

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 897 508**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2014 PCT/US2014/040083**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14194132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2014 E 14803589 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.09.2021 EP 3003391**

54 Título: **Variantes de virus adenoasociados y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

31.05.2013 US 201361829735 P

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

01.03.2022

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**SCHAFFER, DAVID V.;
KOTTERMAN, MELISSA A.;
HWANG, BUM-YEOL y
KOERBER, JAMES T.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 897 508 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

Variantes de virus adenoasociados y métodos de uso de las mismas

5 Referencia cruzada

Esta solicitud reivindica el beneficio de la patente provisional de Estados Unidos núm. 61/829,735, presentada el 31 de mayo de 2013.

10 Declaración sobre la investigación patrocinada federalmente

Esta invención se realizó con apoyo gubernamental con la Subvención número HL081527 otorgada por el Instituto Nacional de Salud. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

15 Introducción

Los vectores de suministro de genes basados en virus adenoasociados (VAA) han demostrado ser prometedores tanto en modelos preclínicos de enfermedades como recientemente en ensayos clínicos en humanos para varias enfermedades diana. Los vectores basados en VAA son extremadamente seguros porque el VAA de tipo salvaje no es patógeno y no tiene asociación etiológica con ninguna enfermedad conocida. Además, VAA ofrece la capacidad para un suministro de genes altamente eficiente y la expresión transgénica sostenida en numerosos tejidos, incluidos el hígado, los músculos, los pulmones, la retina y el cerebro.

20 El VAA es un virus de ADN monocatenario que contiene dos marcos de lectura abiertos, rep y cap. El primer gen codifica cuatro proteínas necesarias para la replicación del genoma (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40), y el segundo expresa tres proteínas estructurales (VP1-3) que se ensamblan para formar la cápside viral. Como su nombre lo indica, el VAA depende de la presencia de un virus auxiliar, tal como un adenovirus o un herpesvirus, para la replicación activa. En ausencia de un auxiliar, establece un estado latente en el que su genoma se mantiene episómicamente o se integra en el cromosoma del huésped. Se han identificado múltiples serotipos de VAA de primates homólogos y numerosos tipos de primates no humanos. El VAA2 es el mejor caracterizado como vehículo de suministro de genes.

25 En 2010, había 75 ensayos clínicos en curso que usaban VAA como vehículo de suministro de genes. Sin embargo, la alta prevalencia de anticuerpos neutralizantes anticápside, debido a la exposición generalizada a numerosas variantes y serotipos de VAA dentro de la población humana, disminuye la eficacia de la terapia génica de los VAA. Esta inmunidad preexistente, así como también el desarrollo posterior de inmunidad debido a la administración de vectores, pueden impedir la implementación más amplia de la terapia génica de VAA. Por ejemplo, hasta la fecha, los VAA han tenido más éxito en estudios clínicos que involucran el suministro a regiones inmunológicas privilegiadas.

30 Un análisis reciente indicó que la prevalencia de anticuerpos IgG contra VAA en humanos fue más alta para VAA2 (72 %) y VAA1 (67 %), pero los anticuerpos contra VAA9 (47 %), VAA6 (46 %), VAA5 (40 %) y VAA8 (38 %) también estaban presentes en una gran porción de la población estudiada. Varios estudios encontraron que la inmunidad humoral a la cápside de los VAA durante la terapia génica podría prevenirse reduciendo la cantidad de partículas de VAAr suministradas. Desafortunadamente, la administración de bajas dosis de vector conduce a una baja transducción y, por tanto, a una baja expresión génica terapéutica.

35 Existe una necesidad en la técnica del desarrollo de nuevas variantes de VAA que sean resistentes a la neutralización por anticuerpos contra VAA.

40 Literatura

Asuri y otros, Mol Ther. febrero de 2012;20(2):329-38; Bainbridge y otros, N Engl J Med. 22 de mayo de 2008;358(21):2231-9; Excoffon y otros, Proc Natl Acad Sci U S A. 10 de marzo de 2009;106(10):3865-70; Grimm y otros., J Virol. junio de 2008;82(12):5887-911; Jang y otros, Mol Ther. abril de 2011;19(4):667-75; Klimczak y otros, PLoS One. 14 de octubre de 2009;4(10):e7467; Koerber y otros; Mol Ther. octubre de 2008;16(10):1703-9; Koerber y otros; Mol Ther. diciembre de 2009;17(12):2088-95; Maguire y otros, N Engl J Med. 2008 22 de mayo;358(21):2240-8; Maguire y otros, Lancet. 7 de noviembre de 2009;374(9701):1597-605; Maheshri y otros, Nat Biotechnol. febrero de 2006;24(2):198-204; Perabo y otros, J Gene Med. Febrero de 2006;8(2):155-62; Yang y otros, Proc Natl Acad Sci U S A. 10 de marzo de 2009;106(10):3946-51; WO2012145601; Publicación de patente de Estados Unidos número US20050053922

45 Resumen

65 La presente descripción proporciona viriones de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infecciosos que comprenden una proteína de la cápside variante y un ácido nucleico heterólogo. La presente descripción

proporciona además las proteínas de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variantes (y/o un ácido nucleico que codifica las proteínas de la cápside de VAA variantes), que confieren a un virión de VAAr infeccioso una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos. La presente descripción proporciona además células huésped que comprenden un virión de VAAr infeccioso y/o un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside de VAA variante objeto. La presente descripción proporciona además bibliotecas de los viriones, proteínas de la cápside, ácidos nucleicos y/o células huésped anteriores; donde la proteína de la cápside de VAA variante de al menos un miembro de la biblioteca comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos sustitución de un aminoácido con relación a la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33.

La presente descripción proporciona además métodos para suministrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana donde la célula diana se pone en contacto con un virión de VAAr infeccioso objeto. La presente descripción proporciona además métodos para suministrar un producto génico a un individuo, los métodos generalmente implican la administración de una cantidad efectiva de un virión de VAAr objeto a un individuo que lo necesite. También se proporcionan en la presente descripción composiciones y estuches para practicar los métodos objeto.

Características

Las características de la presente descripción incluyen un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso que comprende (a) una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33; y (b) un ácido nucleico heterólogo. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante comprende la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33.

Las características de la presente descripción incluyen un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso que comprende (a) una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10, e incluye las sustituciones de aminoácidos N312K, N449D, D472N, N551S, I698V y L735Q con relación a la SEQ ID NO: 2; y (b) un ácido nucleico heterólogo. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10. En algunos casos, el VAAr exhibe una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por el VAA2 (serotipo 2 del VAA de tipo salvaje). En algunos casos, el VAAr exhibe al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 30 veces, etc.) mayor resistencia a anticuerpos neutralizantes de VAA humanos que la resistencia exhibida por VAA2. En algunos casos, el VAAr exhibe un aumento de la transducción de las células de mamíferos en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la transducción de células de mamíferos exhibidas por el serotipo 2 de VAA de tipo salvaje (VAA2). En algunos casos, las células de mamíferos son células hepáticas, células pancreáticas, células del músculo esquelético, células del músculo cardíaco, fibroblastos, células de la retina, células de la articulación sinovial, células pulmonares, células T, neuronas, células gliales, células madre (por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células progenitoras hematopoyéticas, células madre neurales, células progenitoras neurales, células madre de la cresta neural, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células madre mesenquimales, células madre mesodérmicas, células madre hepáticas, células madre pancreáticas, células progenitoras pancreáticas, células madre musculares, células madre retinianas y similares), células endoteliales o células cancerosas. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo comprende un agente de interferencia de ARN. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

Las características de la presente descripción incluyen un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos expuesta en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante codificada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante codificada comprende la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33.

Las características de la presente descripción incluyen un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10, e incluye las sustituciones de aminoácidos N312K, N449D, D472N, N551S, I698V y L735Q con relación a la SEQ ID NO: 2.

En algunos casos, la proteína de la cápside del VAA variante codificada (codificada por un ácido nucleico aislado) confiere a un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes humano del VAA en comparación con la resistencia exhibida por el VAA2 (VAA de tipo salvaje serotipo 2). En algunos casos, el aumento de la resistencia es al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 30 veces, etc.) mayor que la resistencia exhibida por VAA2. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante codificada (codificada por un ácido nucleico aislado) confiere a un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso un aumento de la transducción de células de mamíferos en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la transducción exhibida por VAA2.

Las características de la presente descripción incluyen una célula huésped aislada que comprende un ácido nucleico objeto como se describió anteriormente. En algunos casos, la célula huésped se transfecta de forma estable con el ácido nucleico. En algunos casos, la célula huésped comprende además un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína rep de VAA. En algunos casos, la célula huésped comprende además un vector VAA recombinante.

Las características de la presente descripción incluyen un método para suministrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con un virión objeto (descrito anteriormente). En algunos casos, la célula diana es una célula hepática, una célula pancreática, una célula del músculo esquelético, una célula del músculo cardíaco, un fibroblasto, una célula retiniana, una célula de la articulación sinovial, una célula pulmonar, una célula T, una neurona, una célula glial, una célula madre (por ejemplo, una célula madre hematopoyética, una célula progenitora hematopoyética, una célula madre neural, una célula progenitora neural, una célula madre de la cresta neural, una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida (célula iPS), una célula madre mesenquimatosa, una célula madre mesodérmica, una célula madre hepática, una célula madre pancreática, una célula progenitora pancreática, una célula madre muscular o una célula madre retiniana, y similares), una célula endotelial o una célula cancerosa. En algunos casos, la célula diana es in vitro. En algunos casos, la célula diana es in vivo.

Las características de la presente descripción incluyen un método para suministrar un producto génico a un individuo que lo necesite, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad efectiva de un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso objeto (descrito anteriormente). En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo del virión VAAr comprende un agente de interferencia de ARN. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo del virión VAAr comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido. En algunos casos, la etapa de administración comprende el suministro indirecto del virión infeccioso VAAr. En algunos casos, la etapa de administración comprende el suministro directo del virión infeccioso VAAr.

Las características de la presente descripción incluyen una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA comprende la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 11-13 y 26-33.

Las características de la presente descripción incluyen una proteína de la cápside del virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10, e incluye las sustituciones de aminoácidos N312K, N449D, D472N, N551S, I698V y L735Q con relación a la SEQ ID NO: 2. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 10. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante confiere a un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por VAA2. En algunos casos, la mayor resistencia es al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 30 veces, etc.) mayor que la resistencia exhibida por VAA2. En algunos casos, la proteína de la cápside de VAA variante confiere a un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso una transducción aumentada de células de mamífero en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la transducción exhibida por VAA2.

