantes de AAVrh10 y los intermedios de AAVrh10 contiene menos de aproximadamente un 10 % de contaminación de materiales proteínicos y de ácidos nucleicos no AAV, o menos de aproximadamente un 5 % de contaminantes, o menos de un 1 % de materiales proteínicos y de ácidos nucleicos virales y celulares contaminantes. Por lo tanto, la mezcla cargada en la resina de intercambio aniónico está libre de contaminantes entre un 95 % y un 99 % aproximadamente.

Como se usa en el presente documento, el término "contaminantes" se refiere a materiales de la célula hospedadora, víricos y proteicos de otro tipo los cuales están presentes en el cultivo de producción o que son subproductos del mismo. Este término no incluye las partículas de rAAV ni los intermedios de rAAV que hayan formado cápsides de AAV.

En un ejemplo, la divulgación utiliza un método de cromatografía en dos etapas en el cual se utiliza la captura por afinidad para separar una mezcla de partículas virales AAVrh10 recombinantes y productos intermedios de la cápside AAV rh10 de los contaminantes del sistema de producción. Ventajosamente, se ha comprobado que este procesamiento permite procesar aproximadamente de 3 a 5 veces la cantidad de material de partida (basándose en la concentración de copias del genoma del rAAV) utilizando aproximadamente de 5 a 10 veces menos resina, en comparación con ciertas estrategias del estado de la técnica (por ejemplo, una estrategia del estado de la técnica utilizaba la captura por afinidad después del intercambio aniónico y otra utilizaba múltiples columnas de resina de intercambio iónico secuenciales).

Esta captura por afinidad se realiza adecuadamente utilizando una resina de afinidad de captura de anticuerpos. En un ejemplo, el soporte sólido es una matriz de agarosa reticulada al 6 % que tiene un tamaño medio de partícula de aproximadamente 34 µm y que tiene un anticuerpo específico para el AAV. Un ejemplo de una de estas resinas de afinidad disponibles en el mercado es la resina de afinidad de alto rendimiento AVB Sepharose™ que utiliza un fragmento de anticuerpo monocatenario de camélido procedente de llama, el cual está disponible en el mercado de GE Healthcare (AVB Sepharose). La información sobre el producto del fabricante indica que el producto se une a AAV 1, 2, 3 y 5, pero no hace referencia a AAVrh10. La información del fabricante recomienda además un caudal de hasta 150 cm/h y una concentración de sal de carga relativamente baja. Se pueden seleccionar o diseñar otras resinas de afinidad adecuadas que contengan un anticuerpo específico para el AAV, un anticuerpo específico para AAVrh10 u otra construcción de inmunoglobulina la cual es un ligando específico para AAV. Estos soportes sólidos pueden ser cualquier material de matriz polimérica adecuado, por ejemplo, agarosa, sefarsa, sephadex, entre otros.

Las cantidades de carga adecuadas pueden encontrarse en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5×10^{15} GC, o menos, basándose en la capacidad de una columna de 30 ml. Pueden calcularse cantidades equivalentes para columnas de otros tamaños u otros recipientes. En este punto, antes de la separación con resina de intercambio aniónico como se describe en el presente documento, el término "copia del genoma" se refiere a las partículas llenas en una mezcla de partículas de rAAVrh10 llenas y rAAVrh10 vacías/intermedias.

En un ejemplo, la mezcla se intercambia con el tampón de equilibrio/carga de la columna. El método descrito en el presente documento utiliza una concentración salina relativamente elevada para cargar la columna. En un ejemplo, la mezcla que contiene las partículas virales de AAVrh10 y los intermedios de AAVrh10 se carga en la resina de afinidad en un tampón que tiene una alta concentración de sal, por ejemplo, NaCl de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 650 mM u otras una o más sales que tengan una fuerza iónica equivalente. La etapa de lavado para la resina de afinidad se lleva a cabo posteriormente a una concentración de sal incluso más elevada, por ejemplo, en el intervalo de NaCl de aproximadamente 750 mM a aproximadamente 1 M o equivalente. En un ejemplo, la mezcla de AAVrh10 es mantenida a una concentración de sal de NaCl de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 650 mM o equivalente antes de aplicarla a la columna de resina de intercambio aniónico. En un ejemplo adicional, la mezcla de rAAVrh10 es mantenida en esta concentración salina después de la concentración y antes de la carga en la resina de afinidad.

Un ejemplo de un tampón adecuado es el tampón AVB A, que contiene NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 600 mM o NaCl a aproximadamente 400 mM o el equivalente iónico de otra sal, Tris-Cl de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM u otro tampón, a un pH neutro. El caudal en la carga puede ser un valor recomendado por el fabricante, por ejemplo, aproximadamente 149 cm/hora. Se aplica una etapa de lavado utilizando tampón AVB C (NaCl 1 M o una sal equivalente, citrato de sodio 20 mM, pH neutro), seguido de un lavado con el tampón AVB A, y el uso del tampón AVB B para la elución. En un ejemplo, el tampón AVB B contiene NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 600 mM, o NaCl a aproximadamente 400 mM, o el equivalente iónico de otra sal, Tris-Cl de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, o Tris-Cl a aproximadamente 20 mM u otro tampón. En un ejemplo, esta etapa es realizada en el intervalo recomendado por el fabricante, por ejemplo, un pH bajo como, por ejemplo, aproximadamente 2,5. En un ejemplo, para estas etapas se utilizan de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 o aproximadamente 5 volúmenes de columna.

En un ejemplo, se realiza al menos una etapa de digestión con nucleasas antes de cargar la mezcla en la resina de intercambio aniónico, es decir, durante la recolección de las partículas de rAAV y los productos intermedios del cultivo celular de producción. En un ejemplo adicional, se realiza un segundo paso de digestión con nucleasas durante la captura por afinidad. Por ejemplo, puede incorporarse al método de afinidad un paso de lavado adicional en el que las una o más nucleasas se mezclan previamente con un tampón y se usan en la etapa de lavado. De manera adecuada, el tampón tiene un pH neutro y una concentración de sal relativamente baja, por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 mM, NaCl aproximadamente 30 mM en aproximadamente 50 ml o aproximadamente 40 mM, basado en la fuerza iónica del NaCl o una sal equivalente a cualquiera de los rangos o cantidades anteriores. En un ejemplo, el caudal para esta etapa de lavado es realizada a una velocidad más lenta que los otros pasos de lavado para permitir una mayor exposición de la nucleasa a las partículas e intermedios del rAAV cargados.

En esta etapa se puede utilizar una sola nucleasa o una mezcla de nucleasas. Dichas nucleasas pueden ser selectivas para el ADN monocatenario, el ADN bicatenario o el ARN. Mientras que los ejemplos de trabajo ilustran el uso de una desoxirribonucleasa (DNasa) (por ejemplo, benzonasa o turbonucleasa), se conocen otras nucleasas adecuadas, muchas de las cuales están disponibles en el mercado. Por lo tanto, puede seleccionarse una nucleasa adecuada o una combinación de nucleasas. Además, las una o más nucleasas seleccionadas para esta etapa pueden ser las mismas o diferentes a las nucleasas durante el procesamiento antes de la etapa de afinidad y que sigue más inmediatamente a la recolección del cultivo celular.

En un ejemplo, la carga para la primera etapa de cromatografía de afinidad es obtenida tras la recolección y posterior procesamiento de lisados celulares y/o sobrenadantes de una producción de cultivo celular. Este procesamiento puede implicar al menos uno de los siguientes procesos, incluyendo, lisis opcional, recogida opcional del sobrenadante (medio), filtraciones, clarificación, concentración y el intercambio de tampones.

Son conocidos numerosos métodos en la técnica para la producción de vectores rAAV, incluyendo transfección, producción de líneas celulares estables, y sistemas de producción de virus híbridos infecciosos los cuales incluyen híbridos de adenovirus-AAV, híbridos de herpesvirus-AAV e híbridos de baculovirus-AAV. Véase, por ejemplo, G Ye, *et al.*, Hu Gene Ther Clin Dev, 25: 212-217 (diciembre de 2014); RM Kotin, Hu Mol Genet, 2011, Vol. 20, Rev Edición 1, R2-R6; M. Mietzsch, *et al.*, Hum Gene Therapy, 25: 212-222 (marzo de 2014); T Virag *et al.*, Hu Gene Therapy, 20: 807-817 (agosto de 2009); N. Clement *et al.*, Hum Gene Therapy, 20: 796-806 (agosto de 2009); DL Thomas *et al.*, Hum Gene Ther, 20: 861-870 (agosto de 2009). Los cultivos para la producción de partículas de virus rAAV pueden requerir; 1) células hospedadoras adecuadas, incluyendo, por ejemplo, líneas celulares derivadas de humanos, tal como HeLa, A549, o 293, o líneas celulares derivadas de insectos tales como SF-9, en el caso de sistemas de producción de baculovirus; 2) función de virus colaborador adecuada, proporcionada por adenovirus de tipo silvestre o mutante (tal como el adenovirus sensible a la temperatura), virus del herpes, baculovirus, o una construcción de ácido nucleico que proporciona funciones colaboradoras en trans o en cis; 3) genes rep funcionales del AAV, genes y productos génicos de cap funcionales; 4) un transgén (como un transgén terapéutico) flanqueado por secuencias de ITR de AAV; y 5) medios y componentes de medios adecuados para apoyar la producción de rAAV.

Se ha descrito una variedad de células y líneas celulares adecuadas para su uso en la producción de AAV. La célula en sí puede ser seleccionada de cualquier organismo biológico, incluyendo células procariotas (por ejemplo, bacterianas) y células eucariotas, incluyendo, células de insecto, células de levadura y células de mamífero. Las células hospedadoras particularmente deseables son seleccionadas entre cualquier especie de mamífero, incluyendo, sin limitación, células tales como A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, BHK, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, WI38, HeLa, una célula HEK 293 (que expresa E1 adenovírica funcional), Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y fibroblastos primarios, células de hepatocitos y mioblastos derivados de mamíferos, incluidos seres humanos, mono, ratón, rata, conejo y hámster. En ciertos ejemplos, las células son células adaptadas al cultivo en suspensión. La selección de la especie de mamífero que proporciona las células no es una limitación de la presente invención; ni es el tipo de célula de mamífero, es decir, fibroblastos, hepatocitos, células tumorales, etc.

Las secuencias de AAV pueden ser obtenidas de una variedad de fuentes. Por ejemplo, una secuencia de AAV adecuada puede ser obtenida como se describe en el documento WO 2005/033321 o de fuentes conocidas, por ejemplo, la American Type Culture Collection, o una variedad de centros académicos de vectores. Como alternativa, las secuencias adecuadas son generadas sintéticamente utilizando técnicas conocidas con referencia a las secuencias publicadas. En el presente documento se proporcionan ejemplos de secuencias de AAV adecuadas.

Además del casete de expresión, la célula contiene las secuencias que impulsan la expresión de una cápside de AAV en la célula (secuencias de *cap*) y secuencias de *rep* de la misma fuente que la de las ITR de AAV encontradas en la expresión de casete o una fuente de complementación cruzada. Las secuencias de *cap* y *rep* de AAV pueden ser seleccionadas de forma independiente a partir de diferentes secuencias parentales de AAV y ser introducidas en la célula hospedadora de una forma adecuada y conocida en la técnica. Aunque puede utilizarse el gen *rep* de longitud completa, se ha observado que algunos fragmentos más pequeños del mismo, es decir, *rep*78/68 y el *rep*52/40 son suficientes para permitir la replicación y el empaquetado del AAV.

En un ejemplo, la célula hospedadora contiene al menos las secuencias de ADN de adenovirus mínimas necesarias para expresar un producto génico E1a, un producto génico E1b, un producto génico E2a y/o un producto génico E4 ORF6. En los ejemplos en los cuales la célula hospedadora es portadora solo de E1, el producto génico E2a y/o el producto génico E4 ORF6 pueden ser introducidos a través de un plásmido auxiliar o por co-infección de adenovirus. En otro ejemplo, el producto génico E2a y/o E4 ORF6 pueden sustituirse por funciones colaboradoras de herpesvirus. La célula hospedadora puede contener otros genes adenovirales, tales como ARN VAI, pero estos genes no son necesarios. En un ejemplo, la célula utilizada no es portadora de ningún gen de adenovirus que no sea E1, E2a y/o E4 ORF6; no contiene otros genes de virus que podrían dar como resultado la recombinación de homólogos de un virus contaminante durante la producción de rAAV; y tiene capacidad de infección o transfección mediante el ADN y expresa los uno o más genes transfectados.

Un tipo de célula útil en los métodos y sistemas descritos en el presente documento es una célula hospedadora transformada de forma estable con las secuencias que codifican *rep* y *cap*, y que se transfecta con el ADN de E1, E2a, y E4ORF6 de adenovirus y una construcción que porta el casete de expresión como se ha descrito anteriormente. También se pueden emplear líneas celulares estables que expresen *rep* y/o *cap*, como B-50 (publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 99/15685), o las descritas en la patente US5.658.785. Otra célula hospedadora deseable contiene el ADN adenoviral mínimo que es suficiente para expresar E4 ORF6. Se pueden construir otras líneas celulares utilizando las secuencias de *cap* modificadas de la divulgación.

La preparación de una célula hospedadora implica técnicas como el ensamblaje de secuencias de ADN seleccionadas. Este montaje puede realizarse utilizando técnicas convencionales. Dichas técnicas incluyen ADNc y clonación genómica, que son bien conocidas y son descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY., incluida la reacción en cadena de la polimerasa, métodos sintéticos, y cualquier otro método adecuado que proporcione la secuencia de nucleótidos deseada.

Los componentes necesarios para la producción de AAV (por ejemplo, productos génicos de E1a, E1b, E2a y/o E4ORF6 de adenovirus, *rep* o uno o más fragmentos del mismo, *cap*, el casete de expresión, así como cualquier otra función colaboradora deseada), pueden suministrarse a la célula hospedadora empaquetadora por separado o en combinación, en forma de cualquier elemento genético que transfiera las secuencias portadas en el mismo.

Como alternativa, pueden proporcionarse a la célula hospedadora, en *trans* utilizando un elemento genético adecuado, uno o más de los componentes que es necesario cultivar en la célula hospedadora para empaquetar un casete de expresión en una cápside de AAV.

Para la producción de vectores rAAV pueden utilizarse medios adecuados conocidos en la técnica. Estos medios incluyen, sin limitación, medios producidos por Hyclone Laboratories y JRH, incluido el medio Eagle modificado (MEM),

el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), formulaciones personalizadas tales como las descritas en la patente de los Estados Unidos n.º 6.566.118 y los medios SFM Sf-900 II descritos en la patente de los Estados Unidos n.º 6.723.551, en particular con respecto a las formulaciones de medios personalizados para su uso en la producción de vectores recombinantes de AAV.

Los medios de cultivo para la producción de rAAV pueden complementarse con suero o proteínas recombinantes derivadas del suero a un nivel del 0,5 %-20 % (v/v o p/v). Como alternativa, como se conoce en la técnica, los vectores rAAV pueden producirse en condiciones sin suero, que también pueden denominarse medios sin productos de origen animal. Un experto habitual en la materia apreciará que los medios comerciales o personalizados diseñados para soportar la producción de vectores de rAAV también pueden complementarse con uno o más componentes de cultivo celular conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación, glucosa, vitaminas, aminoácidos y/o factores de crecimiento, con el fin de aumentar el título del rAAV en los cultivos de producción.

Los cultivos de producción de rAAV pueden proliferar en diversas condiciones (en un amplio rango de temperaturas, durante diferentes periodos de tiempo, y similares) adecuadas para la célula hospedadora particular que se utilice. Como se conoce en la técnica, los cultivos de producción de rAAV incluyen cultivos dependientes de la fijación que pueden ser cultivados en recipientes adecuados dependientes de la fijación, tales como por ejemplo, matraces rotatorios, filtros de fibra hueca, microportadores y biorreactores de lecho empaquetado o de lecho fluidizado. Los cultivos de producción de vector de rAAV también pueden incluir células hospedadoras adaptadas al cultivo en suspensión, tales como las células HeLa, 293 y SF-9, que pueden cultivarse de diversas maneras, incluido, por ejemplo, matraces de agitación, biorreactores de tanque agitado y sistemas desechables, tales como el sistema de bolsas de olas.

Las partículas del vector rAAV pueden ser cosechadas a partir de cultivos de producción de rAAV mediante la lisis de las células hospedadoras del cultivo de producción o mediante la cosecha de los medios gastados del cultivo de producción, siempre que las células sean cultivadas en condiciones conocidas en la técnica para provocar la liberación de partículas de rAAV en los medios a partir de células intactas, como se describe con más detalle en la patente de los Estados Unidos n.º 6.566.118. Los métodos adecuados para lisar las células también son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, múltiples ciclos de congelación/descongelación, ultrasonidos, microfluidización y tratamiento con productos químicos, tales como detergentes y/o proteasas.

En el momento de la recolección, los cultivos de producción de rAAV pueden contener uno o más de los siguientes: (1) proteínas de la célula hospedadora; (2) ADN de la célula hospedadora; (3) ADN plasmídico; (4) virus colaborador; (5) proteínas del virus colaborador; (6) ADN del virus colaborador; y (7) componentes de los medios, incluyendo, por ejemplo, proteínas séricas, aminoácidos, transferrinas y otras proteínas de baja masa molecular.

En algunos ejemplos, la cosecha del cultivo de producción de rAAV se aclara para eliminar los restos de células hospedadoras. En algunos ejemplos, la cosecha del cultivo de producción se aclara por filtración a través de una serie de filtros de profundidad que incluyen, por ejemplo, un filtro Millipore Millistak+HC Pod de grado DOHC, un filtro Millipore Millistak+ HC Pod de grado A1HC, y un filtro de membrana hidrófila de 0,2 µm Opticap XL10 Millipore Express SHC. El aclarado también puede lograrse mediante diversas técnicas estándar diferentes conocidas en la técnica, tales como, centrifugación o filtración a través de cualquier filtro de acetato de celulosa de 0,2 µm o mayor tamaño de poro conocido en la técnica. También hay otros filtros de profundidad adecuados, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,045 µm a aproximadamente 0,2 µm o pueden utilizarse otras técnicas de filtración.