Las características de la presente descripción incluyen una biblioteca que comprende al menos uno de: (i) dos o más viriones de VAAr infecciosos, cada uno de los cuales comprende una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante y un ácido nucleico heterólogo; (ii) dos o más ácidos nucleicos aislados, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante; (iii) dos o más células huésped, cada una de las cuales comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante; y (iv) dos o más proteínas de la cápside de VAA variantes; en donde la proteína de la cápside de VAA variante de al menos un miembro de la biblioteca comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos sustitución de un aminoácido con relación a la

secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33.

Las características de la presente descripción incluyen un método para generar e identificar un virión de VAAr infeccioso modificado que exhibe una propiedad alterada de infección con relación a un virión iniciador (parental) que comprende una proteína de la cápside iniciadora, el método comprendiendo: (a) generar proteínas de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variantes a partir de la proteína de la cápside de inicio, en donde la proteína de la cápside de inicio comprende la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33, y en donde cada proteína de la cápside de VAA variante comprende al menos una sustitución de aminoácido con relación a la proteína de la cápside de inicio; (b) generar viriones de VAA variantes, cada uno de los cuales comprende una proteína de la cápside de VAA variante generada en la etapa (a); y (c) ensayar viriones de VAA variantes generados en la etapa (b) para determinar la propiedad alterada de infección para identificar el virión de VAAr infeccioso modificado. En algunos casos, la generación de la biblioteca de proteínas de la cápside de VAA variantes comprende un método de mutagénesis seleccionado del grupo que consiste en: mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis de saturación, mutagénesis de intercambio de bucles, mutagénesis por mezcla de fragmentos y una combinación de los mismos. En algunos casos, la propiedad alterada de la infección es una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por el virión iniciador. En algunos casos, la propiedad alterada de la infección es un aumento de la transducción de células de mamífero en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la transducción exhibida por el virión iniciador. En algunos casos, el virión de VAAr infeccioso modificado comprende una proteína de la cápside de VAA modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína de la cápside de inicio.

Las características de la presente descripción incluyen un método para generar una proteína de la cápside de VAA variante a partir de una proteína de la cápside de inicio, comprendiendo el método: someter un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside de inicio a un tipo de mutagénesis seleccionada del grupo que consiste en: mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis de saturación, mutagénesis de intercambio de bucles, mutagénesis de mezcla de fragmentos y una combinación de los mismos; en donde la proteína de la cápside de inicio comprende la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-B representan la evolución dirigida de VAA para mejorar la evasión de anticuerpos.

Las Figuras 2A-B representan los perfiles de neutralización de variantes de evasión de anticuerpos mediante el uso de IgIV humana.

Las Figuras 3A-C representan los perfiles de neutralización de variantes de evasión de anticuerpos mediante el uso de sueros humanos adquiridos de individuos que fueron excluidos de los ensayos clínicos de hemofilia B debido a la presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra VAA.

Las Figuras 4A-B representan las secuencias de aminoácidos de clones de mutagénesis de saturación y mezcla/intercambio de bucle.

La Figura 5 demuestra el tropismo in vitro de variantes de VAA.

Las Figuras 6A-B muestran *la localización y neutralización in vivo de nuevas variantes de VAA.*

Las Figuras 7A-D demuestran la generación de evasores de anticuerpos humanos.

Las Figuras 8A-I representan la secuencia de la proteína de la cápside de la mezcla 100-1 (SEQ ID NO: 11) alineada con las secuencias de la proteína de la cápside de tipo salvaje de VAA1-9 (SEQ ID NO: 1-9).

Las Figuras 9A-I representan la secuencia de la proteína de la cápside de la mezcla 100-3 (SEQ ID NO: 12) alineada con las secuencias de la proteína de la cápside de tipo salvaje de VAA1-9 (SEQ ID NO: 1-9).

Las Figuras 10A-I representan la secuencia de la proteína de la cápside de la mezcla 100-7 (SEQ ID NO: 13) alineada con las secuencias de la proteína de la cápside de tipo salvaje de VAA1-9 (SEQ ID NO: 1-9).

La Figura 11 muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes de los clones de la biblioteca y los serotipos parentales en sueros de ratón inmunizados.

Definiciones

El virus adenoasociado es un parvovirus no patógeno compuesto por un genoma de ADN monocatenario de 4,7 kb

dentro de una cápside icosaédrica sin envoltura. "VAA" es una abreviatura de virus adenoasociado, y puede usarse para referirse al virus mismo o sus derivados. El genoma contiene tres marcos de lectura abiertos (ORF) flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR) que funcionan como el origen viral de la señal de replicación y empaque. Los *rep* ORF codifican cuatro proteínas no estructurales que desempeñan funciones en la replicación viral, la regulación transcripcional, la integración específica del sitio y el ensamblaje del virión. Los *cap* ORF codifican tres proteínas estructurales (VP1-3) que se ensamblan para formar una cápside viral de 60 unidades. Finalmente, un ORF presente como un marco de lectura alternativo dentro del *cap* gen produce la proteína activadora de ensamblaje (AAP), una proteína viral que localiza las proteínas de la cápside de VAA en el nucléolo y funciona en el proceso de ensamblaje de la cápside.

Hay varios serotipos de origen natural y más de 100 variantes de VAA, cada uno de los cuales difiere en la secuencia de aminoácidos, particularmente dentro de las regiones hipervariables de las proteínas de la cápside y, por tanto, en sus propiedades de suministro de genes. No se ha asociado ninguna VAA con alguna enfermedad humana, lo que hace que el VAA recombinante sea atractivo para aplicaciones clínicas.

El término "VAA" como se usa en la presente cubre todos los subtipos y formas tanto naturales como recombinantes, excepto cuando se requiera de cualquier otra manera. El término "VAA" incluye VAA tipo 1 (VAA-1 o VAA1), VAA tipo 2 (VAA-2 o VAA2), VAA tipo 3 (VAA-3 o VAA3), VAA tipo 4 (VAA-4 o VAA4), VAA tipo 5 (VAA-5 o VAA5), VAA tipo 6 (VAA-6 o VAA6), VAA tipo 7 (VAA-7 o VAA7), VAA tipo 8 (VAA-8 o VAA8), VAA tipo 9 (VAA-9 o VAA9), VAA aviar, VAA bovino, VAA canino, VAA equino, VAA de primates, VAA de no primates y VAA ovino. Las "VAA de primates" se refiere a VAA que infecta primates, "VAA de no primates" se refiere a VAA que infectan a mamíferos no primates, "VAA bovino" se refiere a VAA que infecta a mamíferos bovinos, etc.

Se conocen en la técnica las secuencias genómicas de varios serotipos de VAA, así como también las secuencias de las repeticiones terminales nativas (TRs), proteínas Rep y subunidades de la cápside. Dichas secuencias pueden encontrarse en la literatura o en bases de datos públicas tales como GenBank. Ver, por ejemplo, los números de acceso del GenBank NC_002077.1 (VAA-1), AF063497.1 (VAA-1), NC_001401.2 (VAA-2), AF043303.1 (VAA-2), J01901.1 (VAA-2), U48704.1 (VAA-3), NC_001729.1 (VAA-3), NC_001829.1 (VAA-4), U89790.1 (VAA-4), NC_006152.1 (VAA-5), AF085716.1 (VAA-5), AF028704.1 (VAA-6), NC_006260.1 (VAA-7), AF513851.1 (VAA-7), AF513852.1 (VAA-8) NC_006261.1 (VAA-8), y AY530579.1 (VAA-9); para enseñar secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de VAA. Ver también, por ejemplo, Srivistava y otros (1983) *J. Virology* 45:555; Chiorini y otros (1998) *J. Virology* 71:6823; Chiorini y otros. (1999) *J. Virology* 73:1309; Bantel-Schaal y otros (1999) *J. Virology* 73:939; Xiao y otros (1999) *J. Virology* 73:3994; Muramatsu y otros (1996) *Virology* 221:208; Shade y otros. (1986) *J. Virol.* 58:921; Gao y otros (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:11854; Moris y otros (2004) *Virology* 33:375-383; publicaciones de patentes internacionales WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y la patente de Estados Unidos núm. 6,156,303.

Las secuencias de las proteínas *cap* (cápside) que existen de forma natural asociadas con los serotipos de VAA se conocen en la técnica, e incluyen: VAA1 (SEQ ID NO: 1), VAA2 (SEQ ID NO: 2), VAA3 (SEQ ID NO: 3), VAA4 (SEQ ID NO: 4), VAA5 (SEQ ID NO: 5), VAA6 (SEQ ID NO: 6), VAA7 (SEQ ID NO: 7), VAA8 (SEQ ID NO: 8) y VAA9 (SEQ ID NO: 9). El término "proteína de la cápside de VAA variante" es una proteína de la cápside de VAA que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una sustitución (que incluye delección, inserción, etc.) con relación a una de las secuencias de proteína de la cápside de VAA que existen de forma natural establecidas en SEQ ID. NO: 1-9.

Un "virión de VAA" o "partícula viral de VAA" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside de VAA y un polinucleótido de VAA encapsulado.

"Recombinante", según se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de varias combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligación, y otros procedimientos que dan como resultado una construcción que es distinta de un polinucleótido que se encuentra en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos incluyen respectivamente réplicas de la construcción polinucleotídica original y la progenie de la construcción viral original.

Si un virión de VAA comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido diferente al genoma de VAA de tipo salvaje, por ejemplo, un transgén que se suministra a una célula diana, un agente de ARNi o un agente CRISPR que se suministrará a una célula diana, etc.), típicamente se lo conoce como un "virión de VAA recombinante (VAAr)" o una "partícula viral de VAAr". En general, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, y generalmente por dos, secuencias repetidas terminales invertidas (ITR) de VAA.

El término "vector de VAAr" abarca viriones de VAAr (es decir, partículas virales de VAAr) (por ejemplo, un virión de VAAr infeccioso), que por definición incluyen un polinucleótido de VAAr; y también abarca polinucleótidos que codifican VAAr (por ejemplo, un polinucleótido monocatenario que codifica VAAr (ss-VAAr); un polinucleótido bicatenario que codifica VAAr (ds-VAAr), por ejemplo, plásmidos que codifican VAAr; y similares).

"Empaquetado" se refiere a una serie de eventos intracelulares que dan como resultado el ensamblaje y

encapsidación de una partícula de VAA.

Los genes "rep" y "cap" de VAA se refieren a secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas de replicación y encapsidación de virus adenoasociados. Los rep y la cap de VAA se denominan en la presente descripción como "genes de empaquetamiento" de VAA.

Un "virus auxiliar" para VAA se refiere a un virus que permite que VAA (por ejemplo, VAA de tipo salvaje) sea replicado y empaquetado por una célula de mamífero. Se conocen en la técnica una variedad de tales virus auxiliares para VAA, que incluyen adenovirus, herpesvirus y poxvirus tales como vaccinia. Los adenovirus abarcan varios subgrupos diferentes, aunque el adenovirus tipo 5 del subgrupo C es el más comúnmente usado. Numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar son conocidos y están disponibles en depósitos tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes incluyen, por ejemplo, los virus del herpes simple (HSV) y los virus de Epstein-Barr (EBV), así como también los citomegalovirus (CMV) y virus de la pseudorrabia (PRV); que también están disponibles en depósitos tales como ATCC.

"Función (es) de virus auxiliar" se refiere a funciones codificadas en un genoma de virus auxiliar que permite la replicación y el empaquetamiento de VAA (junto con otros requisitos para la replicación y el empaquetamiento descritos en la presente descripción). Como se describió en la presente descripción, la "función de virus auxiliar" puede proporcionarse de varias formas, que incluyen proporcionando virus auxiliares o proporcionando, por ejemplo, secuencias de polinucleótidos que codifican la función o funciones necesarias a una célula productora en trans. Por ejemplo, un plásmido u otro vector de expresión que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una o más proteínas adenovirales se transfecta en una célula productora junto con un vector VAAr.

Un virus o partícula viral "infeccioso" es aquel que comprende una cápside viral ensamblada de manera competente y que es capaz de suministrar un componente polinucleotídico en una célula para la que la especie viral es trópica. El término no implica necesariamente ninguna capacidad de replicación del virus. Los ensayos para contar partículas virales infecciosas se describen en otra parte de esta descripción y en la técnica. La infectividad viral puede expresarse como la relación de partículas virales infecciosas con respecto al total de partículas virales. Se conocen en la técnica métodos para determinar la relación de partícula viral infecciosa a partícula viral total. Ver, por ejemplo, Grainger y otros (2005) *Mol. Ther.* 11:S337 (que describe un ensayo de título infeccioso de TCID50); y Zolotukhin y otros (1999) *Gene Ther.* 6:973. Ver también los ejemplos.

El término "tropismo", como se usa en la presente, se refiere al direccionamiento preferencial de especies huésped específicas o tipos celulares específicos dentro de una especie huésped por parte de un virus (por ejemplo, un VAA). Por ejemplo, un virus que puede infectar células del corazón, pulmón, hígado y músculo tiene un tropismo más amplio (es decir, aumentado) en relación a un virus que puede infectar sólo células pulmonares y musculares. El tropismo también puede incluir la dependencia de un virus de tipos particulares de moléculas de la superficie celular del huésped. Por ejemplo, algunos virus pueden infectar solo células con glicosaminoglicanos de superficie, mientras que otros virus pueden infectar solo células con ácido siálico (tales dependencias pueden probarse mediante el uso de varias líneas celulares deficientes en clases particulares de moléculas como células huésped potenciales para la infección viral). En algunos casos, el tropismo de un virus describe las preferencias relativas del virus. Por ejemplo, un primer virus puede infectar todos los tipos de células, pero tiene mucho más éxito en infectar esas células con glicosaminoglicanos de superficie. Puede considerarse que un segundo virus tiene un tropismo similar (o idéntico) al primer virus si el segundo virus también prefiere las mismas características (por ejemplo, el segundo virus también tiene más éxito en infectar esas células con glicosaminoglicanos de superficie), incluso si las eficiencias absolutas de transducción no son similares. Por ejemplo, el segundo virus podría ser más eficiente que el primer virus para infectar todos los tipos de células analizados, pero si las preferencias relativas son similares (o idénticas), aún puede considerarse que el segundo virus tiene un tropismo similar (o idéntico) como el primer virus. En algunas modalidades, el tropismo de un virión que comprende una proteína de la cápside de VAA variante objeto no se altera con relación a un virión de origen natural. En algunas modalidades, el tropismo de un virión que comprende una proteína de la cápside del VAA variante objeto se expande (es decir, se ensancha) con relación a un virión de origen natural. En algunas modalidades, el tropismo de un virión que comprende una proteína de la cápside de VAA variante objeto se reduce con relación a un virión de origen natural.

Un virus "competente para la replicación" (por ejemplo, un VAA competente para la replicación) se refiere a un virus fenotípicamente de tipo salvaje que es infeccioso y que también es capaz de replicarse en una célula infectada (es decir, en presencia de un virus auxiliar o funciones de un virus auxiliar). En el caso de VAA, la competencia de replicación generalmente requiere la presencia de genes de empaquetamiento de VAA funcionales. En general, los vectores VAAr como se describió en la presente descripción son incompetentes para la replicación en células de mamíferos (especialmente en células humanas) debido a la falta de uno o más genes de empaquetamiento de VAA. Típicamente, tales vectores de VAAr carecen de secuencias de genes de empaquetamiento de VAA con el fin de minimizar la posibilidad de que se generen VAA competentes para la replicación por recombinación entre genes de empaquetamiento de VAA y un vector de VAAr entrante. En muchas modalidades, las preparaciones de vector de VAAr como se describió en la presente descripción son aquellas que contienen pocos o ningún VAA competente en replicación (rcVAA, también denominado RCA) (por ejemplo, menos de aproximadamente 1 rcVAA por 10^2 partículas de VAAr, menos de aproximadamente 1 rcVAA por 10^4 partículas de VAAr, menos de aproximadamente 1 rcVAA por

10^8 partículas de VAAr, menos de aproximadamente 1 rcVAA por 10^{12} partículas VAAr, o no rcVAA).

El término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, y puede estar interrumpido por componentes que no son nucleótidos. Si se presenta, las modificaciones en la estructura de nucleótidos pueden darse antes o después del ensamblaje del polímero. El término polinucleótido, como se usa en la presente, se refiere de manera intercambiable a moléculas bicatenarias y monocatenarias. A menos que se especifique o requiera de cualquier otra manera, cualquier modalidad en la presente descripción que comprende un polinucleótido abarca la forma bicatenaria y cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se conocen o predicen como parte de la forma de bicatenaria.

Un polinucleótido o polipéptido tiene un cierto porcentaje de "identidad de secuencia" con otro polinucleótido o polipéptido, lo que significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases o aminoácidos es el mismo cuando se comparan las dos secuencias. La similitud de secuencia puede determinarse de varias formas diferentes. Para determinar la identidad de la secuencia, las secuencias pueden alinearse mediante el uso de los métodos y programas de computadora, incluido BLAST, disponibles en la red mundial en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Otro algoritmo de alineación es FASTA, disponible en el paquete Genetics Computing Group (GCG), de Madison, Wisconsin, Estados Unidos, una subsidiaria de propiedad total de Oxford Molecular Group, Inc. Otras técnicas de alineación se describen en *Methods in Enzymology*, volumen 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), editor Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, Estados Unidos. De particular interés son los programas de alineación que permiten lagunas en la secuencia. El Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite lagunas en las alineaciones de secuencias. Ver *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). También, el programa GAP que usa el método de alineación de Needleman y Wunsch puede usarse para alinear secuencias. Ver *J. Mol. Biol.* 48: 443-453 (1970)

Un "gen" se refiere a un polinucleótido que realiza una función de algún tipo en la célula. Por ejemplo, un gen puede contener un marco de lectura abierto que es capaz de codificar una proteína particular después de ser transcrito y traducido. Por otro lado, un gen puede codificar un producto de ARN funcional que no se traduce (por ejemplo, un aptámero, un ARN interferente, un ARN ribosómico (ARNr), un ARN de transferencia (ARNt), etc.).

Un "producto de expresión génica" o "producto génico" es una molécula resultante de la expresión de un gen particular, como se definió anteriormente. Los productos de expresión génica incluyen, por ejemplo, un polipéptido, un aptámero, un ARN de interferencia, un ARN mensajero (ARNm), un ARNr, un ARNt, un ARN no codificante (ncARN) y similares.

Un "agente de interferencia de ARN" o "agente de ARNi" abarca cualquier agente (o un polinucleótido que codifica tal agente) que puede usarse para cambiar la expresión de un gen (como se definió anteriormente). Los ejemplos de agentes de ARNi conocidos por un experto en la técnica incluyen, pero no se limitan a, (i) agentes de ARNip; (ii) ARN antisentido; (iii) agentes CRISPR; (iv) agentes de nucleasa con dedos de zinc, y (v) Agentes de nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN).

(i) un agente de ARNip ("ARN interferente pequeño" o "ARN interferente corto" (o ARNip)) es un dúplex de ARN de nucleótidos dirigido a un gen de interés (un "gen diana"). Un "dúplex de ARN" se refiere a la estructura formada por el apareamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN formando una región de ARN bicatenario (ARNbc). El ARNip se "dirige" a un gen porque la secuencia de nucleótidos de la porción dúplex del ARNip es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen diana. En algunas modalidades, la longitud del dúplex del ARNip es menor de 30 nucleótidos. En algunas modalidades, el dúplex puede tener 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la longitud del dúplex es de 19-25 nucleótidos de longitud. La porción dúplex de ARN del ARNip puede ser parte de una estructura de horquilla. Los agentes de ARNip que contienen una horquilla también pueden denominarse "agentes de ARNhc (ARN de horquilla corta)". Además de la porción dúplex, la estructura de horquilla puede contener una porción de bucle situada entre las dos secuencias que forman el dúplex. El bucle puede variar en longitud. En algunas modalidades, el bucle tiene una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos. La estructura de horquilla también puede contener porciones salientes 3' o 5'. En algunas modalidades, el saliente es un saliente 3' o 5' de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud. En general, el nivel de producto de expresión (por ejemplo, ARNm, polipéptido, etc.) de un gen diana se reduce mediante un agente ARNip (por ejemplo, un ARNip, un ARNhc, etc.) que contiene secuencias de nucleótidos bicatenarios específicas que son complementarias a al menos un segmento de 19-25 nucleótidos de longitud (por ejemplo, una secuencia de 20-21 nucleótidos) del transcrito del gen diana, que incluye la región 5' no traducida (UT), el ORF o la región 3' UT. En algunas modalidades, los ARN de interferencia cortos tienen una longitud de aproximadamente 19-25 nucleótidos. Véanse, por ejemplo, las solicitudes PCT WO0/44895, WO99/32619, WO01/75164, WO01/92513, WO01/29058, WO01/89304, WO02/16620 y WO02/29858; y la publicación de la patente de Estados Unidos número 20040023390 para descripciones de la tecnología de ARNip. El ARNpi y/o ARNhc puede codificarse por una secuencia de ácido nucleico y la secuencia de ácido nucleico también puede incluir un promotor. La secuencia de ácido nucleico también puede incluir una señal de poliadenilación. En algunas modalidades, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación mínima

sintética.