De manera adecuada, la recolección del cultivo de producción de rAAV se trata con una nucleasa, o una combinación de nucleasas, para digerir cualquier ácido nucleico de alto peso molecular contaminante presente en el cultivo de producción. Los ejemplos expuestos en el presente documento ilustran una DNasa, por ejemplo, digestión con Benzonase® realizada en condiciones estándar conocidas en la técnica. Por ejemplo, se utiliza una concentración final de 1 unidad/ml a 2,5 unidades/ml de Benzonase® a una temperatura que oscila entre la temperatura ambiente y 37 °C durante un periodo de 30 minutos a varias horas, o bien aproximadamente 2 horas. En otro ejemplo, se usa una turbonucleasa. Sin embargo, un experto en la materia puede utilizar otra nucleasa adecuada o una mezcla de nucleasas. Los ejemplos de otras nucleasas adecuadas se describen anteriormente en esta memoria descriptiva.

La mezcla que contiene partículas llenas de rAAV y productos intermedios de rAAV (incluidas las cápsides vacías) puede aislarse o purificarse utilizando uno o más de las siguientes etapas de purificación: filtración de flujo tangencial (TFF) para concentrar las partículas de rAAV, inactivación por calor del virus colaborador, captura del rAAV mediante cromatografía de interacción hidrófoba, intercambio de tampones por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) y/o nanofiltración. Estas etapas pueden utilizarse individualmente, en varias combinaciones, o en diferentes órdenes. En algunos ejemplos, el método comprende todas las etapas en el orden descrito a continuación.

En algunos ejemplos, la mezcla tratada con Benzonase® es concentrada mediante filtración de flujo tangencial ("TFF"). La concentración a gran escala de virus mediante la ultrafiltración TFF se ha descrito por R. Paul *et al.*, Hu Gene Ther, 4:609-615 (1993). La concentración por TFF del flujo de alimentación permite someter un volumen técnicamente manejable de flujo de alimentación a las etapas cromatográficas de la presente divulgación y permite un dimensionado más razonable de las columnas sin necesidad de largos tiempos de recirculación. En algunos ejemplos, el flujo de alimentación de rAAV es concentrado entre al menos dos veces y al menos diez veces. En algunos ejemplos, el flujo de alimentación es concentrado entre al menos diez veces y al menos veinte veces. En algunos ejemplos, el flujo de alimentación se concentra entre al menos veinte veces y al menos cincuenta veces. Un experto en la materia reconocerá también que la TFF puede utilizarse también en cualquier paso en el proceso de purificación en el que sea deseable intercambiar tampones antes de realizar el siguiente paso del proceso de purificación.

Como se usa en el presente documento, la forma singular de los artículos "un", "una" y "el/la" incluye referencias al plural, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una partícula de virus" incluye una o más partículas de virus.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "comprender", "que comprende", "contiene", "que contiene", y sus variantes son lenguaje de reivindicación abierto, es decir, permiten elementos adicionales. En cambio, las expresiones "consiste", "consistente", y sus variantes son lenguaje reivindicativo cerrado, es decir, excluye elementos adicionales.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a dicho valor o parámetro en sí. Por ejemplo, una descripción que haga referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X". En el contexto de los valores de pH, "aproximadamente" se refiere a una variabilidad de $\pm 0,2$ respecto al valor dado. Por ejemplo, "aproximadamente 10,0" abarca de 9,8 a 10,2. En cuanto a otros valores, a menos que se especifique otra cosa, "aproximadamente" se refiere a una variabilidad de $\pm 10\%$ de un valor dado. En determinados ejemplos, la variabilidad puede ser del 1 %, 5 %, 10 %, o valores intermedios.

Aunque los métodos de purificación descritos en el presente documento están diseñados particularmente para la separación de las partículas de rAAVrh10 llenas de los intermedios de rAAVrh10 vacíos, un experto en la materia puede aplicar estas técnicas a otros rAAV los cuales están estrechamente relacionados con el AAVrh10, incluyendo, por ejemplo, rh39, rh20, rh25, AAV10, bb1, bb2 y pi2, que se describen en la patente US 2013/0045186, el AAV descrito la patente US 7.906.111 (por ejemplo, hu37), derivado de rh10 u otro AAV. Como se ha descrito en los ejemplos que siguen a continuación, aunque otros AAV están estrechamente relacionados con el rAAVrh10, no todos los AAV estrechamente relacionados tienen la misma afinidad de unión a las resinas en las condiciones descritas en el presente documento para el AAVrh10.

En otro ejemplo más, la divulgación proporciona un método escalable para separar las partículas virales de AAVrh10 llenas de los intermedios de AAVrh10 mediante el uso de una resina de captura de afinidad basada en anticuerpos anti-AAV seguida de una resina de intercambio aniónico. En un ejemplo, la captura por afinidad incluye una etapa de digestión con nucleasas. En un ejemplo adicional, la mezcla de rAAVrh10 se mantiene en esta concentración salina después de la concentración y antes de la carga en la resina de afinidad.

En un ejemplo adicional, la mezcla purificada por afinidad que contiene las partículas virales con secuencias genómicas empaquetadas es separada de los intermedios de la cápside de AAVrh10 deficientes para el genoma sometiendo la mezcla a cromatografía líquida de alto rendimiento a un pH de aproximadamente 10. Más particularmente, las partículas virales de AAVrh10 y los intermedios AAVrh10 se unen a una resina de intercambio aniónico equilibrada a un pH de aproximadamente 9,8 a aproximadamente 10 y se someten a un gradiente de sal mientras se controla la absorbancia ultravioleta del eluido a aproximadamente 260 y aproximadamente 280, en donde las cápsides llenas de AAVrh10 son recogidas de una fracción que se eluye cuando la relación A260/A280 alcanza un punto de inflexión.

En un ejemplo adicional más, se divulga un método para separar partículas virales de AAVrh10 recombinante que contienen ADN que comprende secuencias genómicas de intermedios de cápside de AAVrh10 deficientes para el genoma (vacíos). El método implica:

- (a) formar una suspensión de carga que comprende partículas virales de AAVrh10 recombinante e intermedios de cápside de AAV rh10 vacíos que han sido purificados para eliminar los materiales distintos de AAV de un cultivo de células productoras de AAV en el que se generaron las partículas y los intermedios; y un tampón A que comprende Bis-Tris propano (BTP) 20 mM y un pH de aproximadamente 10,0;
- (b) cargar la suspensión de (a) en una resina de intercambio aniónico fuerte, encontrándose dicha resina en un recipiente que tiene una entrada para el flujo de una suspensión y/o solución y una salida que permite el flujo del eluido del recipiente;

(c) lavar la resina de intercambio aniónico cargada con tampón B al 1 %, que comprende NaCl 10 mM y BTP 20 mM con un pH de aproximadamente 10,0;

(d) aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la resina de intercambio aniónico cargada y lavada, en donde el gradiente de sal se encuentra en el intervalo de NaCl 10 mM a aproximadamente 190 mM, incluyendo los extremos, o un equivalente; y

(e) recoger las partículas de rAAV del eluido recogido, seguido de una concentración de sal de NaCl de al menos aproximadamente 70 mM, o una sal o fuerza iónica equivalente, purificándose dichas partículas de rAAV de los intermedios de rh10.

En un ejemplo adicional, el cultivo celular productor de rAAVrh10 se selecciona de un cultivo celular de mamífero, un cultivo de células bacterianas, y un cultivo de células de insectos, en donde dichas células productoras comprenden al menos (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una cápside de AAVrh10 unida operativamente a secuencias las cuales dirigen la expresión de la cápside de AAVrh10 en las células productoras; (ii) una secuencia de ácido nucleico que comprende secuencias de repetición terminal invertida de AAV y secuencias de transgenes genómicos para su empaquetamiento en la cápside de AAV rh10; y (iii) secuencias funcionales de rep de AAV vinculadas de forma operativa a secuencias que dirigen la expresión de las mismas en las células productoras. En otro ejemplo, las células productoras comprenden además secuencias de virus auxiliares necesarias para el empaquetamiento y la replicación del AAVrh10 en una partícula viral.

En otro ejemplo más, el material cosechado del cultivo celular se aplica a una resina de afinidad para separar los contaminantes de las partículas virales AAVrh10 y los intermedios vacíos de la cápside AAVrh10.

En un ejemplo adicional, la separación con resina de afinidad comprende:

(i) equilibrar la resina de afinidad con el tampón A1, el cual comprende NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 600 mM, Tris-Cl a aproximadamente 20 mM y un pH neutro antes de aplicar el material a la resina de afinidad;

(ii) lavar la resina cargada de (a) con el tampón C1 que comprende entre NaCl de aproximadamente 800 mM a aproximadamente 1200 mM, Tris-Cl 20 mM y un pH neutro;

(iii) lavar la resina lavada con el tampón C1 de (b) con el tampón A1 para reducir la concentración de sal;

(iv) lavar la resina de afinidad de (c) con el tampón B, que comprende NaCl de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 600 mM, citrato de sodio 20 mM, pH de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 3; y

(v) recoger el eluido de (iv) que comprende las partículas de AAVrh10 llenas y la fracción de cápside de AAVrh10 vacía para cargarla en la resina de intercambio aniónico.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de los métodos para producir partículas de AAV en el sobrenadante de los cultivos celulares.

EJEMPLOS

Se describe un esquema de purificación por cromatografía en dos pasos que captura y aísla selectivamente las partículas del vector AAV que contienen el genoma a partir del sobrenadante clarificado y concentrado de las células HEK 293 cinco días después de la transfección. La carga para el primer paso de cromatografía utilizando resina de afinidad AVB Sepharose High Performance (GE), consiste en el sobrenadante concentrado en TFF 10X, clarificado por filtro, recogido de diez recipientes de cultivo celular Hyperstack de 36 capas que han sido previamente tratados a 37 °C con 958.500 unidades de Benzonase durante 2 h, seguido de un choque hipertónico con NaCl 0,5 M durante 2 h. Antes de la carga, se intercambia el tampón de la recolección a granel con la columna de equilibrado/carga (tampón AVB A), se incuba durante una noche a 4 °C y después se filtra con un filtro de profundidad de PES de 0,2 µm (Sartorius). La muestra se aplica a una columna AVB de 30 ml, empaquetada en flujo, con una altura de lecho de aproximadamente 15 cm, utilizando una estación de cromatografía líquida AKTA Avant 150 (GE) y el siguiente método:

Caudal: 149 cm³·h⁻¹ (5 ml/min)

Equilibrado: 3 VC de tampón AVB A (NaCl 400 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5)

Aplicación de la muestra: aprox. 4200 ml

Lavado 1: 5 VC de tampón AVB D (MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 40 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5)

Premezcla con 150 µl (37.500 u) de nucleasa Benzonase

Reducir el caudal a 30 cm³·h⁻¹ (5 ml/min)

Lavado 2: 5 VC de tampón AVB C (NaCl 1 M, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5)

Lavado 3: 3 VC de tampón AVB A

Elución: 2 VC de tampón AVB B (NaCl 400 mM, citrato de sodio 20 mM, pH 2,5)

Reequilibrado: 3 VC de tampón Poros-9 A

Un volumen de 500 µl de tampón de neutralización AVB (Pluronic F-68 al 0,01 %, Bis-Tris propano 0,2 M, pH 10,0) se añade previamente a los tubos de la fracción de elución y al finalizar la ejecución, las fracciones de 5 ml bajo el pico de elución principal de 280 nm (normalmente tres fracciones) son agrupadas y diluidas 50 veces con tampón de AEX A-10,0 (Bis-Tris propano 20 mM a pH 10,0) más Pluronic F-68 (0,001 % final) en un matraz de polipropileno.

Posteriormente se realiza una cromatografía de intercambio aniónico para separar las partículas virales completas o portadoras de ADN de las partículas vacías contaminantes en la segunda etapa. Específicamente, el eluido diluido de la columna procedente de la etapa de captura es aplicado a una columna monolítica CIMmultus QA de 8 ml preequilibrada (BIA Separations) y es ejecutado el siguiente método:

Caudal: 10 ml/min

Equilibrado: 20 VC de Tampón AEX 1 % de B (Bis-Tris propano 20 mM a pH 10,0, NaCl 10 mM)

Aplicación de la muestra: aproximadamente 800 ml para tres fracciones diluidas de AVB

Lavado 1: 10 VC de tampón AEX 1 % B-10,0

Elución: tampón AEX B-10,0 al 1-19 % (Bis-Tris propano 20 mM a pH 10,0, NaCl 1 M)

Gradiente lineal en 60 VC a 20 ml/min

Desnudado: 20 VC de tampón AEX B-10,0 al 100 %

Reequilibrado: 10 VC de tampón AEX 1 % B-10,0

Un volumen de 370 µl de tampón de neutralización AEX (Pluronic F-68 al 0,027 %, Bis-Tris 1 M a pH 6,3) es añadido previamente a los tubos de elución para minimizar la exposición del vector al pH extremo tras la elución. Finalmente, las fracciones de 10 ml bajo el pico principal de elución de 260 nm (aproximadamente 10) son agrupadas y son concentrados/diafiltrados con un tampón de formulación utilizando una membrana de fibra hueca.

Producción de vectores anterior

Los vectores AAV rh10 se producen mediante el método de transfección triple en células HEK293 como se ha descrito anteriormente (Lock *et al.* 2010, Hum Gene Ther, 21(1): 1259-1271). Se recogen los medios de diez recipientes de cultivo celular Hyperstack de 36 capas y son tratados a 37 °C con Benzonase a 25 U/ml durante 2 h, seguido de un choque hipertónico con NaCl 0,5 M durante 2 h. El medio es filtrado y concentrado 10 veces mediante filtración de flujo tangencial (TFF) y luego es cambiado el tampón utilizando el mismo aparato con el tampón de equilibrado/carga de la columna (tampón AVB A). Este "material de cosecha a granel" es incubado durante la noche a 4 °C y luego es filtrado con un filtro de profundidad PES de 0,2 µm (Sartorius).

Ejemplo 1: Separación de partículas AAVrh10 completas (que contienen secuencias genómicas empaquetadas) y cápsides vacías

El sobrenadante del cultivo de producción del vector AAVrh10 se cargó en una columna de afinidad AVB (GE) a pH neutro en sal 400 mM y se eluyó con un tampón de pH bajo (~2,5). El eluido se ajustó inmediatamente a pH neutro y se diluyó 50 veces en Bis-Tris-propano (BTP) 20 mM a pH 10 (tampón A). Se cargaron 2×10^{14} copias del genoma del vector (GC) del material del vector purificado por afinidad en una columna CIMmultus-QA™ de 8 ml (Bia Separations) a un flujo de 40 ml/min (133 cm/h).

La columna se lavó en tampón A con NaCl 20 mM, se eluyó con un gradiente salino poco profundo (NaCl 20-180 mM, 60 volúmenes de columna (VC), es decir, 2,7 mM/VC)) con el mismo caudal y luego se desnudó con el tampón B de alta salinidad (2 %) (BTP 20 mM, NaCl 1 M). En la FIG 1A se muestra un cromatograma de la ejecución de CIMmultus -

QA™. Se combinaron las fracciones que representaban la carga, el lavado, el gradiente de elución y la tira de columnas y se evaluó el contenido de GC resistente a DNasa mediante qPCR. La mayoría de los genomas de vectores resistentes a DNasas se recuperaron en las fracciones de gradiente, lo que demuestra la presencia de partículas llenas. En el cromatograma se observaron cinco picos (Fig. 1A; P1-P5) en el gradiente de elución y en desnudado de la columna. El pico principal (P2) y un pico secundario (P3) tenían lecturas A260 que superaban las lecturas A280 mientras que la lectura A280 de P1, P4 y P5 fue mayor que la lectura de A260. Dado que el ADN absorbe predominantemente a 260 nm y las proteínas a 280 nm, la inversión de A260/A280 en estos dos conjuntos de picos sugirió la presencia de partículas de vector llenas (que contienen el genoma) y vacías (que carecen de genoma), respectivamente.

Para confirmar esta observación, las fracciones individuales dentro de P1 y P2 fueron analizadas tanto por el ensayo GC resistente a DNasas como por SDS PAGE (FIG. 1B-1C). P1 y P2 contenían un 1,75 % y un 75 %, respectivamente, de los GC del vector cargados en la columna CIMmultus; sin embargo, la cantidad total de proteína de la cápside del AAV observada en los dos picos era similar. Estas observaciones confirman que P1 contiene mayoritariamente cápsides vacías mientras que P2 contiene mayoritariamente cápsides llenas. Se desarrolló un método basado en SDS-PAGE para cuantificar el total de cápsides (Fig. 1D-F.) y se analizó más a fondo la fracción de picos agrupados P2 (Fig. 1D, PD005). En este método, una preparación purificada por purificación en gradiente de yodixanol (Fig. 1D, WL618) y que se sabe que contiene el 100 % de las cápsides llenas, se diluyó en serie y se corrió en un gel SDS-PAGE junto con la fracción de pico agrupado P2 diluida de forma similar. Se escaneó el gel teñido y se determinó el área bajo los picos de la proteína de la cápside VP3. En el caso del patrón de referencia completo (WL618), el número de GC cargado equivale al número de partículas del vector y, por lo tanto, se puede trazar una curva patrón del número de partículas frente al volumen del pico de VP3 (FIG. 1E). La curva patrón es utilizada para determinar el número de partículas en la fracción agrupada de pico P2 y la división de este número con el número de GC cargado da la relación pt:GC. Como se muestra en las FIG. 1F-1G, tanto para PD005 como para otra preparación de P2 (PD008) preparada por un método idéntico, las relaciones de pt:GC eran cercanas a 1 en la mayoría de las diluciones probadas, lo que refuerza aún más la conclusión de que el pico P2 contiene predominantemente cápsides de vectores completos.