(ii) el ARN antisentido es ARN que es complementario a un producto de expresión génica. Por ejemplo, un ARN antisentido dirigido a un ARNm específico es un agente basado en ARN (o puede ser un ARN modificado) que es complementario del ARNm, donde la hibridación del ARN antisentido con el ARNm altera la expresión del ARNm (por ejemplo, mediante la alteración de la estabilidad del ARN, la alteración de la traducción del ARN, etc.). También se incluyen en el "ARN antisentido" los ácidos nucleicos que codifican un ARN antisentido.

(iii) Agentes CRISPR. Los sistemas CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas)/asociados a CRISPR (Cas) proporcionan a las bacterias y arqueas inmunidad adaptativa contra virus y plásmidos mediante el uso de ARN CRISPR (ARNcr) para guiar el silenciamiento de los ácidos nucleicos invasores. La proteína Cas 9 (o equivalente funcional y/o variante de la misma, es decir, proteína similar a Cas 9) contiene naturalmente actividad de ADN endonucleasa que depende de la asociación de la proteína con dos moléculas de ARN naturales o sintéticas llamadas ARNcr y ARNtracr (también llamadas RNA guía). En algunos casos, las dos moléculas están ligadas covalentemente para formar una sola molécula (también llamada ARN guía simple ("ARNsg")). Por lo tanto, la proteína Cas 9 o similar a Cas 9 se asocia con un ARN dirigido al ADN (cuyo término abarca tanto la configuración del ARN guía de dos moléculas como la configuración del ARN guía de una sola molécula), que activa la proteína Cas 9 o similar a Cas 9 y guía la proteína a una secuencia de ácido nucleico diana. Si la proteína Cas 9 o similar a Cas 9 conserva su función enzimática natural, escindirá el ADN objetivo para crear una ruptura de doble cadena, lo que puede conducir a la alteración del genoma (es decir, edición: delección, inserción (cuando está presente un polinucleótido donante), reemplazo, etc.), alterando de esta manera la expresión génica. Algunas variantes de Cas 9 (cuyas variantes están abarcadas por el término similar a Cas 9) se han alterado de manera que tienen una actividad de escisión del ADN disminuida (en algunos casos, escinden una sola cadena en lugar de ambas cadenas del ADN diana, mientras que en otros casos, han reducido severamente a ninguna actividad de escisión del ADN). Las proteínas similares a Cas 9 con una actividad de escisión de ADN disminuida (incluso sin actividad de escisión de ADN) aún pueden guiarse a un ADN diana y pueden bloquear la actividad de la ARN polimerasa. Por lo tanto, las proteínas de tipo Cas 9 enzimáticamente inactivas pueden dirigirse a una ubicación específica en un ADN diana mediante un ARN dirigido al ADN para bloquear la transcripción del ADN diana. Puede encontrarse información detallada sobre los agentes CRISPR, por ejemplo en (a) Jinek y otros, *Science*. 17 de agosto de 2012;337(6096):816-21: "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity"; (b) Qi y otros, *Cell*. 28 de febrero de 2013;152(5):1173-83: "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression", y (c) la solicitud de patente de los Estados Unidos número 13/842,859 y la solicitud PCT número PCT/US13/32589; todos los cuales se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad. Por lo tanto, el término "agente CRISPR" como se usa en la presente abarca cualquier agente (o ácido nucleico que codifica tales agente), que comprende secuencias sintéticas y/o de origen natural, que pueden usarse en el sistema basado en Cas 9 (por ejemplo, un Cas 9 o Cas 9 similar proteína, cualquier componente de un ARN que se dirige al ADN, por ejemplo, un ARN similar a ARNcr, un ARN similar a ARNtracr, un ARN guía único, etc.; un polinucleótido donante, y similares).

(iv) Agentes de nucleasa con dedos de zinc (ZFN). Las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) son endonucleasas de ADN artificiales generadas al fusionar un dominio de unión al ADN con dedos de zinc a un dominio de escisión del ADN. Las ZFN pueden diseñarse para apuntar a las secuencias de ADN deseadas y esto permite que las nucleasas con dedos de zinc escindan secuencias diana únicas. Cuando se introducen en una célula, las ZFN pueden usarse para editar el ADN diana en la célula (por ejemplo, el genoma de la célula) induciendo roturas de doble cadena. Para obtener más información sobre el uso de ZFN, consulte, por ejemplo: Asuri y otros, *Mol Ther*. febrero de 2012;20(2):329-38; Bibikova y otros *Science*. 2 de mayo de 2003;300(5620):764; Wood y otros *Science*. 15 de julio de 2011;333(6040):307; Ochiai y otros *Genes Cells*. Agosto de 2010;15(8):875-85; Takasu y otros al., *Insect Biochem Mol Biol*. octubre de 2010;40(10):759-65; Ekker y otros, *Zebrafish 2008 Summer*;5(2):121-3; Young y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de abril de 2011;108(17):7052-7; Goldberg y otros, *Cell*. 5 de marzo de 2010;140(5):678-91; Geurts y otros, *Science*. 24 de julio de 2009;325(5939):433; Flisikowska y otros, *PLoS One*. 2011;6(6):e21045. doi: 10.1371/journal.pone.0021045. Publicación electrónica del 13 de junio de 2011; Hauschild y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 de julio de 2011;108(29):12013-7; y Yu y otros, *Cell Res*. noviembre de 2011;21(11):1638-40; todos los cuales se incorporan en la presente descripción como referencia por sus enseñanzas relacionadas con las ZFN. El término "agente ZFN" abarca una nucleasa con dedos de zinc y/o un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una nucleasa con dedos de zinc.

(v) Agentes nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN). Las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) son endonucleasas de ADN artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión al ADN efector de tipo activador de la transcripción (TAL) con un dominio de escisión del ADN. TALENS pueden diseñarse rápidamente para unir prácticamente cualquier secuencia de ADN deseada y, cuando se introducen en una célula, los TALEN pueden usarse para editar el ADN diana en la célula (por ejemplo, el genoma de la célula) induciendo roturas de doble cadena. Para obtener más información sobre el uso de TALEN, ver, por ejemplo: Hockemeyer y otros *Nat Biotechnol*. 7 de julio de 2011; 29 (8): 731-4; Wood y otros *Science*. 15 de julio de 2011;333(6040):307; Tesson y otros *Nat Biotechnol*. 5 de agosto de 2011;29(8):695-6; y Huang y otros, *Nat Biotechnol*. 5 de agosto de 2011;29(8):699-700; todos los cuales se incorporan en la presente descripción como referencia por sus enseñanzas relacionadas con los TALEN. El término "agente TALEN" abarca un TALEN y/o un

polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un TALEN.

Un "elemento de control" o "secuencia de control" es una secuencia de nucleótidos involucrada en una interacción de moléculas, que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, que incluye la replicación, duplicación, transcripción, empalme, traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar la frecuencia, velocidad o especificidad del proceso y puede ser de naturaleza activadora o inhibitoria. Los elementos de control que se conocen en la técnica incluyen, por ejemplo, secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN capaz, en determinadas condiciones, de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificante normalmente ubicada aguas abajo (en la dirección 3') del promotor.

"Ligado operativamente" o "ligado operablemente" se refiere a una yuxtaposición de elementos genéticos, en donde los elementos están en una relación que les permite operar de la manera esperada. Por ejemplo, un promotor está ligado operativamente a una región codificante si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Puede haber residuos intermedios entre el promotor y la región codificante siempre que se mantenga esta relación funcional.

Un "vector de expresión" es un vector que comprende una región que codifica un polipéptido de interés y se usa para efectuar la expresión de la proteína en una célula diana deseada. Un vector de expresión comprende además elementos de control ligados operativamente a la región codificante para facilitar la expresión de la proteína en la diana. La combinación de elementos de control y un gen o genes a los que están ligados operativamente para la expresión a veces se denomina "casete de expresión", un gran número de los cuales se conocen y están disponibles en la técnica o pueden construirse fácilmente a partir de componentes disponibles en la técnica.

"Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y ligado operativamente a una secuencia codificante con la que no se encuentra ligado de forma natural es un promotor heterólogo. Por lo tanto, por ejemplo, un VAAr que incluye un ácido nucleico heterólogo que codifica un producto génico heterólogo es un VAAr que incluye un ácido nucleico que normalmente no se incluye en un VAA natural, de tipo salvaje, y el producto génico heterólogo codificado es un producto génico, normalmente no codificado por un VAA natural de tipo salvaje.

Los términos "alteración genética" y "modificación genética" (y variantes gramaticales de los mismos), se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a un proceso en donde un elemento genético (por ejemplo, un polinucleótido) se introduce en una célula de otra manera que no sea por mitosis o meiosis. El elemento puede ser heterólogo de la célula o puede ser una copia adicional o una versión mejorada de un elemento ya presente en la célula. La alteración genética puede efectuarse, por ejemplo, por transfección de una célula con un plásmido recombinante u otro polinucleótido mediante cualquier proceso conocido en la técnica, tal como electroporación, precipitación con fosfato cálcico o poniendo en contacto con un complejo polinucleótido liposoma. La alteración genética también puede efectuarse, por ejemplo, mediante transducción o infección con un virus de ADN o ARN o un vector viral. Generalmente, el elemento genético se introduce en un cromosoma o minicromosoma en la célula; pero se incluye en este término cualquier alteración que cambie el fenotipo y/o genotipo de la célula y su progenie.

Una célula ha sido "modificada genéticamente" o "transformada" o "transfectada" por ADN exógeno (por ejemplo, a través de un virus recombinante), cuando dicho ADN se ha introducido dentro de la célula. La presencia del ADN exógeno da como resultado un cambio genético permanente o transitorio. El ADN transformante puede o no estar integrado (ligado covalentemente) en el genoma de la célula. Un "clon" es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro común por mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de crecer de forma estable in vitro durante muchas generaciones.

Se dice que una célula está alterada, transducida, modificada genéticamente o transformada de forma "estable" con una secuencia genética si la secuencia está disponible para realizar su función durante el cultivo prolongado de la célula in vitro y/o durante un período prolongado de tiempo in vivo. Generalmente, tal célula se altera "heredablemente" (genéticamente modificada) porque se introduce una alteración genética que también es heredable por la progenie de la célula alterada.

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a los polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los términos abarcan además un polímero de aminoácidos que se ha modificado; por ejemplo, la formación de enlace disulfuro, glucosilación, lipidación, fosforilación o conjugación con un componente de marcaje. Los polipéptidos tales como polipéptidos antiangiogénicos, polipéptidos neuroprotectores y similares, cuando se discuten en el contexto del suministro de un producto génico a un sujeto mamífero, y sus composiciones, se refieren al polipéptido intacto respectivo, o cualquier fragmento o derivado modificado genéticamente del mismo, que conserva la función bioquímica deseada de la proteína intacta. De manera similar, las referencias a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos antiangiogénicos, ácidos nucleicos que codifican polipéptidos neuroprotectores y otros ácidos nucleicos para su uso en la suministro de un producto génico

a un sujeto mamífero (que pueden denominarse "transgenes" para su suministro a un célula receptora), incluyen polinucleótidos que codifican el polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado modificado genéticamente que posea la función bioquímica deseada.

5 Un plásmido, ácido nucleico, vector, virus, virión, célula huésped, proteína u otra sustancia "aislada" se refiere a una preparación de la sustancia desprovista de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes donde la sustancia o una sustancia similar se produce naturalmente o desde donde se prepara inicialmente. Por lo tanto, por ejemplo, puede prepararse una sustancia aislada mediante el uso de una técnica de purificación para enriquecerla a partir de una mezcla de origen. El enriquecimiento puede medirse de forma absoluta, tal como el peso por volumen de solución, o puede medirse en relación con una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla fuente. Los enriquecimientos crecientes de las modalidades de esta descripción son cada vez más aislados. Un plásmido, ácido nucleico, vector, virus, célula huésped u otra sustancia aislado se purifica en algunas modalidades, por ejemplo, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % de pureza, al menos aproximadamente 90 % de pureza, al menos aproximadamente 95 % de pureza, al menos aproximadamente un 98 % de pureza, o al menos aproximadamente un 99 %, o más, pura.

20 Como se usa en la presente, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevención total o parcial de una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de cura parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano e incluye: (a) prevenir que la enfermedad (y/o los síntomas causados por la enfermedad) ocurran en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o en riesgo de contraer la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado que la padezca; (b) inhibir la enfermedad (y/o síntomas causados por la enfermedad), es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad (y/o los síntomas causados por la enfermedad), es decir, provocar la regresión de la enfermedad (y/o los síntomas causados por la enfermedad).

30 Los términos "individuo", "huésped", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un mamífero, incluidos, pero no se limitan a, seres humanos; primates no humanos, incluidos los simios; animales deportivos de mamíferos (por ejemplo, caballos); animales de granja de mamíferos (por ejemplo, ovejas, cabras, etc.); mascotas de mamíferos (perros, gatos, etc.); y roedores (por ejemplo, ratones, ratas, etc.).

35 En algunas modalidades, el individuo es un ser humano que ha estado previamente expuesto de forma natural a VAA y, como resultado, alberga anticuerpos contra VAA (es decir, anticuerpos neutralizantes de VAA). En algunas modalidades, el individuo es un ser humano al que se le ha administrado previamente un vector VAA (y como resultado puede albergar anticuerpos contra VAA) y se necesita volver a administrar el vector para el tratamiento de una afección diferente o para el tratamiento adicional de la misma afección. Según los resultados positivos de los ensayos clínicos que implican la suministro de genes VAA, por ejemplo, en el hígado, el músculo y la retina (todos los tejidos afectados por anticuerpos neutralizantes contra este vehículo), existen muchas aplicaciones terapéuticas/enfermedades dianas de este tipo.

45 El término "cantidad efectiva" como se usa en la presente es una cantidad suficiente para lograr resultados clínicos beneficiosos o deseados. Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para los propósitos de esta descripción, una cantidad efectiva de un compuesto (por ejemplo, un virión infeccioso de VAAr) es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, prevenir, ralentizar o retrasar la progresión de (y/o síntomas asociados con) una etapa de enfermedad particular (por ejemplo, cáncer). En consecuencia, una cantidad efectiva de un virión de VAAr infeccioso es una cantidad del virión de VAAr infeccioso que es capaz de evadir la actividad neutralizante de los anticuerpos contra VAA de un individuo, para suministrar así de manera efectiva el ácido nucleico heterólogo a una célula diana (o células dianas) del individuo.

50 Antes de describir la presente invención en detalles, debe entenderse que esta invención no se limita a las modalidades particulares descritas, ya que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solo para el propósito de describir las modalidades particulares, y no pretende limitarse, dado que el alcance de la presente invención se limitará solo mediante las reivindicaciones adjuntas.

60 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor del intervalo, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor del intervalo o que se declare en ese intervalo establecido, es abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también se abarcan dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Donde el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

65 A menos que se especifique de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se conoce comúnmente por los expertos en la técnica a

la que pertenece esta invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente descripción pueden también usarse en la práctica o las pruebas de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas en la presente descripción son para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los que se citan las publicaciones.

Debe destacarse que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas del singular "un," "una" y "el/la" incluyen referencias del plural a menos que el contexto lo establezca claramente de cualquier otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso" incluye una pluralidad de tales viriones y la referencia al "virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso" incluye una referencia a uno o más de tales viriones y equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la técnica, etcétera. Se hace notar además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "solamente," "solo" y similares en relación con la narración de los elementos de la reivindicación, o usar una limitación "negativa".

Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de modalidades separadas, pueden proporcionarse además en combinación en una sola modalidad. Por el contrario, varias características de la invención que son, descritas por brevedad, en el contexto de una sola modalidad, pueden proporcionarse además por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las modalidades pertenecientes a la invención están específicamente abarcadas por la presente invención y se describen en la presente descripción como si todas y cada una de las combinaciones se revelaran individual y explícitamente. Además, todas las subcombinaciones de las diversas modalidades y elementos de las mismas también están abarcadas específicamente por la presente invención y se describen en la presente descripción como si todas y cada una de tales subcombinaciones se revelaran individual y explícitamente en la presente descripción.

Las publicaciones analizadas en la presente descripción se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente descripción debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder tal publicación en virtud de una invención previa. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación presentes que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Descripción detallada

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La presente descripción proporciona viriones de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infecciosos que comprenden una proteína de la cápside variante y un ácido nucleico heterólogo. La presente descripción proporciona además las proteínas de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variantes (y/o un ácido nucleico que codifica las proteínas de la cápside de VAA variantes), que confieren a un virión de VAAr infeccioso una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos. La presente descripción proporciona además células huésped que comprenden un virión de VAAr infeccioso y/o un ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside de VAA variante objeto. La presente descripción proporciona además bibliotecas de los viriones, proteínas de la cápside, ácidos nucleicos y/o células huésped anteriores; donde la proteína de la cápside de VAA variante de al menos un miembro de la biblioteca comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos expuesta en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33.

La presente descripción proporciona además métodos para suministrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana donde la célula diana se pone en contacto con un virión de VAAr infeccioso objeto. La presente descripción proporciona además métodos para suministrar un producto génico a un individuo, los métodos generalmente implican la administración de una cantidad efectiva de un virión de VAAr objeto a un individuo que lo necesite. También se proporcionan en la presente descripción composiciones y estuches para practicar los métodos objeto. En muchas modalidades, se aísla un virión de VAAr infeccioso objeto, un ácido nucleico objeto, una proteína de la cápside de VAA variante objeto, una célula huésped objeto, etc.

Polipéptidos de la cápside de VAA variantes

Un polipéptido de la cápside de VAA variante objeto (o la proteína de la cápside de VAA variante codificada por un ácido nucleico objeto) confiere a un virión de VAAr infeccioso que comprende el polipéptido de la cápside de VAA variante una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por un VAA de tipo salvaje (por ejemplo, VAA2 (VAA de tipo salvaje serotipo 2)) o un VAA que comprende una proteína de la cápside de tipo salvaje. En algunas modalidades, la mayor resistencia es al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces) veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 17 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos

aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, etc.) mayor que la resistencia exhibida por un VAA de tipo salvaje (por ejemplo, VAA2 (VAA de tipo salvaje serotipo 2)) o un VAA que comprende una proteína de la cápside de tipo salvaje.

5 Puede decirse que una proteína de la cápside de VAA variante objeto (o la proteína de la cápside de VAA variante codificada por un ácido nucleico objeto) confiere a un virión de VAAr infeccioso una transducción aumentada de células de mamífero en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la transducción exhibida por un VAA de tipo salvaje (por ejemplo, VAA2 (serotipo 2 de VAA de tipo salvaje)) o un VAA
10 que comprende una proteína de la cápside de tipo salvaje. En algunas modalidades, la transducción aumentada es al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 17 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, etc.) mayor que la transducción exhibida por un VAA de tipo salvaje (por ejemplo, VAA2 (VAA de tipo salvaje serotipo 2)) o un VAA que comprende
15 una proteína de la cápside de tipo salvaje.
20

En algunas modalidades, una proteína de la cápside de VAA variante objeto (o la proteína de la cápside de VAA variante codificada por un ácido nucleico objeto) exhibe una unión disminuida a un anticuerpo neutralizante que se une a una proteína de la cápside de VAA de tipo salvaje. Por ejemplo, una proteína de la cápside de VAA variante
25 objeto puede exhibir al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 17 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, etc.) unión reducida (por ejemplo, afinidad reducida) a un anticuerpo neutralizante que se une a una proteína VAA de la cápside de tipo salvaje, en comparación con la afinidad de unión del anticuerpo a la proteína de la cápside de VAA de tipo salvaje.
35

En algunos casos, un anticuerpo neutralizante contra VAA se une a una proteína de la cápside de VAA variante objeto (o la proteína de la cápside de VAA variante codificada por un ácido nucleico objeto) con una afinidad de menos de aproximadamente 10^{-7} M, menos de aproximadamente 5×10^{-6} M, menos de aproximadamente 10^{-6} M, menos de aproximadamente 5×10^{-5} M, menos de aproximadamente 10^{-5} M, menos de aproximadamente 10^{-4} M, o menor.
40

El término "proteína de la cápside variante" no incluye proteínas de la cápside de VAA de tipo salvaje. Una "proteína de la cápside de VAA variante" no comprende una secuencia de aminoácidos presente en una proteína de la cápside de VAA de origen natural. Por ejemplo, una proteína de la cápside variante objeto no comprende una
45 secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia del 100 % con cualquiera de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1-9. En otras palabras, una proteína de la cápside variante objeto no comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-9. Una proteína de la cápside variante puede diferir en la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de VAA "iniciadora" o "parental", cuya proteína de la cápside de VAA parental puede ser una proteína de la cápside de VAA de tipo salvaje o una proteína de la cápside de VAA de tipo no salvaje.
50

En algunos casos, una proteína de la cápside de VAA variante (o la proteína de la cápside de VAA variante codificada por un ácido nucleico objeto) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 99,5 % o 100 %) de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 203-736 de la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33.
55

En algunos casos, una proteína de la cápside de VAA variante (o la proteína de la cápside de VAA variante codificada por un ácido nucleico objeto) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 99,5 % o 100 %) de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33.
60

En algunos casos, una proteína de la cápside de VAA variante (o la proteína de la cápside de VAA variante
65

sustituciones de aminoácidos N312K, N449D, T450A, N551S e I698V con relación a la proteína de la cápside de VAA de VAA2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2), o las posiciones correspondientes en otro serotipo parental de VAA.