Ejemplo 2: escalabilidad del proceso

Una preparación separada del vector AAVrh10 purificado con $5,5 \times 10^{14}$ GC se cargó en una columna CIMmultus-QA™ de 8 ml en condiciones esencialmente idénticas, excepto que el caudal se ajustó a 10 ml/min (lavado con tampón B al 1 %, gradiente de NaCl 10-180 mM en 60 VC (2,8 mM/VC)). A pesar del aumento de la cantidad de vector cargado y de la reducción del caudal, se obtuvo un perfil cromatográfico similar con 5 picos (P1-P5) detectados en el gradiente de elución y en la banda de la columna (Fig. 1H). El análisis del contenido de GC mostró una vez más que la mayoría de las partículas llenas eluyeron en P2. Estos resultados demuestran la escalabilidad del método y la robustez con respecto a los cambios de caudal. Los picos 1, 2 y 5 fueron analizados mediante el ensayo de partículas de SDS-PAGE descrito en el Ejemplo 1 y los resultados se proporcionaron debajo del cromatograma. Se demostró una vez más que P1 y P2 contienen predominantemente partículas vacías y llenas, respectivamente. De manera interesante, el pico de desnudado de la columna (P5) también contenía partículas vacías en cantidades similares a la cantidad total de partículas llenas. Esta observación apoya la conclusión de que, en las condiciones de funcionamiento utilizadas, la columna CIMmultus es capaz de separar las principales poblaciones de partículas vacías (P5) y llenas (P2) mediante la unión de las partículas vacías con más fuerza, de manera que solo se eluyen en la franja de la columna de alta salinidad. Además, los resultados revelan la existencia de al menos dos poblaciones diferentes de partículas vacías, las que se unen fuertemente a la columna (P5) y las que se unen menos fuertemente y eluyen antes que las partículas llenas (P1). También se sugiere una tercera población de partículas vacías por la baja relación A260/A280 de P4 (FIG 1A) como se describe en el Ejemplo 1. Se cree que estas diferentes poblaciones de partículas representan diferentes intermedios de ensamblaje de los vectores recombinantes AAVrh10.

Ejemplo 3: efecto del caudal en la separación de cápsides llenas y vacías

Se investigó el efecto de los cambios de caudal en la separación de partículas a escala reducida en columnas CIMmultus-QA de 1 ml. Se cargaron 7×10^{13} GC de vector AAVrh10 purificado por ejecución y las tasas de flujo se redujeron apropiadamente al tamaño de la columna. Los cromatogramas resultantes de estas ejecuciones se muestran en las FIG. 2A-2D y una superposición de las trazas A280 de estas ejecuciones se muestra en la Figura 2E. Los mismos cinco picos observados a mayor escala se reprodujeron en las ejecuciones a escala reducida (Fig. 1B, P1-P5), lo cual demuestra la escalabilidad del sistema. Con el aumento del caudal, el tamaño del pico de partículas vacías obtenido en la tira de la columna disminuyó proporcionalmente, lo que indica una unión más débil de esta población de partículas a caudales más altos (Fig. 2E). Este efecto fue acompañado de un ligero aumento del tamaño de los picos P1 y P2 con el aumento de los caudales, lo que sugiere que las partículas vacías desplazadas ahora eluyen en el gradiente de elución. Los datos indican que el funcionamiento con caudales óptimos es importante para la separación óptima de las poblaciones de partículas.

Ejemplo 4: cambios de los efectos del pH en la separación de las cápsides vacías frente a las llenas

Se investigó el efecto de los cambios de pH en la separación de partículas manteniendo un caudal constante (0,9 ml/min) a escala reducida en columnas CIMmultus-QA™ de 1 ml. Se cargaron 7×10^{13} GC de vector AAVrh10 purificado por ejecución y se varió el pH de los tampones de carga y elución de pH 9 a pH 10. Los cromatogramas resultantes son mostrados en las FIG. 3A-3D. Los mismos cinco picos observados en las anteriores ejecuciones a gran escala estuvieron presentes en todas las ejecuciones, excepto en la de pH 9, en la que ya no se observó P4 (Fig. 3 A-D). La superposición de las trazas de A280 de las cuatro ejecuciones demuestra un cambio dramático del pico de la partícula completa P2 hacia el principio del gradiente de elución con la disminución del pH (Fig. 3E). Además, el tamaño de los picos P5 y P4 fue reducido sustancialmente, mientras que P2 aumentó con la disminución del pH. Los datos indican que cada reducción del pH por debajo de 10 hizo que tanto las partículas llenas como las vacías se unieran con menos fuerza a la columna y eluyeran antes en el gradiente de elución, reduciendo la separación entre cápsides llenas y vacías.

Ejemplo 5: efecto del pH en la potencia de AAVrh10

La reserva de vectores de una partícula rAAVrh10 que tenía empaquetado en ella un casete de expresión con un promotor específico del hígado y un transgén humano para el Factor IX y los ITR 5' y 3' de AAV2 se purificó utilizando el proceso de captura por afinidad en dos pasos y el proceso de resina de intercambio aniónico descrito en los Ejemplos 1 y 2 a pH 9,5 o pH 10,0, tras la producción con técnicas convencionales. La reserva de vectores se mantuvo a pH 10,0 o pH 9,5 y se evaluó la potencia tras 1 hora, 4 horas y durante la noche y luego se neutralizó, con un control que se mantiene a pH neutro. Estos datos no muestran ninguna diferencia en la potencia de estos vectores en ninguno de los pH en comparación con los controles.

Ejemplo 6: purificación con resina de afinidad

En un ejemplo, el proceso descrito en el presente documento utiliza una columna de alto rendimiento de sefarosa (por ejemplo, agarosa reticulada al 6 %) que utiliza un fragmento de 14 kD procedente de un anticuerpo de llama monocatenario expresado en levadura (AVB Sepharose™, GE Healthcare) antes de la columna de intercambio aniónico.

A. Plásmidos.

Se utilizaron las construcciones pAAV2/8, pAAV2/rh.64R1, pAAV2/9 y pAAV2/3B que expresan una de las proteínas de la cápside de AAV8, rh.64R1, AAV9 y AAV3B [SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 4, respectivamente]. La mutagénesis de estos plásmidos se llevó a cabo con el kit de mutagénesis de sitio dirigido QuikChange™ Lightning (Agilent Technologies, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores para la mutagénesis fueron:

SEQ ID NO: 11: 5'-ATCCTCCGACCACCTTCAGCCCTGCCAAGTTTGCTTCTTTTCATCACGCAATA-3' y
 SEQ ID NO: 12: 5'-TATTGCGTGATGAAAGAAGCAAACCTTGGCAGGGCTGAAGGTGGTGGGAGGAT -3' para
 pAAV2/8 (NQSCLN→SPAKFA, SEQ ID NO: 19 y 20, respectivamente),
 SEQ ID NO: 13: 5'-ATCCTCCAACAGCGTTTCAGCCCTGCCAAGTTTGCTTCTTTTCATCACGCAGTA-3' y
 SEQ ID NO: 14: 5'-TACTGCGTGATGAAAGAAGCAAACCTTGGCAGGGCTGAACGCTGTTGGAGGAT -3' para
 pAAV2/rh.64R1 (NQAKLN→SPAKFA, SEQ ID NO: 21 y 20, respectivamente), SEQ ID NO: 15: 5'-
 ATCCTCCAACGGCCTTCAGCCCTGCCAAGTTTGCTTCTTTTCATCACCCAGTA-3' y
 SEQ ID NO: 16: 5'-TACTGGGTGATGAAAGAAGCAAACCTTGGCAGGGCTGAAGGCCGTTGGAGGAT -3' para
 pAAV2/9 (NKDKLN→SPAKFA, SEQ ID NO: 22 y 20, respectivamente),
 SEQ ID NO: 17: 5'-ATCCTCCGACGACTTTCAACAAGGACAAGCTGAACCTCATTTATCACTCAGTA-3' y SEQ ID
 NO: 18: 5'-TACTGAGTGATAAATGAGTTTCAGCTTGCTCTTGTTGAAAGTCGTCGGAGGAT-3' para pAAV2/3B
 (SPAKFA→NKDKLN, SEQ ID NO: 20 y 22, respectivamente).

B. Vectores.

Se produjeron preparaciones de vector purificadas AAV2/8.CMV.fluciferase.SV40 AAV2/rh.64R1.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH, AAV2/hu.37.TBG.EGFP.bGH y AAV2/rh.10.CMV.PI.Cre.RBG, y se titularon mediante Penn Vector Core como se ha descrito anteriormente [Lock, M, *et al.* (2010). Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. Human Gene Therapy 21: 1259-1271]. Brevemente, se transfectó un cúmulo celular (Corning, NY) de células HEK293 con un cóctel de triple plásmido mediante polietilenimina (PEI) cuando la confluencia celular alcanzó aproximadamente un 85 %. El sobrenadante del cultivo se recogió 5 días después de la transfección y se digirió con turbonucleasa (Accelagen, CA). Se añadió NaCl a una concentración de 0,5 M y el sobrenadante tratado se concentró con filtración de flujo tangencial (TFF). La concentración fue seguida de una ultracentrifugación en gradiente de densidad con yodixanol y la formulación final por intercambio de tampón a través de Amicon® Ultra-15 (EMD Millipore, MA) en DPBS (solución salina tamponada de Dulbecco sin calcio ni magnesio, 1X, Mediatech, VA) con NaCl 35 mM. Se añadió glicerol al 5 % (v/v) y los vectores se

almacenaron a -80 °C hasta su uso. Para la valoración, se realizó una PCR en tiempo real con reactivos Taqman (Applied Biosystems, Life Technologies, CA) dirigida a las secuencias de poliadenilación de RBG, bGH y SV40, respectivamente. El AAV2/3B.CB7.Cl.fluciferase.RBG se preparó de la misma manera, excepto que en la etapa de TFF, se utilizó el tampón AVB.A (Tris pH 7,5, 20 mM, NaCl 0,4 M) para el intercambio de tampones. Posteriormente, se conservó la fracción retenida a 4 °C y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm antes de su aplicación a la columna de AVB.

Para los vectores utilizados en la comparación entre el tipo silvestre y el mutante SPAKFA, cada cápside de tipo silvestre y sus mutantes se prepararon en paralelo a partir de una placa de 15 cm, utilizando una versión del protocolo descrito anteriormente, pero reducido proporcionalmente según la superficie de cultivo de la placa. El sobrenadante del cultivo se trató con turbonucleasa y se almacenó entonces a -20 °C. Antes de la aplicación a la columna AVB, el sobrenadante se clarificó a 47.360 x g y 4 °C durante 30 minutos, seguido de una filtración a través de un filtro de 0,22 µm. El casete transgénico de estos vectores fue CB7.Cl.fluciferase.RBG.

C. Cromatografía.

Se utilizó un sistema AKTAFPLC (GE Healthcare Life Sciences, NJ) para todos los estudios de unión. La columna HiTrap (1 ml) utilizada estaba preempaquetada con resina AVB Sepharose™ High Performance (GE Healthcare Life Sciences, NJ). Los vectores AAV se reconstituyeron en el tampón AVB. A y se cargaron en una columna equilibrada en el mismo tampón. La columna se lavó con 6 ml de tampón AVB.A y 5 ml de tampón AVB.C (Tris pH 7,5, NaCl 1 M) y luego se eluyó con 3 ml de tampón AVB.B (citrato de sodio 20 mM, pH 2,5, NaCl 0,4 M). Las fracciones de pico eluidas se neutralizaron inmediatamente con 1/10 x volumen de tampón BTP (Bis tris-propano 0,2 M, pH 10). El caudal fue de 0,7 ml/min (109 cm/hora). Para comprobar la afinidad de los vectores AAV por la resina AVB, se mezclaron números de copias del genoma (GC) iguales de los vectores AAV8, rh.10 y hu.37 purificados antes de cargarlos. Para rh.64R1, la carga consistió en una cantidad igual (GC) de rh. 10 y rh.64R1 en el tampón AVB.A. Para AAV3B, el producto AAV3B clarificado se cargó directamente en la columna AVB. Para la comparación de los vectores AAV y sus mutantes SPAKFA, se cargaron 9,5 ml del producto clarificado en la columna AVB a 0,7 ml/min, seguido de un lavado con 8 ml de DPBS y 5 ml de AVB.C a 1 ml/min, y luego se eluyó con 4 ml de AVB.B a 0,25 ml/min. El eluido se neutralizó inmediatamente como se ha indicado anteriormente.

D. Ensayo de infectividad *in vitro*.

Se sembraron células Huh7 en placas de 96 pocillos a una densidad de 5e4 células/pocillo. A continuación, las células se infectaron con vectores AAV portadores del casete transgénico CB7.Cl.fluciferase.RBG 48 horas después de la siembra. Tres días después de la infección, la actividad de la luciferasa se midió con un luminómetro Clarity (BioTek, VT).

E. Alineación de secuencias y análisis de estructuras.

Las alineaciones de secuencias se realizaron con el algoritmo ClustalW mediante el componente AlignX de Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen, CA). Las secuencias de proteínas fueron: AAV1 (referencia:NP_049542) [SEQ ID NO: 1], AAV2 (referencia:YP_680426) [SEQ ID NO: 2], AAV3 (referencia:NP_043941) [SEQ ID NO: 3], AAV3B (referencia:AAB95452) [SEQ ID NO: 4], AAV5 (referencia:YP_068409) [SEQ ID NO: 5], rh.10 (referencia:AAO88201) [SEQ ID NO: 6], hu.37 (referencia:AAS99285) [SEQ ID NO: 7], AAV8 (referencia:YP_077180) [SEQ ID NO: 8], rh.64R1 (referencia:ACB55316) [SEQ ID NO: 9], AAV9 (referencia: AAS99264) [SEQ ID NO: 10]. El análisis de la estructura se realizó con el programa Chimera [Pettersen, EF, *et al.* (2004). J Comput Chem 25: 1605-1612; Sanner, MF, *et al.*, (1996). Biopolymers 38: 305-320] y la estructura de la cápside del AAV8 (PDB: 2QA0) [Nam, HJ, *et al.*, (2007). Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. J Virol 81: 12260-12271].

Resultados

F. La afinidad de la resina AVB por los serotipos de AAV varió significativamente.

Probar la afinidad de la resina AVB por los serotipos AAV8, rh.64R1 y hu.37, se mezclaron preparaciones de vectores AAV y se añadió el serotipo rh.10 como control positivo interno. Esta mezcla de preparaciones se realizó para minimizar las variaciones durante la cromatografía. Debido a las limitadas opciones de sondas de PCR en tiempo real, se prepararon dos tipos de mezclas de vectores, AAV8 + hu.37 + rh.10 y rh.64R1 + rh. 10, y se ejecutaron en la columna de afinidad AVB. La distribución del genoma del vector rh. 10 entre las diferentes fracciones recolectadas fue muy similar entre las dos ejecuciones (datos no mostrados), por lo que se utilizó la media de las dos ejecuciones para informar de los datos de rh.10. Como se muestra en la FIG 4, el 84 % del genoma del vector rh.10 cargado estaba presente en la fracción de elución. La afinidad del vector hu.37 fue similar a la del rh.10, con un 82 % en la fracción de elución. Por el contrario, tanto el vector AAV8 como rh.64R1 se unen mal a la resina AVB, con solo un 20 % y un 22 %

en la fracción de elución, respectivamente. La afinidad del AAV3B por la resina AVB fue notable, con el 98 % de los genomas del vector recuperados en la fracción de elución.

G. La alineación de la secuencia y el análisis de la estructura mostraron que la región de aminoácidos 665-670 (numeración de la VP1 de AAV8) era la región más diversa en la superficie de la cápside entre los serotipos de AAV de alta afinidad de AVB, AAV3B, rh.10 y hu.37, y los serotipos de baja afinidad, AAV8 y rh.64R1.

Entre los residuos expuestos en la superficie de la cápside del AAV8 (número de referencia PDB: 2QA0 [Nam, HJ, *et al.*, J Virol, 81: 12260-12271 (2007)]), los siguientes veintiséis residuos son idénticos entre los serotipos rh. 10 y hu.37 pero diferentes a los de AAV8 (formato de numeración: resto de AAV8-AAV8 VP1 numeración-rh.10/resto de hu.37): A269S, T453S, N459G, T462Q, G464L, T472N, A474S, N475A, T495L, G496S, A507G, N517D, I542V, N549G, A551G, A555V, D559S, E578Q, I581V, Q594I, I595V, N665S, S667A, N670A, S712N, V722T. Entre los 26 residuos, solo el residuo 665 (numeración de AAV8 VP1, SEQ ID NO: 8), es idéntico entre AAV1, 2, 3B, AAV5, rh.10 y hu.37. Todos los serotipos AAV de baja afinidad (AAV8, rh.64R1 y AAV9) tienen un residuo de Asn en esta posición, mientras que los serotipos de alta afinidad tienen Ser. El residuo 665 se localiza en una pequeña mancha variable (665-670, numeración de AAV8 VP1) de la cápside de AAV. Toda la mancha está expuesta en la superficie de la cápside, cerca de la región del poro y, por tanto, se seleccionó todo este epítipo para los experimentos de intercambio. Dado que la afinidad del serotipo AAV3B por la resina AVB es muy buena, se seleccionó el epítipo SPAKFA de AAV3B para intercambiarlo en los serotipos AAV8, rh.64R1 y AAV9 usando mutagénesis específica de sitio. Los mutantes resultantes se denominaron AAVx-SPAKFA. Como control, se preparó un mutante de intercambio inverso en el que el epítipo correspondiente de AAV9 (NKDKLN, SEQ ID NO: 22) se intercambió en la cápside de AAV3B; el mutante resultante se denominó AAV3B-NKDKLN. El rendimiento de producción del vector de los mutantes del epítipo SPAKFA fue del 81 % (AAV8), 82 % (rh.64R1) y 137 % (AAV9) de sus homólogos de tipo silvestre. El rendimiento del AAV3B-NKDKLN fue del 28 % del AAV3B.

H. El intercambio del epítipo SPAKFA mejoró en gran medida la afinidad de los serotipos AAV8, rh.64R1 y AAV9 por AVB.

Después de la sustitución de SPAKFA, se demostró una clara mejora en la afinidad de los serotipos AAV8, rh.64R1 y AAV9, aumentando el porcentaje de recuperación de vector cargado en la fracción de elución del 30 %, 18 %, y el 0,6 % de las fracciones totales al 93 %, 91 % y 51 %, respectivamente. En cambio, cuando se intercambió el epítipo NKDKLN de AAV9 en AAV3B, el rendimiento de la fracción de elución disminuyó del 98 % al 87 %, y las fracciones de flujo continuo (FT), lavado 1 (W1) y lavado 2 (W2), aumentaron del 1,3 % al 8,2 %, del 0,0 % al 0,1 %, y del 0,3 % al 4,6 %, respectivamente. Sin embargo, la mayor parte del AAV3B-NKDKLN seguía en la fracción de elución, indicando la existencia de otro(s) epítipo(s) que participan en la unión a la resina AVB.

I. La infectividad de los vectores AAV que contenían sustituciones de SPAKFA no se vio afectada por el intercambio de SPAKFA.

Una cuestión clave era si el intercambio de epítopos realizado mermaba la potencia del vector receptor. Para abordar esta cuestión, se realizó un ensayo de infectividad *in vitro* con los mutantes de sustitución del epítipo en células Huh7. Se utilizó una gama de concentraciones del vector para la infección con el fin de evitar la posible saturación de las vías de transducción con una alta multiplicidad de infección (M.O.I.). Para AAV3B y AAV3B-NKDKLN, la concentración del vector utilizada para la infección fue 1 log inferior a la de los otros vectores AAV debido a la gran infectividad del serotipo AAV3B para las células Huh7. La infectividad de los mutantes SPAKFA fue comparable a la de los vectores AAV de tipo silvestre. La infectividad de AAV3B-NKDKLN fue del 59 % del AAV3B.

Es muy deseable contar con un protocolo de purificación sencillo, eficiente, genérico y fácilmente escalable que pueda utilizarse para todos los serotipos de AAV. Las resinas de afinidad, como la AVB, probablemente desempeñarán un papel importante para permitir este proceso, como han demostrado recientemente en un estudio Mietzsch y colaboradores, [(2014) Human Gene Therapy 25: 212-222] en el que se purificaron 10 serotipos (AAV1-8, rh.10 y AAV12) en un solo paso a partir de lisado en bruto clarificado utilizando la resina AVB. Sin embargo, este ejemplo muestra que aunque AAV8, rh.64R1, hu.37, rh.10 y AAV3B pueden capturarse por la resina AVB, la afinidad de la resina por estos diferentes serotipos es muy diferente, con AAV3B que tiene una fuerte afinidad y AAV8 y rh.64R1 que se unen más débilmente. Aunque una mayor optimización de los tampones y de la caudal puede mejorar la unión del AAV8 en nuestras manos (datos no mostrados), las condiciones y la capacidad de la resina resultante aún no son óptimas para la ampliación del proceso.

La variación en la afinidad del AVB por los serotipos de AAV rh.10, AAV8, hu.37 y rh.64R1 fue intrigante, ya que todos ellos pertenecen al clado E y muestran un alto grado de similitud de secuencia. Por el contrario, otro serotipo, AAV5, se une bien a AVB, pero está lejanamente relacionado con los miembros del clado E. Estas observaciones nos llevaron a especular que algunas sutiles diferencias de secuencia pueden desempeñar un papel en las diferentes afinidades de

unión de estos serotipos a AVB. La alineación de secuencias y el análisis de la estructura de las proteínas de la cápside VP3 de estos serotipos nos llevaron a acotarlo al residuo 665. En esta posición, AAV8 y rh.64R1 son de asparagina mientras que en rh. 10, hu.37 y AAV5 son de serina. Dado que el parche de secuencia alrededor del residuo 665 es una región variable pequeña, se decidió intercambiar el parche completo de AAV8, rh.64R1 y AAV9 por el parche (SPAKFA) de AAV3B. La clara mejora de la afinidad observada tras estas sustituciones indica que el parche de la secuencia SPAKFA es un epítipo de la resina AVB. De manera importante, las sustituciones no afectaron a la aptitud de la cápside, en términos de rendimiento y de infectividad *in vitro*.

Otra observación interesante se hizo cuando se sustituyó el parche de secuencia correspondiente del serotipo AAV9, NKDKLN, en lugar del epítipo SPAKFA en la cápside de AAV3B. Mientras que la afinidad del vector AAV3B-NKDKLN estaba aparentemente debilitada, como lo demuestra la aparición del vector en la fracción de flujo continuo, la mayoría sigue ligada a la columna. Este resultado, junto con el hecho de que la sustitución del epítipo SPAKFA en AAV9 no produjo la afinidad observada con AAV3B, sugiere que hay otros epítipos además de SPAKFA en la secuencia de aminoácidos de VP3 de AAV3B que contribuyen a la unión a AVB. Un candidato a epítipo es la región que contiene los restos 328-333. Esta región se encuentra en la superficie exterior del poro de la pared, y está espacialmente cerca de la región de los residuo 665-670. El resto 333 está especialmente cerca en términos espaciales de la región de los residuos 665-670 y para los ligantes débiles de AVB tales como AAV8, rh.64R1 y AAV9, este residuo es lisina, mientras que en los serotipos de mayor unión, como el AAV3B, es treonina. La hipótesis que sugieren estas observaciones es que las regiones que contienen los residuos 665-670 y 328-333 contribuyen a la unión a AVB, aunque los residuos 665-670 son los que más contribuyen. Los datos de unión a AVB generados en este estudio, además de los datos de AAV3B-NKDKLN descritos anteriormente, respaldan esta hipótesis. Los serotipos con alta homología de SPAKFA en la región 665-670 y un residuo de treonina en la posición 333 se unen mejor a AVB (AAV3B, AAV1, AAV2 y AAV5). Los serotipos con baja homología de SPAKFA y un resto de lisina en la posición 333 se unen mal (AAV8, rh64R1 y AAV9). Los casos intermedios, como los serotipos rh10, hu37 y los mutantes con epítipos sustituidos que contienen SPAKFA pero tienen lisina en lugar de treonina en la posición 333 (AAV8-SPAKFA y rh64R1-SPAKFA) se unen a la resina AVB, pero menos bien que los serotipos como AAV3B. El análisis mutagénico posterior de la región 328-333 y la confirmación de su papel en la unión a AVB es complicado porque se solapa con las secuencias de codificación de la proteína de ensamblaje-activación (AAP) en otro marco de lectura [Sonntag, F, *et al.*, (2010), Proc Natl Acad Sci USA, 107: 10220-10225].

El descubrimiento del epítipo SPAKFA puede ser útil para predecir si AVB es una resina adecuada para la purificación de algunos de los serotipos de AAV menos utilizados. Por ejemplo, entre los miembros del clado E, los serotipos rh.8, rh.43 y rh.46 tienen secuencias muy similares a las de AAV8 en los residuos 665-670, por lo que su afinidad por AVB será probablemente baja. Por otro lado, es probable que los serotipos rh.39, rh.20, rh.25, AAV10, bb.1, bb.2 y pi.2 se unan bien porque su secuencia en esta región es idéntica (o muy similar) a la de rh. 10. De manera similar, para muchos miembros del clado D, la secuencia de aminoácidos 665-670 es TPAKFA y, por tanto, es probable que estos serotipos muestren una elevada afinidad por AVB, mientras que es probable que el serotipo rh.69 se una mal, ya que la secuencia de aminoácidos 665-667 es NQAKLN.

La sustitución del epítipo SPAKFA en las cápsides de serotipos de AAV con poca afinidad, tales como el AAV9, permitiría utilizar AVB como resina de cromatografía de afinidad universal para todos los serotipos de AAV. En los estudios presentados en el presente documento, el rendimiento y la infectividad de los vectores sustituidos por epítipos no se vieron afectados, pero no se investigó el impacto en el tropismo, ya que estaba fuera del alcance de este trabajo. Sin embargo, hay informes que muestran que el tropismo de los vectores AAV8 se relaciona principalmente con la región hipervariable VII (AAV8 549-564) y IX (AAV8 708-720) [Tenney, RM, *et al.* (2014), Virology 454: 227-236], y/o el subbucle 1 (AAV8 435-482) y el subbucle 4 (AAV8 574-643) [Shen, X, (2007) Molecular Therapy 15: 1955-1962] de la cápside del AAV8. Los datos de la cartografía de epítipos neutralizantes también apoyan la noción de que la estructura del poro de las cápsides del AAV y sus regiones cercanas, responsables de la unión a la resina AVB, no están implicadas en la transducción celular y, por tanto, en el tropismo. Los epítipos neutralizantes identificados hasta ahora se localizan principalmente alrededor del triple saliente de la cápside del AAV [Gurda, BL, *et al.* (2012). Journal of Virology 86: 7739-7751; Adachi, K, *et al.* (2014). Nat Commun 5: 3075; Moskalenko, *et al.* (2000) Journal of Virology 74: 1761-1766; Wobus, CE, *et al.* (2000). Journal of Virology 74: 9281-9293; Gurda, BL, *et al.* (2013). Journal of Virology 87: 9111-9124]. De hecho, para AAV2, la conmutación de la punta (RGNR) de la protuberancia triple dio lugar a cambios drásticos en el tropismo del vector. Otro estudio relevante de anticuerpos fue realizado con el anticuerpo monoclonal de ratón 3C5 generado contra AAV5. Este anticuerpo no es neutralizante [Harbison, CE, *et al.* (2012). Journal of General Virology 93: 347-355] y uno de sus epítipos se localiza en la región 665-670 [Gurda *et al.*, 2013, anteriormente citado]. Esta observación sugiere, por tanto, que la unión de anticuerpos en esta región no afecta a la transducción celular y por extensión, al tropismo.

La capacidad para examinar la unión de la resina AVB basándose en la secuencia primaria de aminoácidos, facilitaría en gran medida el proceso de selección del AAV adecuado. Para aquellos serotipos en los que se prevé que la unión a

la resina AVB sea pobre, la sustitución del epítipo SPAKFA puede presentar una solución viable y permitir la institución de un proceso de purificación universal para múltiples serotipos.

(Texto independiente del listado de secuencias)

5

La siguiente información se proporciona para secuencias que contienen texto independiente con el identificador numérico <223>.

SEQ ID NO: (que contiene texto independiente)	Texto independiente bajo <223>
1	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 1
2	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 2
3	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 3
4	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 3B
5	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 5
6	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado rh. 10
7	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado hu.37
8	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 8
9	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado rh.64R1
10	<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 9
11	<223> Cebador cadena arriba para la mutagénesis de NQSKLN a SPAKFA
12	<223> Cebador cadena abajo para la mutagénesis de NQSKLN a SPAKFA
13	<223> Cebador cadena arriba para la mutagénesis de NQAKLN a SPAKFA
14	<223> Cebador cadena abajo para la mutagénesis de NQAKLN a SPAKFA
15	<223> Cebador cadena arriba para la mutagénesis de NKDKLN a SPAKFA
16	<223> Cebador cadena abajo para la mutagénesis de NKDKLN a SPAKFA
17	<223> Cebador cadena arriba para la mutagénesis de SPAKFA a NKDKLN
18	<223> Cebador cadena abajo para la mutagénesis de SPAKFA a NKDKLN
19	<223> Epítipo como NQSKLN
20	<223> Epítipo como SPAKFA
21	<223> Epítipo como SNQAKLN
22	<223> Epítipo como NKDKLN

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Los Fideicomisarios de la Universidad de Pensilvania

<120> MÉTODO DE PURIFICACIÓN ESCALABLE PARA AAVrh10

15

<130> UPN-15-7485PCT

<150> US 62/266,347

<151> 11/12/2015

20

<150> US 62/322,055

<151> 13/04/2016

<160> 22

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 736

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 1

35

<400> 1

ES 2 918 998 T3

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser	
1				5					10					15		
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Asp	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro	
			20					25					30			
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	
		35					40					45				
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro	
	50					55					60					
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	
65					70					75					80	
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	
				85					90					95		
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	
			100					105						110		
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	
		115					120					125				
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	
	130					135					140					

ES 2 918 998 T3

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
 145 150 155 160
 Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
 260 265 270
 Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
 275 280 285
 His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
 290 295 300
 Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
 305 310 315 320
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
 325 330 335
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
 355 360 365
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400

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

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

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

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
450 455 460

Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465 470 475 480

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

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
565 570 575

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
580 585 590

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

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

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

Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala

ES 2 918 998 T3

645

650

655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

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

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

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

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

<210> 2

<211> 735

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 2

<400> 2

ES 2 918 998 T3

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Thr	Leu	Ser			
1				5					10					15				
Glu	Gly	Ile	Arg	Gln	Trp	Trp	Lys	Leu	Lys	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro			
			20					25					30					
Lys	Pro	Ala	Glu	Arg	His	Lys	Asp	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro			
		35					40					45						
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro			
	50					55					60							
Val	Asn	Glu	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp			
65					70					75					80			
Arg	Gln	Leu	Asp	Ser	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala			
				85					90					95				
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly			
			100					105					110					
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro			
		115					120					125						

ES 2 918 998 T3

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325 330 335
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser

ES 2 918 998 T3

370	375	380
Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser 385 390 395 400		
Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu 405 410 415		
Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg 420 425 430		
Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr 435 440 445		
Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln 450 455 460		
Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly 465 470 475 480		
Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn 485 490 495		
Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly 500 505 510		
Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp 515 520 525		
Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys 530 535 540		
Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr 545 550 555 560		
Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr 565 570 575		
Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr 580 585 590		
Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp 595 600 605		
Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr 610 615 620		

ES 2 918 998 T3

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

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

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
660 665 670

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

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

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

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

<210> 3

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 3

<400> 3

ES 2 918 998 T3

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	Val	Pro	Gln	Pro
			20					25					30		
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Asp	Asn	Arg	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	Glu	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	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly

ES 2 918 998 T3

100					105					110					
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Ile	Leu	Glu	Pro
		115					120					125			
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Gly
	130					135					140				
Ala	Val	Asp	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Gly
145					150					155					160
Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr
				165					170					175	
Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro
			180					185					190		
Ala	Ala	Pro	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly
		195					200					205			
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	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	Ser	Gln	Ser	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His	Tyr
			260					265					270		
Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe	His
		275					280					285			
Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn	Trp
	290					295					300				
Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Lys	Leu	Ser	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Val
305					310					315					320
Arg	Gly	Val	Thr	Gln	Asn	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Leu
				325					330					335	
Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr
			340					345					350		

ES 2 918 998 T3

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
 385 390 395 400
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
 405 410 415
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
 420 425 430
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr
 435 440 445
 Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln
 565 570 575
 Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
 580 585 590
 Thr Gly Thr Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
 625 630 635 640
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700
 Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn 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> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 3B

<400> 4

ES 2 918 998 T3

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 Val Pro Gln Pro
20 25 30

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

ES 2 918 998 T3

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 Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile 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 Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn 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 Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300
 Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

ES 2 918 998 T3

Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro	Tyr	340	345	350
Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	Ala	Asp	355	360	365
Val	Phe	Met	Val	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	Ser	370	375	380
Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Ser	385	390	395
Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Thr	Phe	Glu	405	410	415
Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Arg	420	425	430
Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Arg	Thr	435	440	445
Gln	Gly	Thr	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Gln	Ser	Arg	Leu	Leu	Phe	Ser	450	455	460
Gln	Ala	Gly	Pro	Gln	Ser	Met	Ser	Leu	Gln	Ala	Arg	Asn	Trp	Leu	Pro	465	470	475
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Leu	Ser	Lys	Thr	Ala	Asn	Asp	Asn	485	490	495
Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Pro	Trp	Thr	Ala	Ala	Ser	Lys	Tyr	His	Leu	Asn	500	505	510
Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	515	520	525
Asp	Asp	Glu	Glu	Lys	Phe	Phe	Pro	Met	His	Gly	Asn	Leu	Ile	Phe	Gly	530	535	540
Lys	Glu	Gly	Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Ala	Glu	Leu	Asp	Asn	Val	Met	Ile	545	550	555
Thr	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Arg	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Gln	565	570	575
Tyr	Gly	Thr	Val	Ala	Asn	Asn	Leu	Gln	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Thr	580	585	590

ES 2 918 998 T3

Thr Arg Thr Val Asn Asp Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

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

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

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

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

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

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

Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn 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> 724

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 5

<400> 5

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
50 55 60

ES 2 918 998 T3

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

ES 2 918 998 T3

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 325 330 335
 Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
 340 345 350
 Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
 370 375 380
 Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
 385 390 395 400
 Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
 405 410 415
 Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
 420 425 430
 Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
 435 440 445
 Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
 450 455 460
 Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
 465 470 475 480
 Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
 485 490 495
 Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
 500 505 510
 Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
 515 520 525
 Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
 530 535 540
 Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
 545 550 555 560
 Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser

ES 2 918 998 T3

565

570

575

Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
580 585 590

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
595 600 605

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
610 615 620

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
625 630 635 640

Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser
645 650 655

Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu
660 665 670

Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln
675 680 685

Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp
690 695 700

Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu
705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 6

<211> 738

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado rh.10

<400> 6

ES 2 918 998 T3

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser
1				5					10					15	
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Asp	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro
			20					25					30		
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
		35					40					45			

ES 2 918 998 T3

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

ES 2 918 998 T3

290		295		300												
Asn 305	Asn	Trp	Gly	Phe	Arg 310	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn 315	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn 320	
Ile	Gln	Val	Lys 325	Glu	Val	Thr	Gln	Asn 330	Glu	Gly	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala 335	
Asn	Asn	Leu	Thr 340	Ser	Thr	Ile	Gln	Val 345	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu 350	Tyr	Gln	
Leu	Pro	Tyr 355	Val	Leu	Gly	Ser	Ala 360	His	Gln	Gly	Cys	Leu 365	Pro	Pro	Phe	
Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile 375	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr 380	Leu	Thr	Leu	Asn	
Asn 385	Gly	Ser	Gln	Ala	Val 390	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe 395	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr 400	
Phe	Pro	Ser	Gln	Met 405	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn 410	Asn	Phe	Glu	Phe	Ser 415	Tyr	
Gln	Phe	Glu	Asp 420	Val	Pro	Phe	His	Ser 425	Ser	Tyr	Ala	His	Ser 430	Gln	Ser	
Leu	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu 440	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu 445	Tyr	Tyr	Leu	
Ser 450	Arg	Thr	Gln	Ser	Thr	Gly 455	Gly	Thr	Ala	Gly	Thr 460	Gln	Gln	Leu	Leu	
Phe 465	Ser	Gln	Ala	Gly	Pro	Asn 470	Asn	Met	Ser	Ala 475	Gln	Ala	Lys	Asn	Trp 480	
Leu	Pro	Gly	Pro	Cys 485	Tyr	Arg	Gln	Gln 490	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Leu 495	Ser	
Gln	Asn	Asn	Asn	Ser 500	Asn	Phe	Ala	Trp 505	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys 510	Tyr	His	
Leu	Asn	Gly 515	Arg	Asp	Ser	Leu	Val 520	Asn	Pro	Gly	Val	Ala 525	Met	Ala	Thr	
His 530	Lys	Asp	Asp	Glu	Glu	Arg 535	Phe	Phe	Pro	Ser	Ser 540	Gly	Val	Leu	Met	