5 Las proteínas de la cápside de VAA variantes ilustrativas incluyen, pero no se limitan a (véanse las Figuras 8-10 para alineaciones de secuencias ilustrativas seleccionadas):

SM 10-2 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 10):

10 | MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
 GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF
 QERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD
 15 SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
 GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK
 QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL
 20 KFCLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
 ADVFMVPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVFP
 HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTDTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRNQSR
 25 NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHK
 DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL
 QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLG
 30 GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 KRWNPEVQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNQ;

35 SM10-2 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 22):

40 | atggctgccgatggttatctccagattggctcgaggacactctctctgaaggaataagacagtggaggactcaa
 acctgccccaccaccacaaaagcccgcagagcggcataaggacgacagcaggggtcttgtgcttctgggtacaagtacctc
 ggaccctcaacggactcgacaagggagagccggtaacgaggcagacgccggccctcgagcacgacaaaagcctatg
 45 accggcagctcgacagcggagacaaccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagttcaggaacgccttaaagaag

50

55

60

65

atacgtcttttgggggcaacctcggacgagcagtctccaggcgaaaaagagggttcttgaacctctgggcctggttgaggaac
 ctgtaagacggctccgggaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctcgggaaccggaaagg
 5 cgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaattttggtcagactggagacgcagactcagtacctgacccccagcctctcgg
 acagccaccagcagccccctctggtctgggaactaatac gatggctacaggcagtgggcgcaccaatggcagacaataacga
 10 gggcgccgacggagtgggtaattcctcgggaaattggcattgcgattccacatggatgggcgacagagtcaccaccagc
 accgaaacctgggcctgcccacctacaacaaccacctctacaacaaatttccagccaatcaggagcctcgaacgacaatca
 15 ctactttggctacagcacccttgggggtattttgactcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcaaagactcat
 caacaacaactggggattccgacccaagagactcaagttcaagctctttaacattcaagtcaaagagggtcacgcagaatgacg
 gtacgacgacgattggcaataaccttaccagcacgggtcaggtgttactgactcggagtagcagctcccgtacgtctcggctc
 20 ggcgcatcaaggatgctcccggcgttcccagcagacgttctcatggtgccacagtatggatacctaccctgaacaacggga
 gtcaggcagtaggacgctcttcattttactgcctggagtagtcttctctcagatgctgcgtaccgtaacaactttaccttcagcta
 25 cacttttggagacgttcttccacagcagctacgctcacagccaaggtctggaccgtctcatgaatcctctcaccgaccagtagc
 tgtattacttgagcagaacagacactccaagtgaaccaccacgcagtcagggttcagtttctcaggccggagcgagtgaca
 ttcggaaccagctaggaactggcttctggaccctgttaccgccagcagcgagtatcaaagacatctcgggataacaacaaca
 30 gtgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaatccgggcccggccatggcaagc
 cacaaggacgatgaagaaaagttttctcagagcgggggtctcattttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggac
 35 attgaaaaggatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatcccgtggctacggagcagtaggttctgtatctacc
 aacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttcttccaggcatggtctggcaggac
 agagatgtgtacctcagggggccatctgggcaagattccacacacggacggacatttccacctctcccctcatgggtgga
 40 ttcggacttaaacacctcctccacagattctcatcaagaacaccccggtagctgcgaatcttcgaccacctcagtgccgcaa
 agtttcttctcctacacacagtactccacgggacaggtcagcgtggagatcagtgaggagctgcagaaggaaaacagcaaaa
 45 cgctggaaatcccgaagttcagtagtactccaactacaacaagtctgtaaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgattca
 gagcctcggcccattggcaccagatacctgactcgtaatcagtaa

50 Mezcla 100-1 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 11):

| MAADGYLPDWLEDLSEGRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
 GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADA
 55 FQURLQGDTSFGNLRVAFQAKKRVLPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQP
 DSSTGIGKKGKQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQPLGEPATPAAVGPTTMASGG
 GAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYK
 60 QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFPRKRL
 NFKLFNIQVKEVTTNDGVTIANNLTSTVQVFSDDYQLPYVLGSAHEGCLPPFP
 65 ADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF

HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRQTQNSGSAQNKDLLFSRGSAPAGMSVQ
PKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASH
5 KDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVA
VNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSP
10 MGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE
NSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL;

Mezcla 100-1 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 23):

15 | atggctgctgatggttatcttcagattggctcgaggacactctctctgaaggaataagacagtggggaagctcaaa
cctggcccaccaccacaaagcccgcagagcggcataaggacgacagcaggggtctgtgcttctgggtacaagtacctcg
20 gaccctcaacggactcgacaagggagagccggtaacgagggcagacgcagcggccctcgagcacgacaaggcctacga
ccagcagctcaaggccgggtgacaaccctacctaagtacaaccacgccgacgcggagtccagcagcggcttcagggcga
cacatcgtttgggggcaacctcggcagagcagctctccaggccaaaaagagggtcttgaacctcttgctctggttgagcaagc
25 ggggtgagacggctcctgaaagaagagaccgttgattgaatccccacgacggcggactcctccacgggtatcggcaaaaa
ggcaagcagccggctaaaaagagactcaatfttgctcagactggcggactcagagtcagtcctccgaccacaacctctcggag
30 aacctccagcaacccccgctgctgtgggacctactacaatggcttcaggtggtggcgcaccaatggcagacaataacgaagg
cgccgacggagtggtgtaatgcctcaggaatggcattcggattccacatgctggggcagacagtcaccaccagcacc
35 cgcacctgggccttggccacctacaataaccacctctacaagcaaatctccagtcttcaacggggggccagcaacgacaacca
ctacttggctacagcaccctcgggggtatfttgactcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcagcgactca
40 tcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaactcaactcttcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatgatg
gcgtcacaaccatcgtaataaccttaccagcaggttaagcttctcggactcagactatcagctcccgtacgtgctcggggtc
ggctcacgaggggtgcctcccggcgtcccaagcagacgtcttcatggtgccacagtatggatactcaccctgaacaacggga
45 gtcaggcagtaggacgctcttcaatfttactgcctggagacttctctcagatgctgcgtaccggaacaactttacctcageta
cacttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcaccgaccgtacc
50 tgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtccccaaaacaaggacttctgttttagccgggggtctccagctggca
tgtctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgttctaaaacaaaaacagacaacaaca
gcaactttacctggactggtgcttcaaaaataaccttaatggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacaca
55 aagacgacaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgattttgaaaggagagcggcggagcttcaaacactgcattgg
acaatgtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaaagccactaacccccgtggccaccgaaagatttgggactgtggcagtc
ctccagagcagcagcagacacctgcgaccggagatgtcatgttatgggagccttacctggaatggtgtgcaagacagag
60 acgtatacctgcaggggtccatttggccaaaattcctcacacagatggacactttcaccgctcctcttattgggcggctttgga
ctcaagaaccgctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcggagttttcagctacaaaatttgc
65 ttactcatcaccaataactccacaggaagtgagtgtgaaattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaagcgtgga

atcccgaaagtgcagtacacatccaattatgcaaaatctgccaacgttgattttactgtggacaacaatggactttatactgagcctc
gccccattggcaccggttacctcacccgtcccctgtaa;

5

Mezcla 100-3 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 12):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAE
FQQRLQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQP
DSSTGIGKKGKQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQPLGEPATPAAVGPPTMASGG
GAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYK
QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHFHCHFSRWDWQRLINNNWGFPRKRL
NFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANLSTVQVFSDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFP
ADVFMVPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPTGMSVQP
KNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHK
DDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAV
NLQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPL
MGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE
NSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL;

10
15
20
25
30
35

Mezcla 100-3 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 24):

atggctgctgatgggtatctccagattggctcagggacactctctgaaggaaataagacagtggtggaagctcaaa
cctggcccaccaccacaaagcccgcagagcggcagataaggacgacagcaggggtcttctgctctcgggtacaagtacctcg
gaccttcaacggactcgacaagggagagccggtaacgagggcagcagcagcggcctcgagcacgacaaggcctacga
ccagcagctcaagggcgggacacccctacctaagtaaacacgcccagcgggaggtccagcagcggcttcagggcga
cacatcgtttggggcaacctcggcagagcagctctccagccaaaaagagggctctgaacctctggtctggtgagcaagc
gggtgagacggctcctggaaagaagagaccgttgattgaatccccccagcagcccgactcctccacgggtatcggcaaaaa
ggcaagcagccggcgtaaaaagagactcaatttggcagactggcagactcagagtcagtcagccccgaccacaacctctcggag
aacctccagcaacccccgctgctgtgggacctactacaatggcttcaggtggtggcgaccaatggcagacaataacgaagg
cgccgacggagtggtgtaatgcctcaggaattggcattgcgattccacatgctggggcagacagtcaccaccagcacc
cgcacctggccttcccactacaataaccacctctacaagcaaatctccagtcctcaacgggggccagcaacgacaacca
ctacttcggctacagcaccctcgggggtatfttgacttcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcagcactca
tcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaactcaactcttcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatgatg
gcgtcacaacctcgttaataaccttaccagcaggttcaagtctctcggactcagactatcagctcccgtagctcggggtc
ggctcacgagggctgcctcccggcgttcccagcagacgtcttcatggtgccacagtatggatacctcaccctgaacaacggga