ES 2 918 998 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 7

<211> 738

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado hu.37

<400> 7

ES 2 918 998 T3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

ES 2 918 998 T3

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

ES 2 918 998 T3

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510

ES 2 918 998 T3

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
515 520 525

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Leu

<210> 8

<211> 738

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 8

<400> 8

ES 2 918 998 T3

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser	1	5	10	15
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro	20	25	30	
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	35	40	45	
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro	50	55	60	
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	65	70	75	80
Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	85	90	95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	100	105	110	
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	115	120	125	
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	130	135	140	
Pro	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	145	150	155	160
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	165	170	175	
Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	180	185	190	
Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Met	Ala	Ala	Gly	Gly	195	200	205	
Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	210	215	220	

ES 2 918 998 T3

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
 245 250 255
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr
 405 410 415
 Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
 450 455 460
 Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480

ES 2 918 998 T3

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile
 530 535 540
 Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
 545 550 555 560
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575
 Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala
 580 585 590
 Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
 610 615 620
 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
 625 630 635 640
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
 645 650 655
 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe
 660 665 670
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
 675 680 685
 Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
 690 695 700
 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
 705 710 715 720
 Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg

725

730

735

Asn Leu

5

<210> 9
 <211> 738
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado rh.64R1
 <400> 9

ES 2 918 998 T3

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser	
1				5					10					15		
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Asp	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro	
			20					25					30			
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	
		35					40					45				
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro	
	50					55					60					
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	
65					70					75					80	
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	
				85					90					95		
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	
			100					105					110			
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	
		115					120					125				
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	
	130					135					140					
Pro	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	
145					150					155					160	
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	
				165					170					175		
Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Ile	Gly	Glu	Pro	
			180					185					190			

ES 2 918 998 T3

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Val Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
 210 215 220
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
 245 250 255
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Ser Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

ES 2 918 998 T3

435		440		445											
Ser	Arg	Thr	Gln	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Thr	Gln	Gln	Leu	Leu
450						455					460				
Phe	Ser	Gln	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ser	Ala	Gln	Ala	Arg	Asn	Trp
465					470					475					480
Leu	Pro	Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Leu	Ser
				485					490					495	
Gln	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Ala	Trp	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	His
			500					505					510		
Leu	Asn	Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Val	Ala	Met	Ala	Thr
		515					520					525			
Asn	Lys	Asp	Asp	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Ser	Ser	Gly	Ile	Leu	Met
530						535					540				
Phe	Gly	Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Lys	Asp	Asn	Val	Asp	Tyr	Ser	Asn	Val
545					550					555					560
Met	Leu	Thr	Ser	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr
				565					570					575	
Glu	Gln	Tyr	Gly	Val	Val	Ala	Asp	Asn	Leu	Gln	Gln	Gln	Asn	Thr	Ala
			580					585					590		
Pro	Ile	Val	Gly	Ala	Val	Asn	Ser	Gln	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Met	Val
		595					600					605			
Trp	Gln	Asn	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala	Lys	Ile
610						615					620				
Pro	His	Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Phe
625					630					635					640
Gly	Leu	Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val
				645					650					655	
Pro	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Ala	Phe	Asn	Gln	Ala	Lys	Leu	Asn	Ser	Phe
			660					665					670		
Ile	Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Glu	Ile	Val	Trp	Glu
		675					680					685			

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

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

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

Asn Leu

<210> 10

<211> 736

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de la cápside vp1 del virus adenoasociado 9

<400> 10

ES 2 918 998 T3

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				

ES 2 918 998 T3

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

ES 2 918 998 T3

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

ES 2 918 998 T3

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> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador cadena arriba para la mutagénesis de NQSKLN a SPAKFA

<400> 11

atctccgac caccctcagc cctgccaagt ttgcttctt catcacgcaa ta 52

<210> 12

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador cadena abajo para la mutagénesis de NQSKLN a SPAKFA

<400> 12

tattgcgtga tgaagaagc aaactggca gggctgaagg tggctggagg at 52

<210> 13

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador cadena arriba para la mutagénesis de NQAKLN a SPAKFA

<400> 13

atctccaac agcgttcagc cctgccaagt ttgcttctt catcacgcag ta 52

<210> 14

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador cadena abajo para la mutagénesis de NQAKLN a SPAKFA

<400> 14

ES 2 918 998 T3

tactgcgtga tgaagaagc aaactggca gggctgaacg ctgttgagg at 52

5 <210> 15
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador cadena arriba para la mutagénesis de NKDKLN a SPAKFA

<400> 15
atctccaac ggccttcagc cctgccaagt ttgctcttt catcaccag ta 52

15 <210> 16
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador cadena abajo para la mutagénesis de NKDKLN a SPAKFA

<400> 16
tactgggtga tgaagaagc aaactggca gggctgaagg ccgttgagg at 52

25 <210> 17
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador cadena arriba para la mutagénesis de SPAKFA a NKDKLN

<400> 17
atctccgac gacttcaac aaggacaagc tgaactcatt tatcactcag ta 52

35 <210> 18
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador cadena abajo para la mutagénesis de SPAKFA a NKDKLN

<400> 18
tactgagtga taaatgagtt cagcttgcc ttgtgaaag tcgtcgagg at 52

45 <210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Epítipo como NQSKLN

55 <400> 19

Asn Gln Ser Lys Leu Asn
1 5

60 <210> 20
<211> 6
<212> PRT

	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
5	<223> Epítipo como SPAKFA															
	<400> 20															
		<table border="0"> <tr> <td>Ser</td><td>Pro</td><td>Ala</td><td>Lys</td><td>Phe</td><td>Ala</td> </tr> <tr> <td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td> </tr> </table>	Ser	Pro	Ala	Lys	Phe	Ala	1				5			
Ser	Pro	Ala	Lys	Phe	Ala											
1				5												
10	<210> 21															
	<211> 7															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
15	<220>															
	<223> Epítipo como SNQAKLN															
	<400> 21															
20		<table border="0"> <tr> <td>Ser</td><td>Asn</td><td>Gln</td><td>Ala</td><td>Lys</td><td>Leu</td><td>Asn</td> </tr> <tr> <td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td> </tr> </table>	Ser	Asn	Gln	Ala	Lys	Leu	Asn	1				5		
Ser	Asn	Gln	Ala	Lys	Leu	Asn										
1				5												
	<210> 22															
	<211> 6															
25	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
	<223> Epítipo como NKDKLN															
30	<400> 22															
		<table border="0"> <tr> <td>Asn</td><td>Lys</td><td>Asp</td><td>Lys</td><td>Leu</td><td>Asn</td> </tr> <tr> <td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td> </tr> </table>	Asn	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn	1				5			
Asn	Lys	Asp	Lys	Leu	Asn											
1				5												

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar partículas virales AAVrh10 recombinantes (rAAVrh10) que contienen ADN que comprende secuencias genómicas farmacológicamente activas de intermedios de cápside AAVrh10 deficientes para el genoma (vacíos), comprendiendo dicho método:

(a) separar las partículas virales rAAVrh10 y los intermedios de la cápside de AAVrh10 de los contaminantes que no son AAV, obtenidas a partir de un cultivo de células productoras de AAV las cuales comprenden un casete de expresión que codifica una proteína de la cápside de AAVrh10 unido de forma operable a secuencias de control de la expresión las cuales dirigen la expresión de la misma en la célula productora, un casete de expresión que comprende secuencias para el empaquetado en la cápside del AAVrh10, y un casete de expresión que comprende los virus colaboradores necesarios para la producción y el empaquetado de la cápside del AAVrh10 en una partícula viral, en donde la separación es realizada mediante una resina de afinidad de alto rendimiento que presenta un anticuerpo para AAVrh10 para obtener los materiales purificados de (a);

(b) formar una suspensión de carga que comprende: una suspensión la cual comprende (i) materiales de la etapa (a) purificados con la resina de afinidad de elevado rendimiento y (ii) un primer tampón que comprende Bis-Tris propano (BTP) 20 mM y un pH en el intervalo de 9,8 a 10,2 o un pH de 10,0;

(c) cargar la mezcla de la etapa (b) en una resina de intercambio aniónico fuerte, encontrándose dicha resina en un recipiente que tiene una entrada para el flujo de una suspensión y/o solución y una salida que permite el flujo del eluido del recipiente;

(d) lavar la resina de intercambio aniónico cargada con un tampón que comprenda NaCl 10 mM y BTP 20 mM con un pH comprendido entre 9,8 y 10,2 o un pH de 10,0;

(e) aplicar un gradiente de concentración de sal creciente a la resina de intercambio aniónico cargada y lavada y controlar la fuerza iónica del eluido; y

(f) monitorizar el eluido para ver si hay un pico de absorbancia ultravioleta a 260 nm y un pico de 280 nm y recoger las partículas virales de rAAV10 de una fracción la cual se eluye cuando el pico de 260 nm cruza y supera el pico de 280 nm, purificándose dichas partículas virales de rAAV de los intermedios de la cápside de AAVrh10.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cultivo de células productoras es seleccionado entre un cultivo de células de mamífero, un cultivo de células bacterianas y un cultivo de células de insecto.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la separación con resina de afinidad de la etapa (a) comprende:

(i) equilibrar la resina de afinidad con un tampón que contiene NaCl de 200 mM a 600 mM y un pH de 6,5 a 8, antes de aplicar el material a la resina de afinidad;

(ii) lavar la resina cargada de la etapa (i) con un tampón que comprende NaCl de 800 mM a 1200 mM y un pH de 6,5 a 8;

(iii) lavar la resina lavada con tampón de la etapa (ii) con el tampón de la etapa (i) para reducir la concentración de sal;

(iv) lavar la resina de afinidad de la etapa (iii) con un tampón que comprende NaCl de 200 mM a 600 mM, citrato de sodio 20 mM y un pH de 2,4 a 3; y

(v) recoger el eluido de la etapa (iv) que comprende las partículas virales de rAAVrh10 llenas y la fracción de intermedios de cápside de AAVrh10 vacía para su carga en la resina de intercambio aniónico.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el pH se encuentra en el intervalo de 7,3 a 7,7 o el pH es 7,5 y/o en donde en la etapa (iv), el pH se encuentra en un intervalo de 2,3 a 2,7 o el pH es 2,5 y/o en donde el tampón de equilibrado de la etapa (i) y/o el tampón de la etapa (iv), tiene independientemente 400 mM de NaCl.

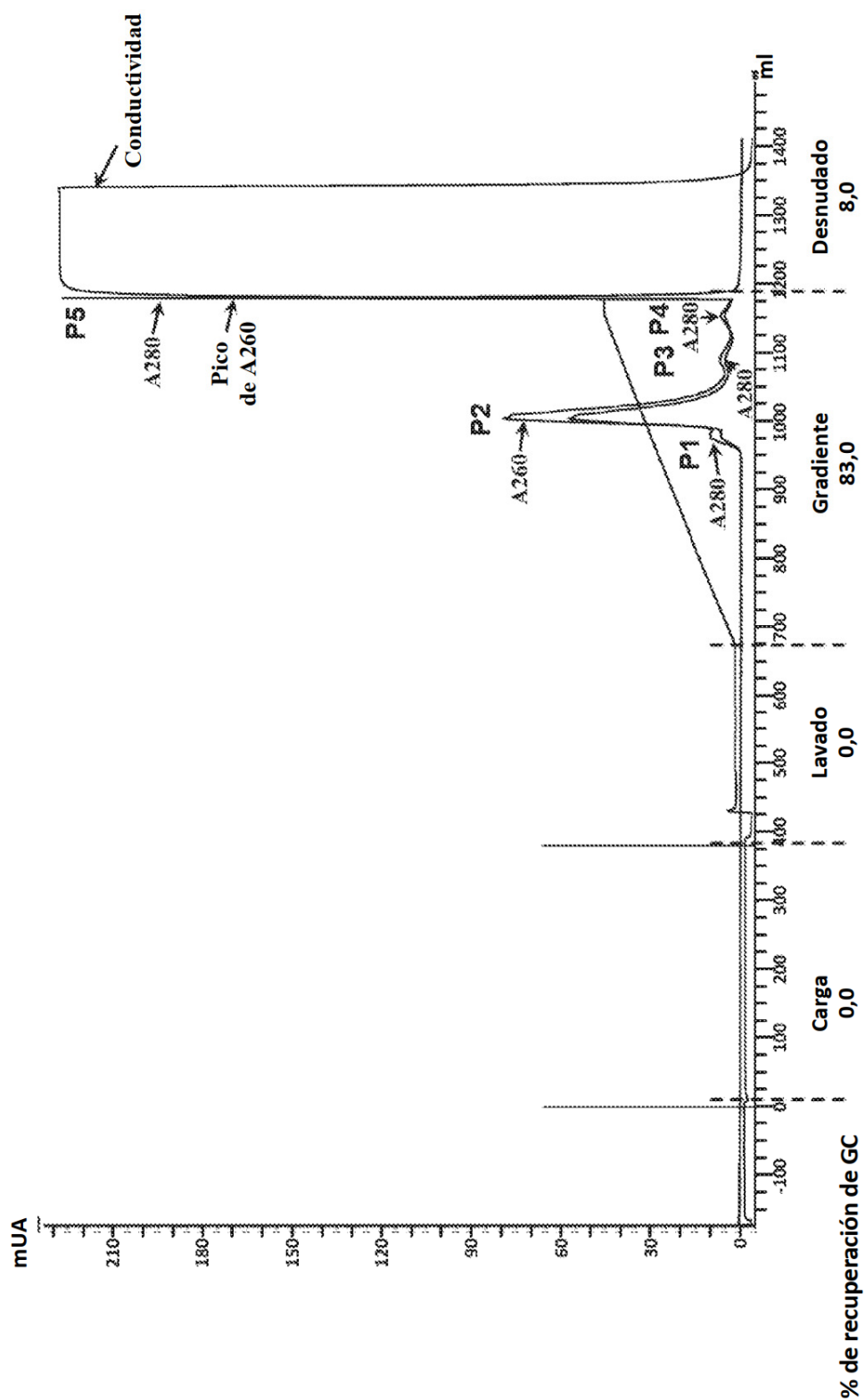
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende eliminar el eluido que comprende intermedios de la cápside de AAVrh10 cuando el gradiente de sal alcanza una fuerza iónica equivalente a 50 mM NaCl o 70 mM de NaCl.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método tiene un caudal de carga de muestra inferior o igual al caudal de elución.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la resina de intercambio aniónico es una resina fuerte y/o en donde la resina de intercambio aniónico se encuentra en una columna.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la captura por afinidad es realizada utilizando una resina de afinidad de elevado rendimiento de sefarosa.
- 5 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las partículas virales de rAAVrh10 y los intermedios de la cápside de rAAVrh10 son liberados en el medio de cultivo y el medio es recogido en una etapa de recolección, en donde, antes de la etapa (a), la célula productora y la recolección de medio que comprende partículas virales de rAAVrh10 e intermedios de la cápside de rAAVrh10 es tratada con nucleasa y purificada utilizando uno o más de los métodos siguientes: filtración de flujo tangencial, inactivación por calor del virus colaborador, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaños y/o nanofiltración.
- 10 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, en la etapa (a), la resina cargada es tratada con nucleasa en una etapa de lavado.
- 15 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo además clarificar una mezcla que comprende partículas virales de rAAVrh10 e intermedios de la cápside de rAAVrh10 recolectados en el sistema de células productoras mediante filtración a través de una serie de filtros de profundidad, eliminando así los residuos de células productoras de la mezcla antes de la etapa (a).