40
45
50
55
60
65

5 gtcaggcagtaggacgctcttcaatfactgcctggagtagcttctctcagatgctgcgtaccgaaacaactttaccttcagcta
 cacttttgaggacgttcttccacagcagctacgctcacagccagagctctggaccgtctcatgaatcctctcagaccagtacc
 10 tgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcccaaaacaaggacttgcctgtttagccgggggctccaactggca
 tctctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgtatggcagcagcgcgttctaaaacaaaaacagacaacaaca
 gcaactttacctggactggtgcttcaaaaataaccttaatgggcgtgaatctataatcaaccctggcactgctatggcctcacaca
 15 aagacgacaaaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgattttgaaaggagagcgcgggagcttcaaacactgcattgg
 acaatgcatgatcacagacgaagaggaaatcaaaagccactaacccctggccactgaaagatttgggactgtggcagtcaat
 ctccagagcagcagcacagaccctgcgaccggagatgtgcatgccatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacaga
 20 gacgtataacctgcagggctctatttgggcaaaaattctcacacggatggacacttccaccgtctctctcatgggcggcttgg
 actcaagaaccgctctcagatctcatcaaaaacacgcctgttctgcgaatctccggcggagtctcagctacaaagtgg
 ctctcattcaccagctattccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaaacagcaaacgctgg
 25 aatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatcgcaaacgttgatttactgtggacaacaatggactttatactgagcct
 cgccccattggcaccggttacctaccctccctgtaa;

30 Mezcla 100-7 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 13):

| MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVL
 PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
 35 EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE
 PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPATPAAVGPPTMASG
 GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLY
 40 KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFPRK
 RLSFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSSEYQLPYVLGSAHQGCLPP
 45 FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVP
 FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSFAGMSV
 QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS
 50 HKDDEDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV
 AVNFQSSSTD PATGDVHAMGALPGMVWQDRD VYLQGP IWA KIPHTDGHFHPSP
 55 LMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQK
 ENSKRWNPEVQYTSNYAKSANIDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPQ;

60 Mezcla 100-7 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 25):

| atggctgccgatggttatctccagattggctcgaggacaacctctctgaggcattcgcgagtggtggcgctgaa
 acctggagccccgaagcccaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctggtgcttctggctacaagtacct
 65 cggaccctcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgcggcggatgcagcggccctcgagcacgacaagcctac

gaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacgccgacgccgagtttcaggagcgtctgcaagaa
 5 gatacgtcttttgggggcaacctcgggcgagcagcttccaggccaagaagcgggtctcgaacctctcggctctggttgagga
 aggcgctaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcaatcggcacaagagccagactcctcctcgggcatcggcaa
 gacagggccagcagcccgctaaaaagagactcaatthtggcagactggcgactcagagtcagtcctccgacccacaacctctc
 10 ggagaacctccagcaacccccgctgctgtgggacctactacaatggcttcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacg
 aaggcggcgacgggagtggttaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggggcgacagagtcaccaccag
 caccgaacatgggccttggccacctataacaaccacctctacaagcaaatctccagtcttcgacggggggccagcaacgac
 15 aaccactactcggctacagcaccctcgggggtatttggacttaacagattccactggcacttttcaccacgtgactggcagcg
 actcatcaacaacaactggggattccggcccaagagactcagcttcaagctcttcaacatccagggtcaaggaggtcacgacga
 20 atgatggcgtcacaaccatcgtataaaccttaccagcacgggtcaagtcttctcggactcggagttaccagcttccgtacgtctc
 ggctctgcgcaccagggctgcctccctcctgctccggcgacgtgttcatgattccgcaatacggctacctgacgtcaacaat
 ggagccaagccgtgggacgttccttttactgctggaatatttcccttctcagatgctgagaacgggcaacaactttaccttc
 25 agctacacctttgaggaagtgcctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcga
 caatacctgtattacctgaacagaactcaaatcagtcgggaagtggccaaaacaaggacttgcgttttagccgtgggtctccag
 30 ctggcatgtctgttcagccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgtttctaaaaacaaaaacagacaaca
 acaacagcaatthtacctggactggtgcttcaaatataacctcaatggcgctgaatccatcatcaacctggcactgctatggcc
 35 tcacataaagacgacgaagacaagtcttccatgagcgggtgcatgattttggaaaagagagcggcggagcttcaaacact
 gcattggacaatgcatgattacagacgaagaggaaattaaagccactaacctgtggccaccgaaagatttggaccgtggc
 agtcaatttcagagcagcagcagacagaccctgcgaccggagatgtgcatgctatgggagcattacctggcatggtgtggcaag
 40 atagagacgtgacctgcagggtccatttggccaaaattcctcacacagatggacacttccaccgtctcctcttatggggcg
 ctttggactcaagaaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcgagtttcaactacaa
 45 agtttcttcatcaccactccacagggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaaa
 cgctggaatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctgccaacattgatttactgtggacaacaatggactttact
 gagcctcggccattggcaccgttacctcaccgtccccagtaa;

50 Mezcla 10-2 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 26):

| MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKANQQKQDDGRGLVL
 55 PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
 EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQE
 60 PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPAAAPSGVGSLSMASG
 GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHLY
 KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFPRK
 65 RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSSEYQLPYVLGSAHQGCLPP

5
 10
 15
 FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVP
 FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSV
 QPKNWLPGPCYRQQCVSKTKTDNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS
 HKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV
 AVNLQSSSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPiWAKIPHTDGHFHPS
 PLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQ
 KENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL;

Mezcla 10-2 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 34):

20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 | atggctgccgatggttatctccagattgctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacttgaa
 acctggagccccgaaacccaaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctggtgcttctggctacaagtacct
 cggacccttcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgcggcggatgcagcggccctcgagcacgacaaggcctac
 gaccagcagctcaaacgggtgacaatccgtacctcgggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcgtctgcaagaag
 atactcttttgggggcaacctcgggcgagcagctctccaggccaaaagagggttctcgaacctctcggctggtgaggaag
 cgggctaagacggctcctggaaaagaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcattggcaaga
 caggccagcagcccgtaaaaagagactcaatttggtaactggcactcagagtcagtcagccccgaccacaacctctcgg
 agaacctcccgcagccccctcaggtgtgggatctctfacaatgcttcaggtggtggcgaccaatggcagacaataacgaag
 gcggcgacggagtggtgtaatgcctcaggaattggcattgcgattccacatggctggggcgacagagtcaccaccagcac
 ccgcacctgggacctgcccacctacaataaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacggggggccagcaacgacaacc
 actactcgggctacagcaccctcgggggtatttgaactcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcaagactc
 atcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaactcaagctcttcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatgat
 ggcgtcacgaccatcgtaataaccttaccagcacggtcaagtctctcggactcggagtagcagttgccgtactcctcggct
 ctgcgaccagggtgctcctccctccgttccggcgacgtgttcattccagtagcggctacctaacgctcaacaatggca
 gccaggcagtgggacgggtcatcctttactgcctggaatatttccatcgcagatgctgagaacgggcaacaactttacctcag
 ctacaccttgaggaaagtgccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcgacca
 gtacctgtattacctgaacagaactcaaaatcagtcgggaagtgccccaaaacaaggacttgcgttttagccgtgggtctcagct
 ggcattgtctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttaccggcagcagtgcttctaaaacaaaaacagacaacaac
 aacagcaactttacctggactggtgcttcaaaatataaccttaattggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctca
 caaaagacgacaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgattttgaaaaggagagcggcgagcttcaaacactgca
 ttggacaatgcatgatcacagacgaagaggaaatcaaaagccactaacccgtggccaccgaaagatttgggactgtggcagt
 caatctccagagcagcagcacagacctgcgaccggagatgtgcatgttatgggagccttacctggaatggtgtgcaagac
 agagacgtataacctgcagggtctatttgggcaaaaattcctcacacagatggacacttccaccgtctcctcttatggcggtctt
 ggactcaagaaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgaatcctccggcgagtttccagctacaaaat

ttgcttcattcatcaccaatactccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaagcgc
 5 tggaatcccgaagtgcagtacacatccaattatgcaaaatctgccaacggtgattcactgtggacaacaatggactttatactga
 gcctcgccccattggcaccggttacctcaccggtcccctgtaa;

Mezcla 10-6 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 27):

10 | MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKVNQQKQDNARGLVL
 PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
 15 EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE
 PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEPATPAAVGPPTMASG
 GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLY
 20 KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYDFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK
 RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSSEYQLPYVLGSAHQGCLPP
 25 FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDV
 PFHSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPTGMSV
 QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS
 30 HKDDEDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV
 AVNLQSSSTD PATGDVHAMGALPGMWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPS
 35 PLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFAFITQYSTGQVSVEIEWELQ
 KENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL;

Mezcla 10-6 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 35):

40 | atggctgccgatggttatctccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgaatggtgggacttgaaa
 cctggagccccgaaacccaaagtcaaccagcaaaagcaggacaacgctcggggcttctgtctccgggttacaatactctg
 45 gaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcggacgcagcggccctcgagcacgacaaggcctacga
 ccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctcgggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcgtctgcaagaagat
 50 acgtcttttgggggcaaccttgacgagcagcttccaggccaagaagagggttctcgaacctttgtctggtgaggaaggt
 gctaagacggctcctgaaaagaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcattggcaagaca
 ggccagcagcccgctaaaaagactcaatttggctcagactggcgcactcagagtcagtcctccgaccacaacctctcggag
 55 aacctccagcaacccccgctgctgtgggacctactacaatggctcagggcgtgctgcaccaatggcagacaataacgaagg
 cgccgacggagtgggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcacc
 60 cgcacctgggccttggccacctacaataaccacctctacaagcaaatctccagtgcttcaacggggggccagcaacgacaacca
 ctactcggctacagcaccctgggggtatttggacttcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcaagactcat
 caacaacaattggggattccggcccaagagactcaactcaagctcttcaacatccaagtcaaggagggtcacgacgaatgatg
 65 gcgtcacgaccatcgtaataaccttaccagcacggtcaagtctctcggactcggaggtaccagttgccgtactcctcggctc