FIG 1A



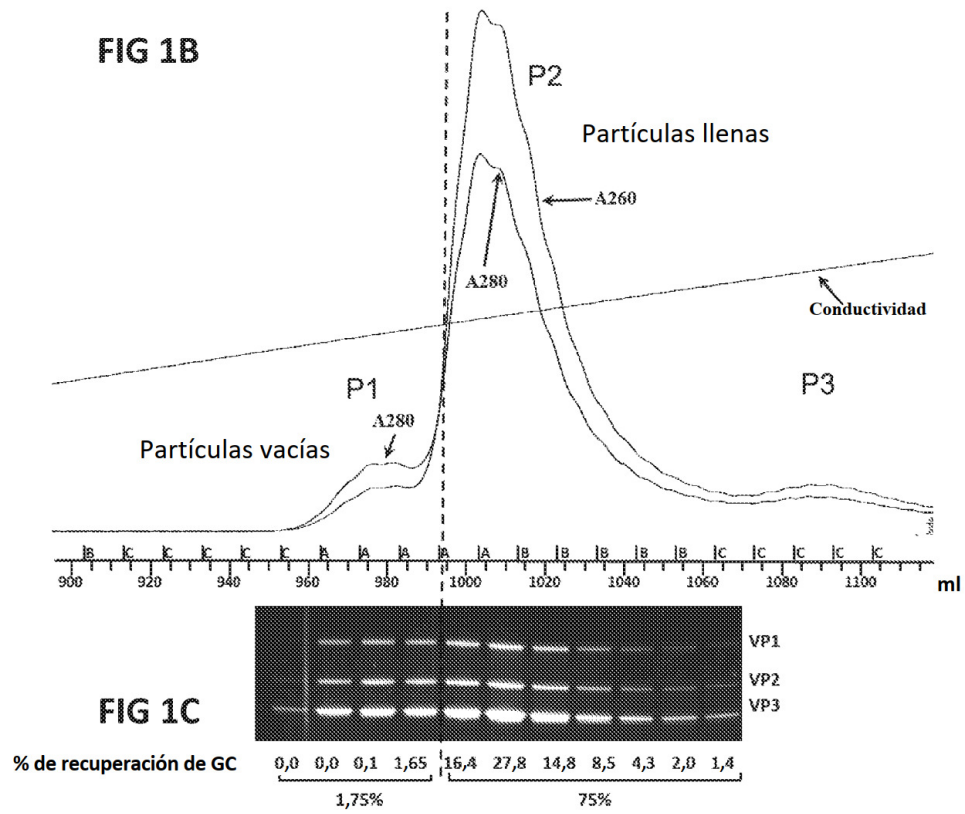


FIG 1D

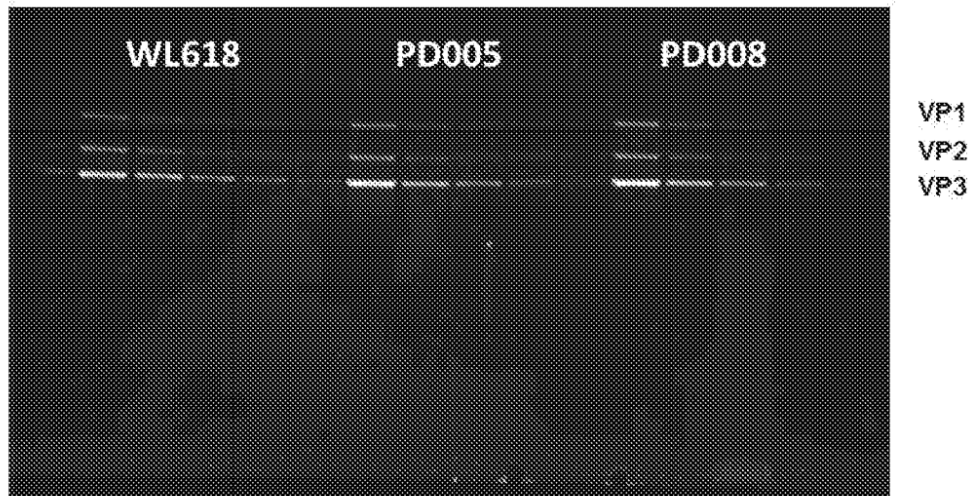


FIG 1E

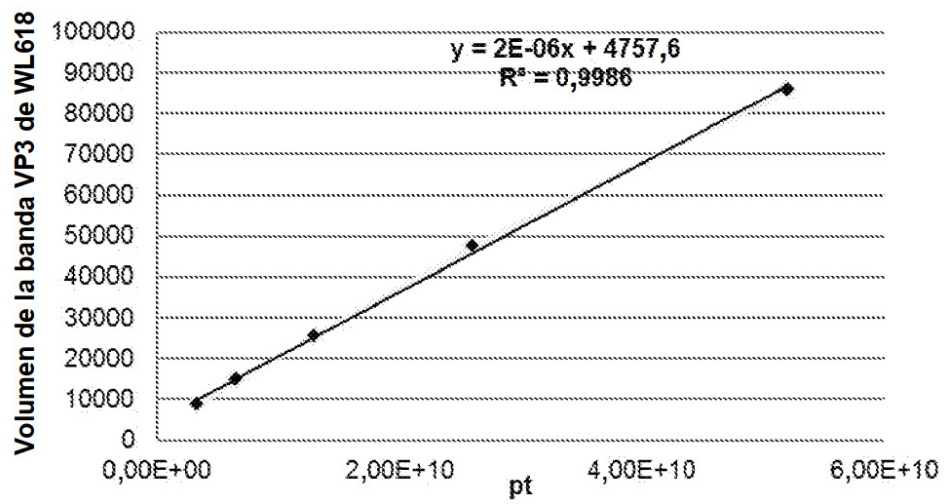


FIG 1F

PD005	GC	Vol bruto de VP3	Partículas calc.	pt.vg
	5,20E+10	101871	4,86E+10	0,93
	2,60E+10	48745	2,20E+10	0,85
	1,30E+10	25875	1,06E+10	0,81

FIG 1G

PD008	5,20E+10	108188	5,17E+10	0,99
	2,60E+10	49527	2,24E+10	0,86
	1,30E+10	25680	1,05E+10	0,80

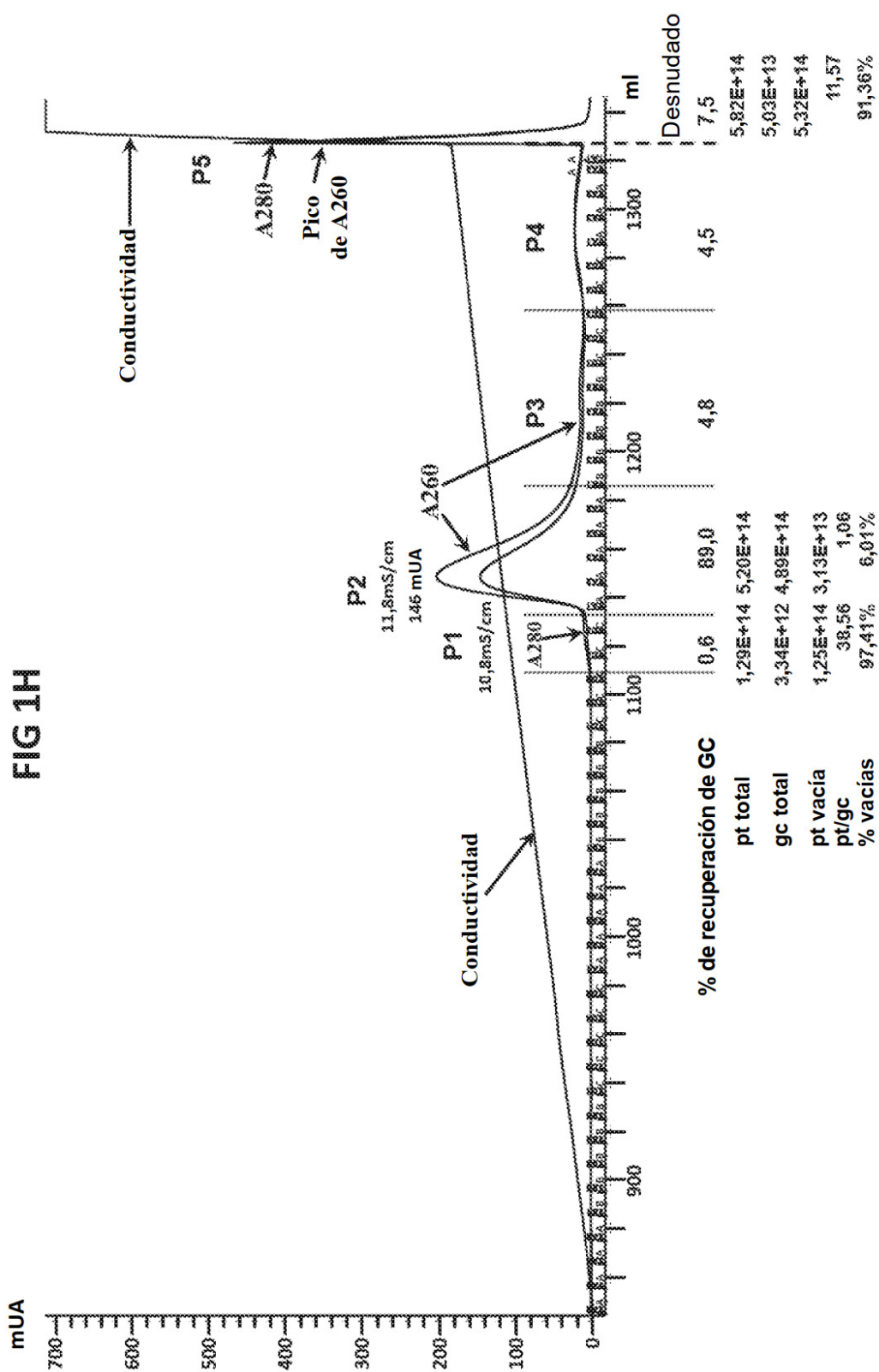


FIG 2A

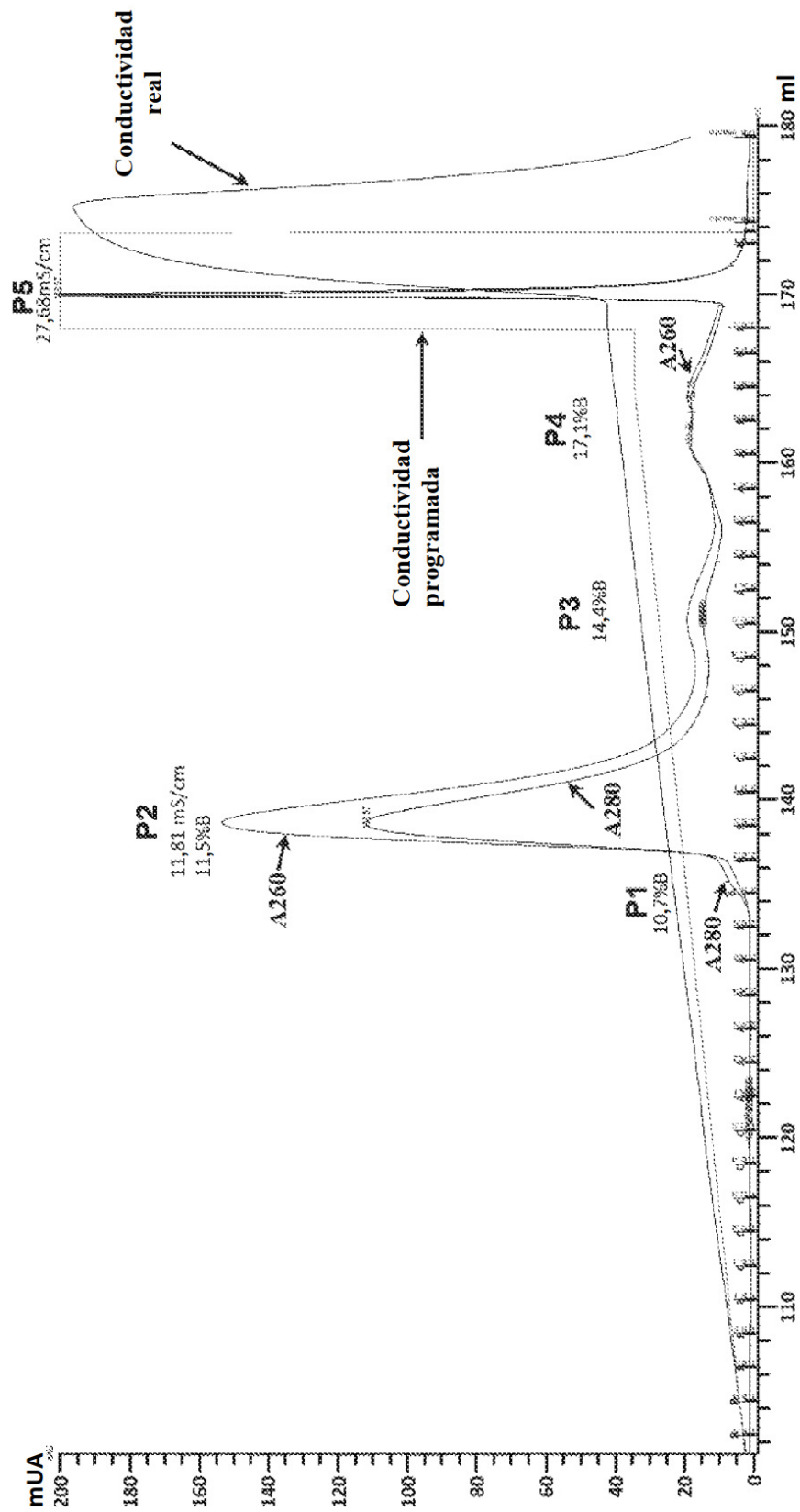


FIG 2B

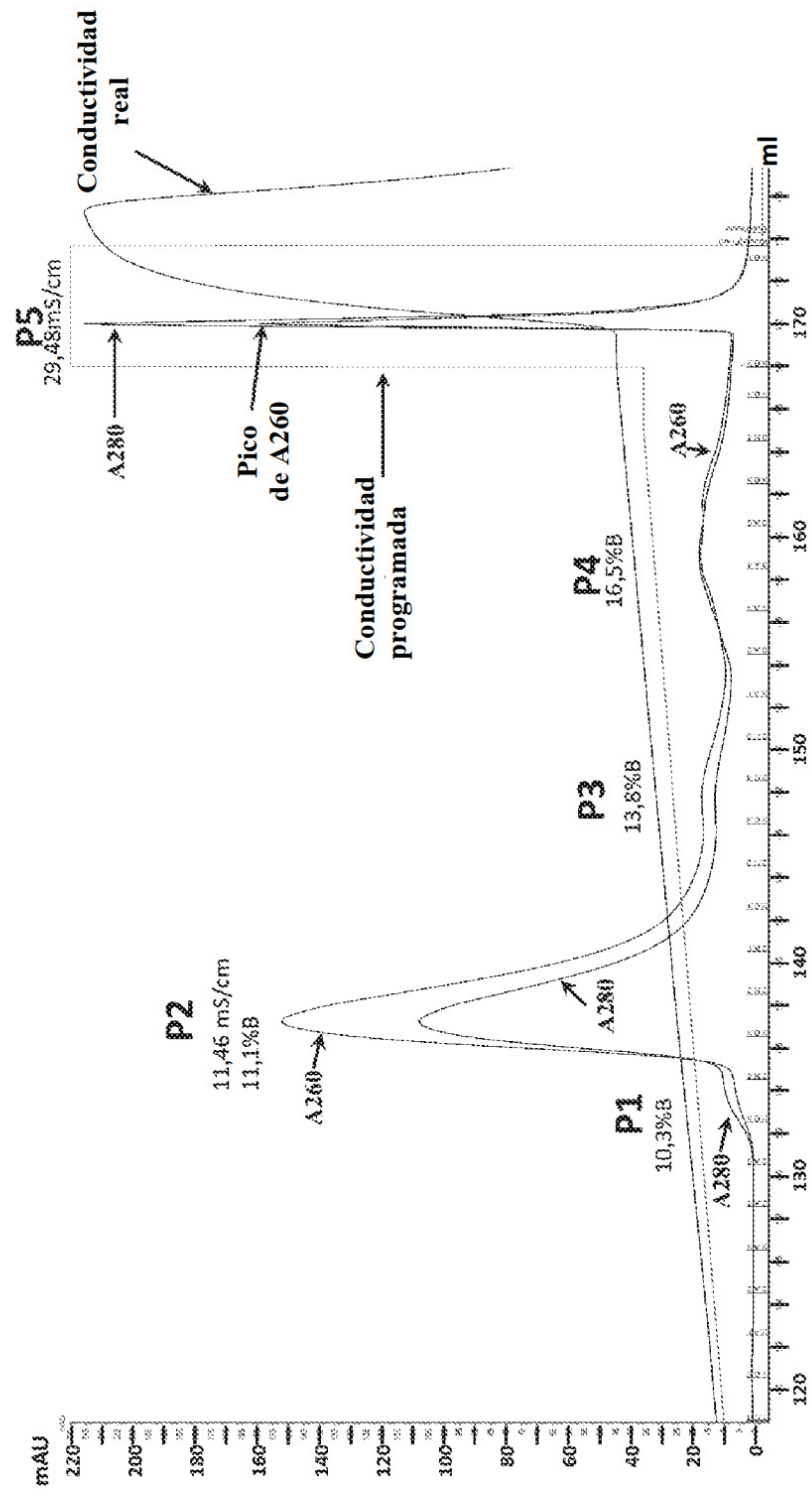


FIG 2C

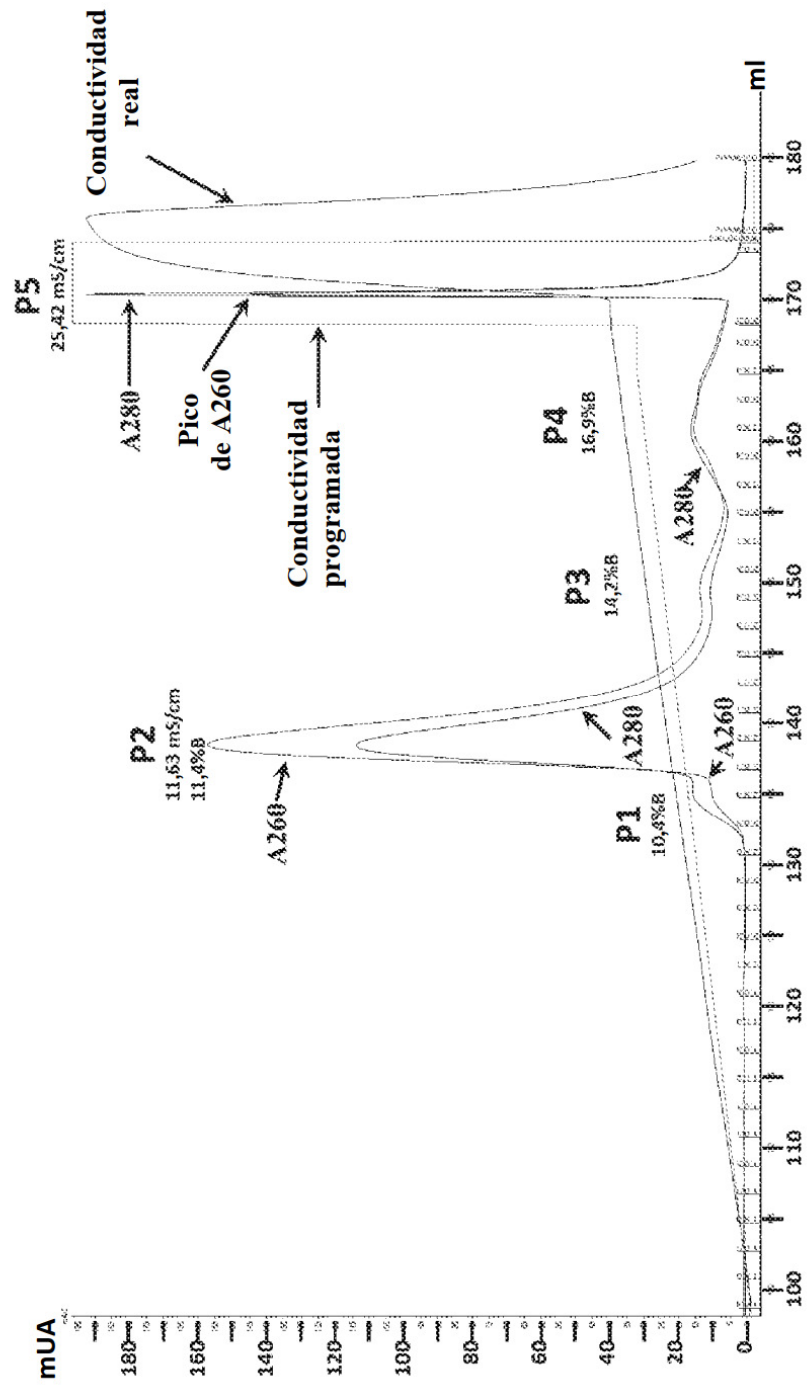


FIG 2D

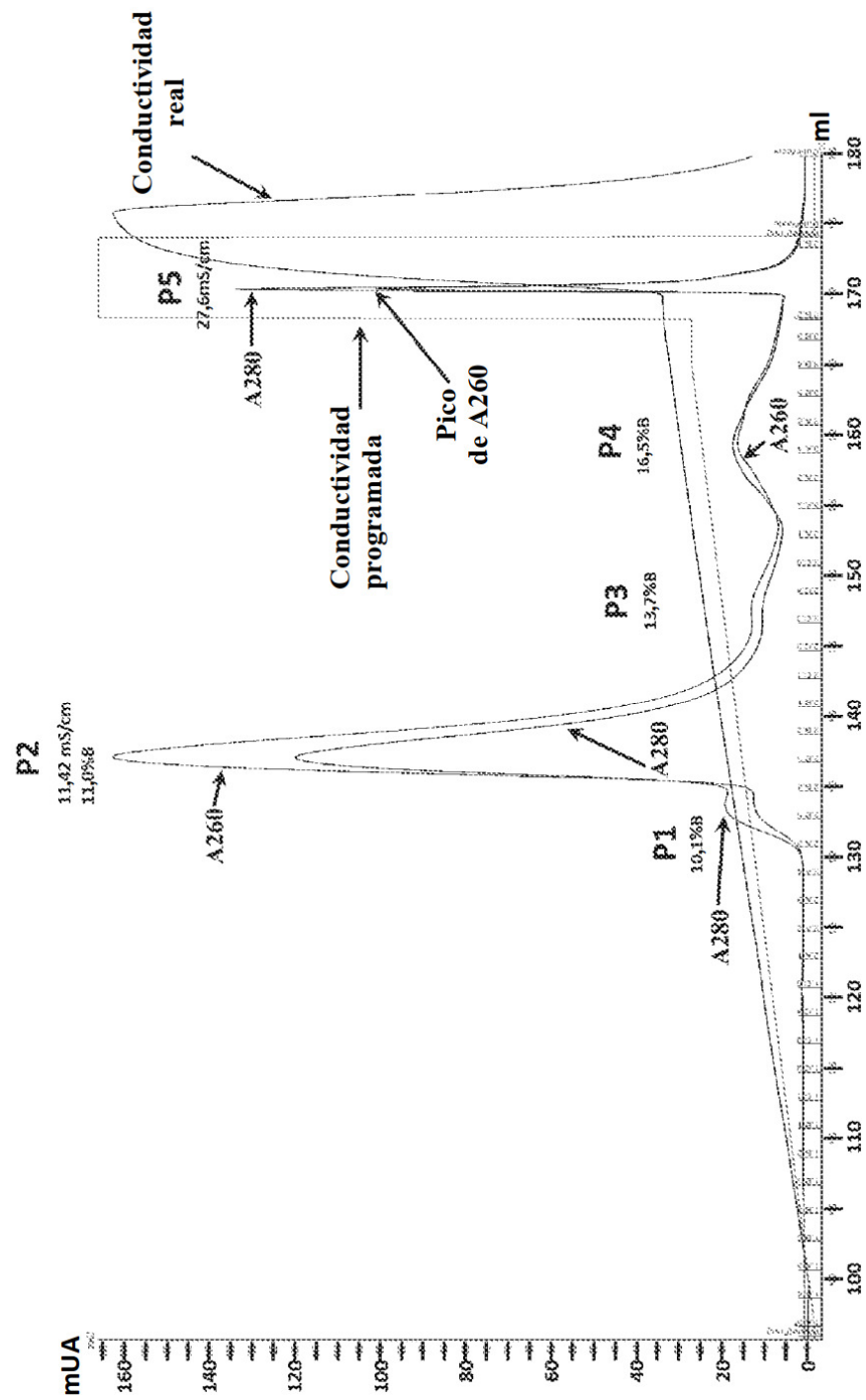


FIG 2E

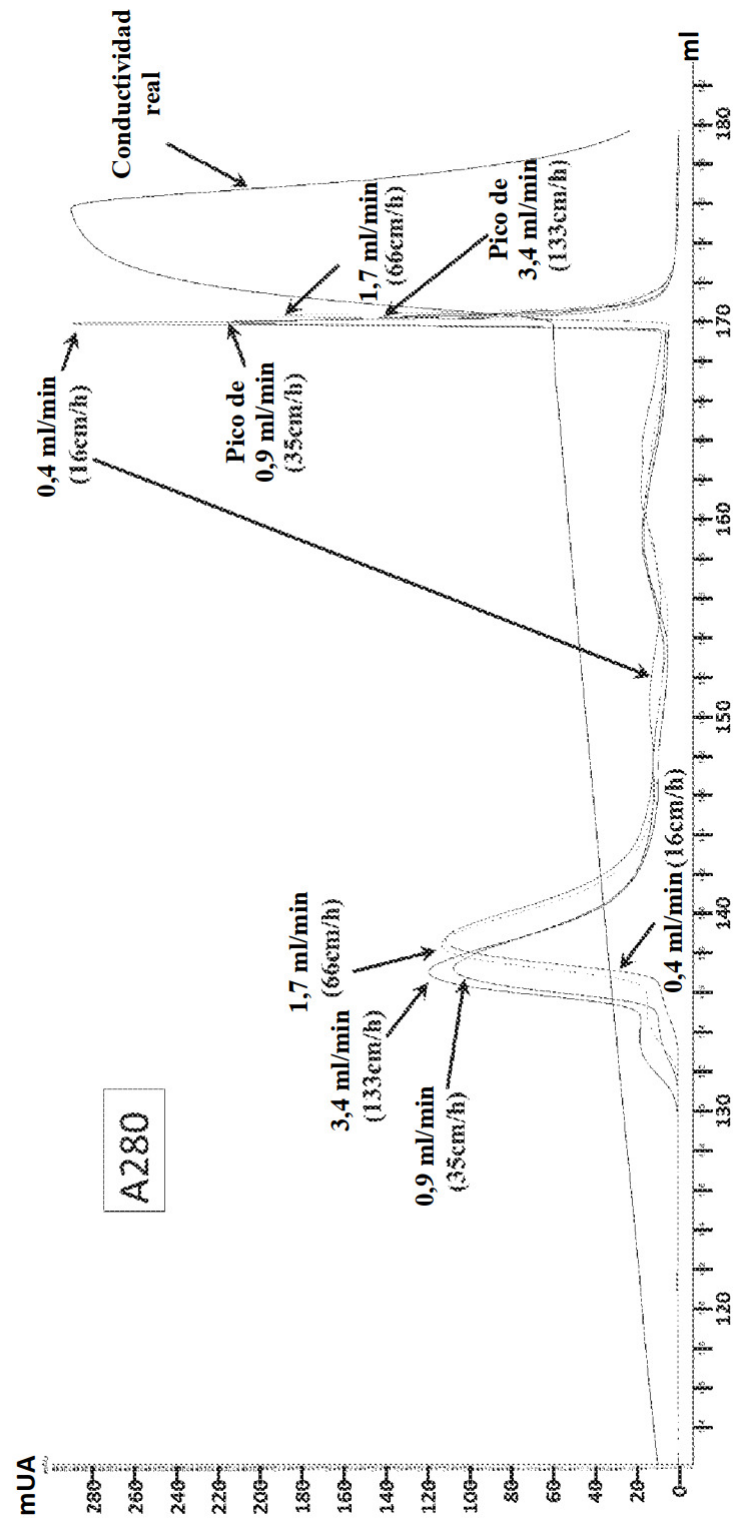


FIG 2F

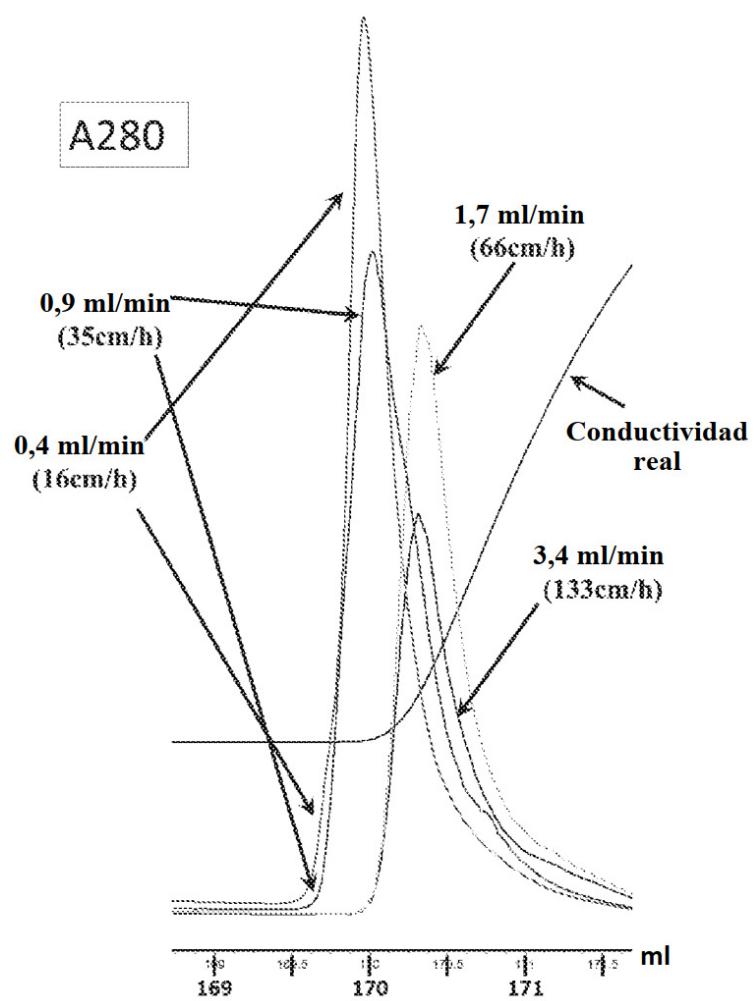


FIG 3A

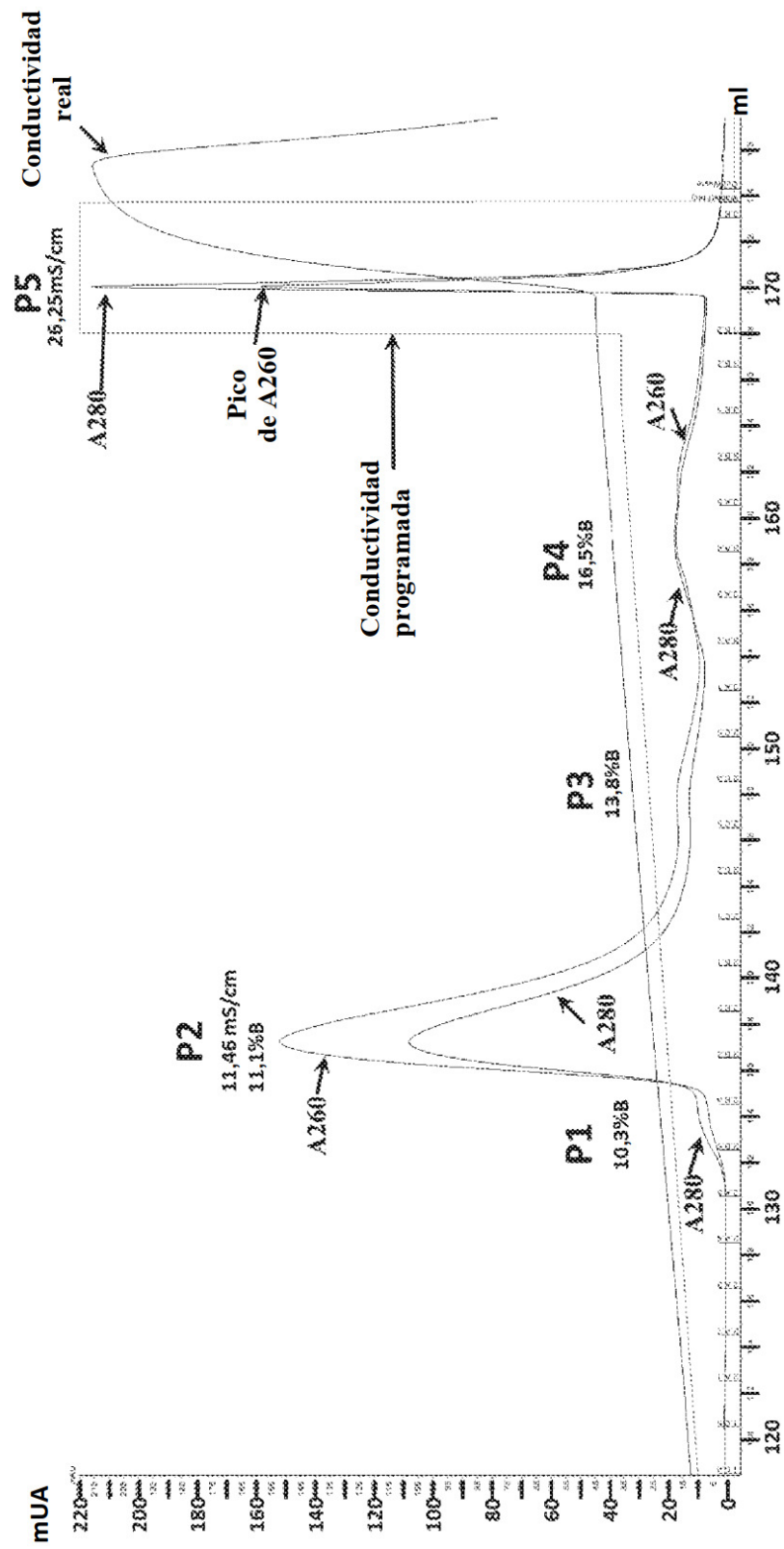


FIG 3B

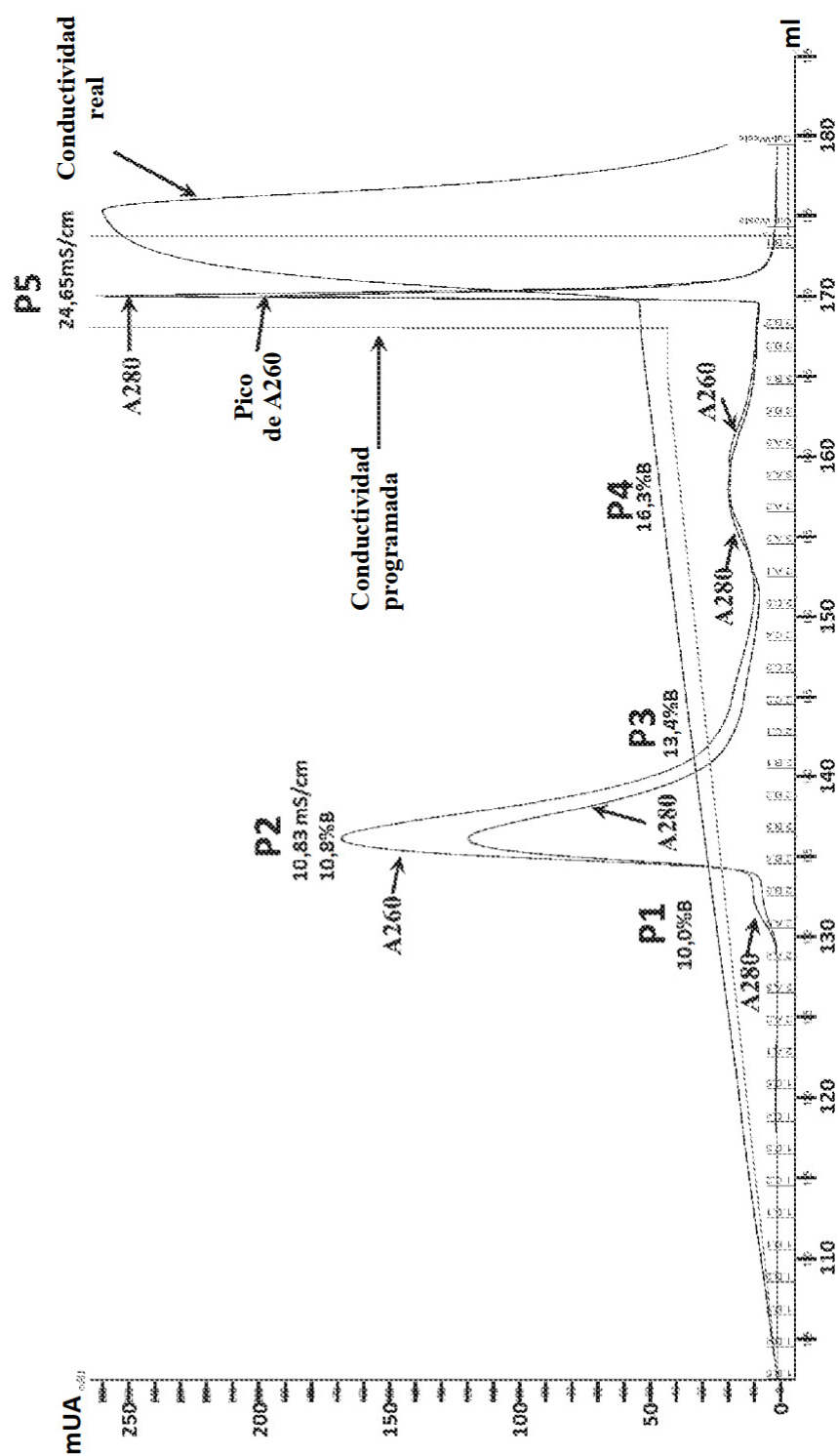


FIG 3C

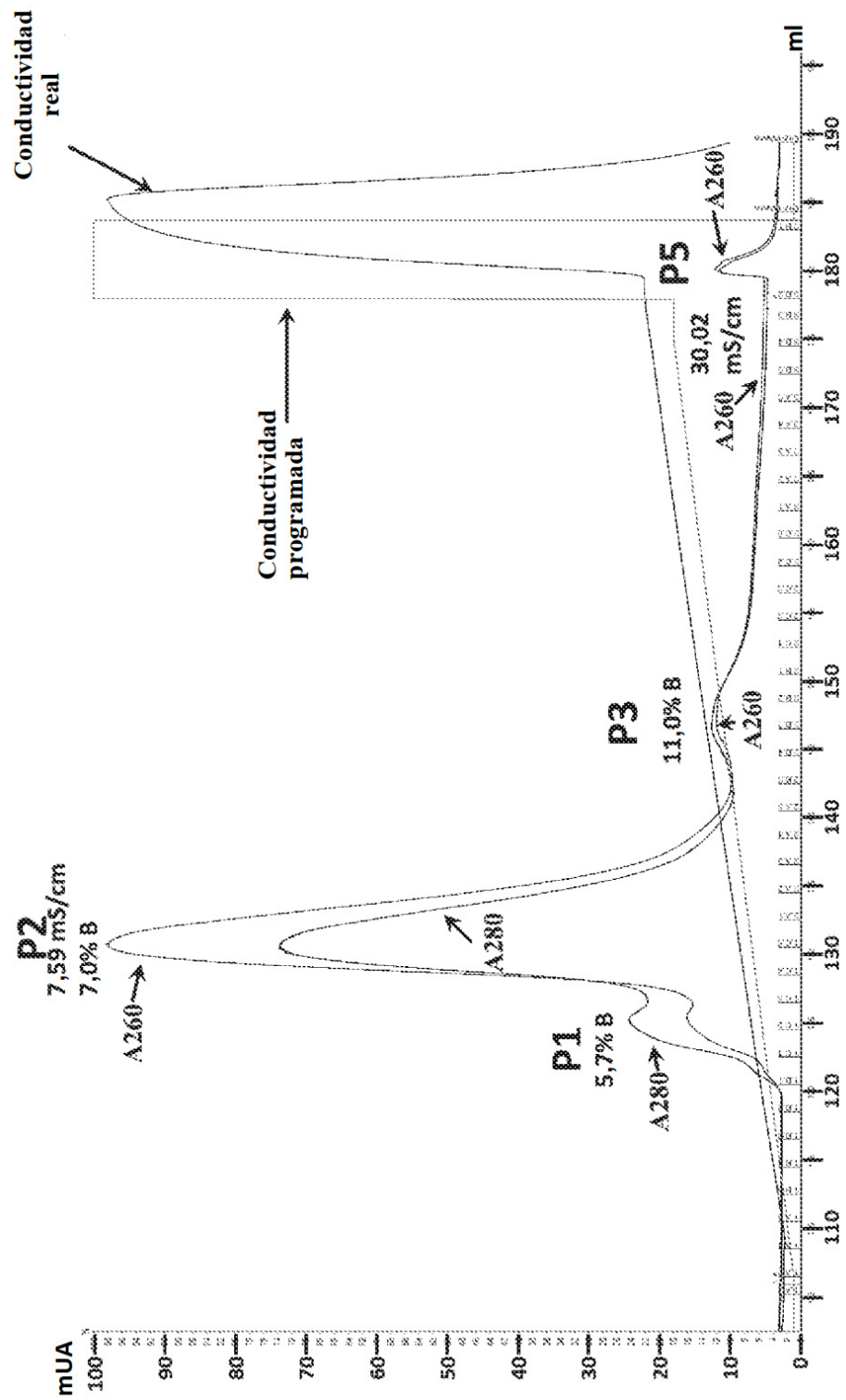


FIG 3D

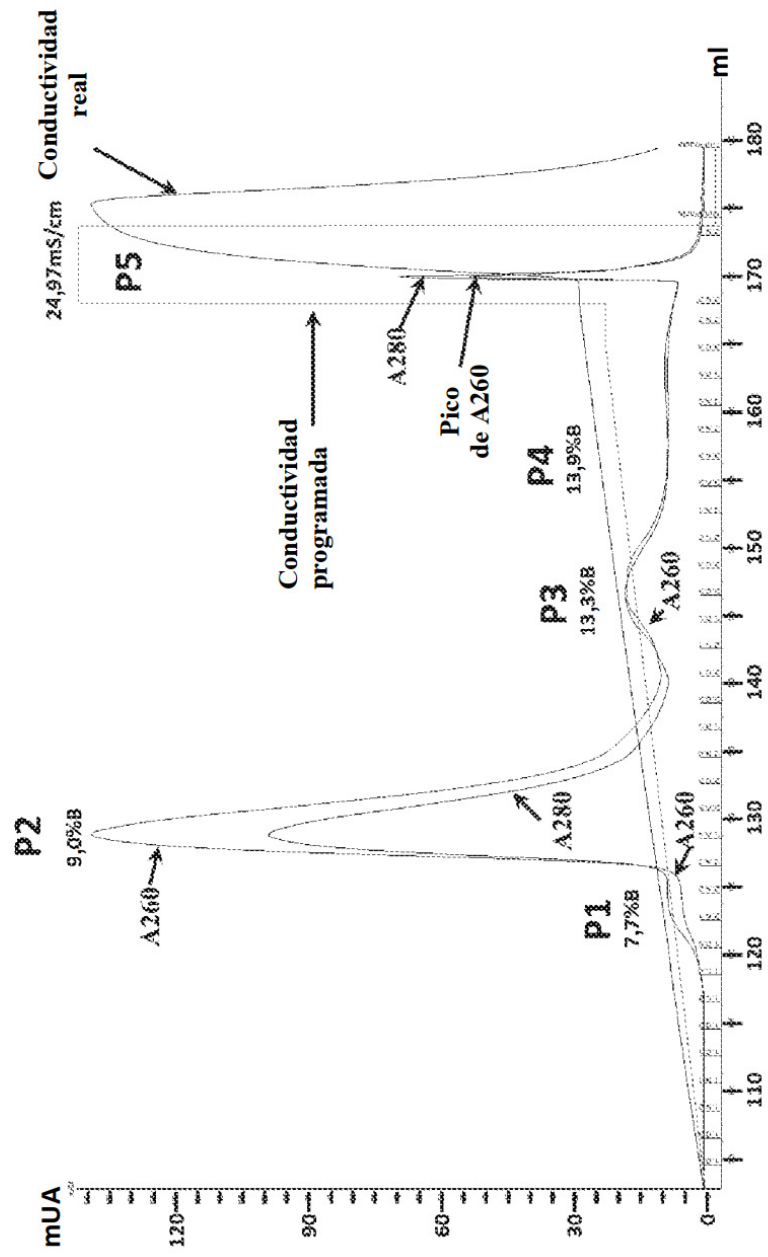


FIG 3E

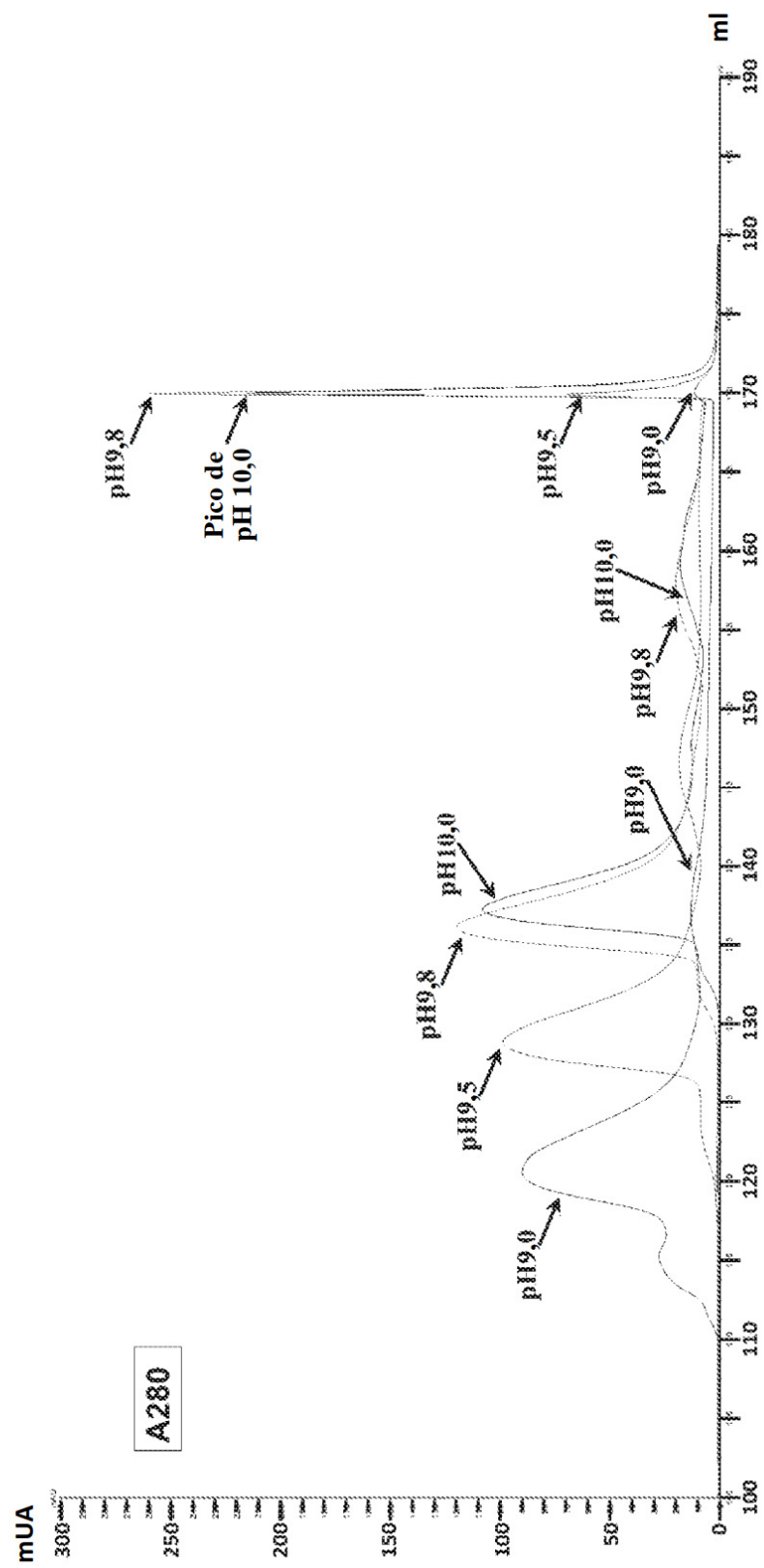
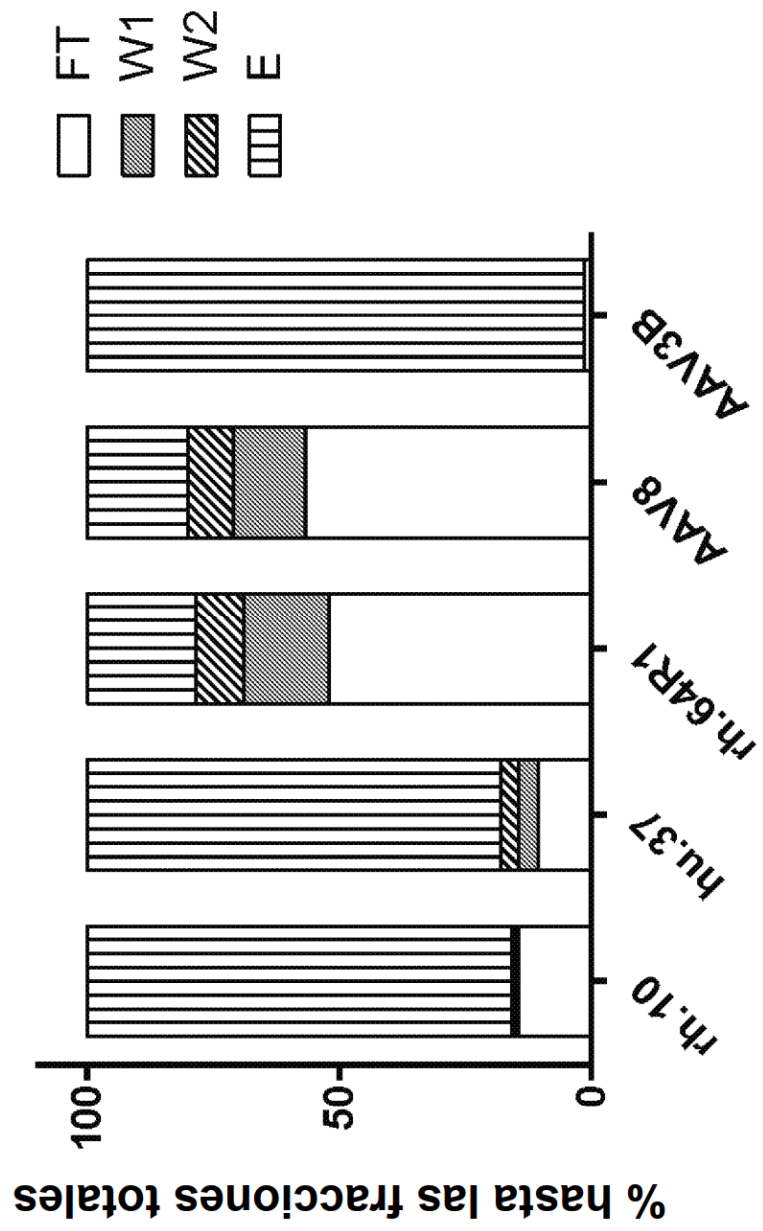


FIG 4



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 6566118 B [0005] [0067] [0070]
- WO 9911764 A [0005]
- US 20050024467 A [0007]
- US 20040110266 A1 [0007]
- US 20130045186 A1 [0024]
- WO 2005033321 A [0060]
- WO 9915685 A [0063]
- US 5658785 A [0063]
- US 6723551 B [0067]
- US 20130045186 A [0079]
- US 7906111 B [0079]
- US 62266347 B [0117]
- US 62322055 B [0117]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- **M. POTTER et al.** *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 2014, vol. 1 (14034), 1-8 [0006]
- **ZOLOTUKHIN et al.** *Methods*, 2002, vol. 28 (2), 158-167 [0007]
- **KALUDOV et al.** *Hum. Gene Therapy*, 2002, vol. 13, 1235-1243 [0007]
- **BRUMENT, N et al.** *Mol Ther*, 2002, vol. 6, 678-686 [0008]
- **OKADA, T et al.** *Hum Gene Ther*, 2009, vol. 20, 1013-1021 [0008]
- **KALUDOV, N et al.** *Hum Gene Ther*, 2002, vol. 13, 1235-1243 [0008]
- **ZOLOTUKHIN, S et al.** *Methods*, 2002, vol. 28, 158-167 [0008]
- **DAVIDOFF, AM et al.** *J Virol Methods*, 2004, vol. 121, 209-215 [0008]
- **HELLSTRÖM, M et al.** *Gene Ther*, 2009, vol. 16, 521-532 [0008]
- **F. MINGOZZI et al.** *Sci Transl med*, 17 July 2013, vol. 5 (194) [0008]
- *PMC*, 14 July 2014 [0008]
- **M. URABE et al.** *Molecular Therapy*, April 2006, vol. 13 (4), 823-828 [0008]
- **GAO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, vol. 100 (10), 6081-6086 [0024]
- **J. D. THOMSON et al.** A comprehensive comparison of multiple sequence alignments. *Nucl. Acids Res.*, 1999, vol. 27 (13), 2682-2690 [0025]
- **GRIMM et al.** *Gene Therapy*, 1999, vol. 6, 1322-1330 [0045]
- **SOMMER et al.** *Molec. Ther.*, 2003, vol. 7, 122-128 [0045]
- **WOBUS et al.** *J. Virol.*, 2000, vol. 74, 9281-9293 [0045]
- **M. LOCK et al.** *Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods*, 14 February 2014, vol. 25 (2), 115-25 [0048]
- **G YE et al.** *Hu Gene Ther Clin Dev*, December 2014, vol. 25, 212-217 [0058]
- **RM KOTIN.** *Hu Mol Genet*, 2011, vol. 20 (1), R2-R6 [0058]
- **M. MIETZSCH et al.** *Hum Gene Therapy*, March 2014, vol. 25, 212-222 [0058]
- **T VIRAG et al.** *Hu Gene Therapy*, August 2009, vol. 20, 807-817 [0058]
- **N. CLEMENT et al.** *Hum Gene Therapy*, August 2009, vol. 20, 796-806 [0058]
- **DL THOMAS et al.** *Hum Gene Ther*, August 2009, vol. 20, 861-870 [0058]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press [0064]
- **R. PAUL et al.** *Hu Gene Ther*, 1993, vol. 4, 609-615 [0075]
- **LOCK et al.** *Hum Gene Ther*, 2010, vol. 21 (1), 1259-1271 [0091]
- **LOCK, M et al.** Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. *Human Gene Therapy*, 2010, vol. 21, 1259-1271 [0101]
- **PETTERSEN, EF et al.** *J Comput Chem*, 2004, vol. 25, 1605-1612 [0105]
- **SANNER, MF et al.** *Biopolymers*, 1996, vol. 38, 305-320 [0105]
- **NAM, HJ et al.** Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *J Virol*, 2007, vol. 81, 12260-12271 [0105]
- **NAM, HJ et al.** *J Virol*, 2007, vol. 81, 12260-12271 [0107]
- **MIETZSCH.** *Human Gene Therapy*, 2014, vol. 25, 212-222 [0110]
- **SONNTAG, F et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, vol. 107, 10220-10225 [0112]
- **TENNEY, RM et al.** *Virology*, 2014, vol. 454, 227-236 [0114]

- **SHEN, X.** *Molecular Therapy*, 2007, vol. 15, 1955-1962 [0114]
- **GURDA, BL et al.** *Journal of Virology*, 2012, vol. 86, 7739-7751 [0114]
- **ADACHI, K et al.** *Nat Commun*, 2014, vol. 5, 3075 [0114]
- **MOSKALENKO et al.** *Journal of Virology*, 2000, vol. 74, 1761-1766 [0114]
- **WOBUS, CE et al.** *Journal of Virology*, 2000, vol. 74, 9281-9293 [0114]
- **GURDA, BL et al.** *Journal of Virology*, 2013, vol. 87, 9111-9124 [0114]
- **HARBISON, CE et al.** *Journal of General Virology*, 2012, vol. 93, 347-355 [0114]