5 tgcgcaccagggctgcctccctccgttcccggcggacgtgtcatgattccgcaatacggctacctgacgcctcaacaatggcag
 ccaggcagtgaggacgggtcctctttactgcctggaatatttccatcgcagatgctgagaacgggcaataactttacctcagct
 10 acactttgaggacgttctttccacagcagctacgctcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatgaccagta
 cctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcggaaagtgccaaaacaaggacttgctgttagccgtgggtctccaactggc
 atgtctgtcagcccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgtttctaaaacaaaacagacaacaacaac
 15 agcaactttacctggactgggtctcaaaatataaccttaatggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacac
 aaagacgacgaagacaagtcttccatgagcgggtcatgattttgaaaggagagcggcggagctcaaacactgcattg
 gacaatgcatgatcacagacgaagaggaaatcaagccactaacccgtggccactgaaagatttgggactgtggcagtcaa
 20 tctccagagcagcagcacagacctgcgaccggagatgtgcatgccatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacaga
 gacgtatactgcagggtctatttgggcaaaattctcacaggatggacactttaccctctctctcatggggggctttgg
 acttaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcagagtttctggctacaaagttg
 25 cttcattcatcaccagtatccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacgctgg
 aatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatcgcacaacgttgatttactgtggacaacaatggactttatactgagcct
 cgccccattggcaccggttacctcaccctgcccctgtaa;

30 Mezcla 10-8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 28):

| MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPAPKPKVNQKQDNARGLVL
 35 PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA
 EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE
 PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQPLGEPATPAAVGPTTMAASG
 40 GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLY
 KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPK
 45 RLNFKLFNQVKETTDVTIANNLSTVQVFSSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPAD
 VFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTSYTFEDVPFHSS
 YAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPTGMSVQPKN
 50 WLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDD
 EDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEATNPVATERFGTVAVNLQSS
 55 PATDVHAMGALPGMVWQDRDYYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLMGFFGLKHP
 PPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFAFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEV
 QYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRP;

60 Mezcla 10-8 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 36):

| atggctgccgatggttatctccagattggctcgaggacaacctctctgaggcattcgcgaatggtgggacttga
 65 cctggagccccgaaacccaaagtcaaccagcaaaagcaggacaacgctcgggtcttctgcttccgggtfacaataacctg

gaccctcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcgacgcagcggccctcagcacgacaaggcctacga
 ccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtaccttcggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcgtctgcaagaagat
 5 acgtctttgggggcaaccttgagcagcagcttccaaggccaagaagagggttctcgaaccttttgctggtgaggaaggt
 gctaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggattggcaagaca
 10 ggccagcagcccgtaaaaagagactcaatthtgcagactggcgactcagagtcagtecccgaccacaacctctcggag
 aacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggcttcaggcggtggcgaccaatggcagacaataacgaagg
 cggcgacggagtggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcacc
 15 cgaacatgggcttggccacctataacaaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacgggggccagcaacgacaacca
 ctactcggctacagcaccctgggggtattttgattcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcagcactcat
 20 caataacaattggggattccggcccaagagactcaactcaaaacttcaantccaagtcaaggagggnacgacgaangatg
 ncgtcacaaccatcgctaataaccttaccagcagggftcaagtctctcggactcggagtagaccgttccgtacgtctcggctct
 25 gcgcaccagggtgcctccctccgttcccggcgacgtgttcatgattccgcaatacggctacctgacgtcaacaatggcag
 ccaggcagtgggacgggtatcttttactgcctggaatatttccatcgcagatgtgagaacgggcaataactttacncagct
 acacttttgaggacgttctttccacagcagctacgctcagaccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcgaccagta
 30 cctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcctcaaaacaaggacttctgtttagccgtgggtctccaactggc
 atgtctgtcagcccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgttctaaaacaaaacagacaacaacaac
 35 agcaactttacctggactggtgctcaaaatataacctfaatggcggtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacac
 aaagacgacgaagacaagtcttccatgagcgggtgcatgattttggaaaggagagcggcggagcttcaaacactgcattg
 gacaatgcatgatcacagacgaagagannnnaagccactaaccctggccactgaaagattgggactgtggcagtcaa
 40 tctccaagcagcacannnacctgcgaccgnagatgtgcatgcatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagag
 acgtataacctgcagggctctatttggccaaaattctcacacggatggacactttcaccgtctctctcatggcgggctttgga
 45 cttaagcaccgctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgaatcctccggcagagttttcgctacaaagtttgc
 ttattcatcaccagatttccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacgctgga
 50 atcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctccaacgttgatttactgtggacaacaatggactttatactgagcctc
 gccccattggcaccggttacctcaccgtcccnata;

Mezcla 100-2 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 29):

55 | MASDGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVL
 PGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLRAGDNPYLRYNHADA
 60 EFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE
 PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPATPAAVGPTTMASG
 GGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLY
 65 KQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK

RLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAHQGCLPP
 5 FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDV
 PFHSSY AHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGS PAGMSV
 QPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMAS
 10 HKDDKDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTV
 AVNLQSSSTD PATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGP IWAKIPHTDGHFHPS
 15 PLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQ
 KENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL;

Mezcla 100-2 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 37):

20 | atggctccgatggttatctccagattggctc gaggacaacctctctgagggcatccgcgagtggtgggacttgaaa
 cctggagccccgaaacccaaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctggtgcttctggctacaagtaccte
 25 ggacctcaacggactcgacaagggggagcccgtaacgcggcgatgcagcggccctc gagcacgacaaggcctacg
 accagcagctcagagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcgtctgcaagaag
 atacgtcttttggggcaacctcgggcgagcagctctccaggccaagaagaggggtctcgaaccttttggctggttgaggaaag
 30 gtgctaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctctcgggcattggcaaga
 caggccagcagcccgtaaaaaagactcaatfttggtcagactggcgactcagagtcagccccgaccacaacctctcgg
 35 agaacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggctcagggcgtggcgcaccaatggcagacaataacgaa
 ggcgccgacggagtggtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagca
 40 cccgaacatgggecttgeccacctataacaaccacctctacaagcaaatctccagtgttcaacgggggccagcaacgacaac
 cactactcggctacagcacccccctgggggtatfttgattcaacagattccactgccatttctaccacgtgactggcagcgact
 catcaacaacaattggggattccggcccaagagactcaacttcaactctcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatga
 45 tggcgtcacaacctcgttaataaccttaccagcaggttcaagtctctcggactcggagtaccagcttccgtacgtctcggct
 ctgcgcaccagggctgcctccctccgttcccggcggacgtgttcatgattccgcagctacggctacctaacgctcaacaatggca
 50 gccaggcagtgggacgggtacatcctttactgcctggaatattcccatcgcagatgctgagaacggggcaataactttacctcagc
 tacacctcagagcagtgctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcctcagca
 gtacctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcccaaaaacaaggacttctgtttagccgggggtctccagc
 55 tggcatgtctgttcagcccaaaaactggctacctggacctgttaccggcagcagcgcgtttctaaaacaaaacagacaacaa
 caacagcaactttacctggactggtgcttcaaatataaccttaattggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctc
 60 acacaaagacgacaaagacaagttcttccatgagcgggtgatgattttgaaaggagagcggcggagcttcaaacactgc
 attggacaatgcatgatcacagacgaagaggaaatcaaagccactaacccccgtggccaccgaaagatttgggactgtggca
 gtcaatctccagagcagcagcagaccctgcgaccggagatgtgatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaaga
 65 cagagacgtatactgcaggggtccatttgggcaaaattcctcacacagatggacacttaccctctcttatggcggc

tttgacttaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcagagtttcggctacaaa
gtttgcttcattcatcaccagatttctactggccaagtcagcgtggagattgaatgggagctgcagaaaagaaaacagcaaacg
5 ctggaatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctgccaacgttgattcactgtggacaacaatggactttatactga
gcctcgtcccattggcaccggttacctcaccggtcccctgtaa;

SM 10-1 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 30):

15] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEP
20 DSSSGIGKTGQPPAKKRLNFGQTGDSSEVPDPQLGEPPTPAAVGPTTMASSG
GAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVITSTRTWALPTYNNHLYK
25 QISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL
SFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLSTVQVFSSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
ADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVPF
30 HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSAPAGMSVQ
PKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASH
35 KDDKEDKFFPMSGVMIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVA
VNFQSSSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGIWAKIPHTDGHFHPSP
40 MGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKE
NSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL;

SM 10-1 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 38):

45] atggctgccgatggtattctccagattgctcgcaggacactctctctgaaggaataagacagtggtggaagctcaa
acctggcccaccaccacaaagcccgcagagcggcagacagcagcaggggctctgtgcttctcgggtacaagtacctc
50 ggaccttcaacggactcgcacaagggagagccgggtcaacgagcagacgccgcggccctcgcagcacgacaaggcctacg
accagcagctcaaaagcgggtgacaatcctacctgcgggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcgtctgcaagaaga
tacgtcttttggggcaacctcgggcgagcagcttccaggccaagaagcgggttctcgaacctctcgggtctggtgaggaag
55 gcgctaagacggctcctggaaaagaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctcgggcacggcaaga
cagggcagcagcccgtctaaaagagactcaatttggctcagactggcactcagagtcagtcctcccaccacaacctctcgg
agaacctccagcaacccccgctgctgtgggactactacaatggcttcaggcgggtggcgcaccaatggcagacaataacgaa
60 ggcgccgacggagtggtgtaatgcctcaggaaattggcattgcgattccacatggctgggcgacagagtcaccaccagca
cccgaacatgggccttggccacctataacaaccacctctacaagcaaatctcagtgcttcgacgggggccaacgacaac
ccactactcggctacagcaccctcgggggtatttggacttaacagattcactgccactttcaccacgtgactggcagcgac
65 tcatcaacaataactggggattccggccaagagactcagctcaagctcttcaacatccaggtcaaggaggtcacgacgaatg

atggcgtcacaaccatc gctaataaccttaccagcacgggtcaagtcttctcggactcggagtaccagcttccgtacgtcctcgg
 ctctgcgcaccagggctgcctccctccgttcccggcggacgtgttcatgattccgcaatacggctacctgacgctcaacaatgg
 5 cagccaagccgtgggacgttcatcctttactgcctggaatattcccttctcagatgctgagaacgggcaacaactttaccttcag
 ctacacctttgaggaaagtgcctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatc gatca
 10 atacctgtattacctgaacagaactcaaaatcagtcgggaagtgcccaaaacaaggacttgcctgttta gccgtgggtctccagct
 ggcatgtctgttcagccaaaaactggctacctggaccctgttatcggcagcagcgcgttctaaaacaaaaacagacaacaac
 aacagcaattttacctggactggctcctcaaaatataacctcaatgggcgtgaatccatcatcaacctggcactgctatggcctc
 15 acacaaagacgacgaagacaagttcttcccatgagcgggtgcatgattttggaaaagagagcggcggagcttcaaacactgc
 attggacaatgcatgattacggacgaagaggaaattaa gccactaacctgtggccaccgaaagattgggaccgtggcag
 20 tcaatttcagagcagcagcacagacctgcgaccggagatgtgcatgctatgggagcattacctggcatggtgtggcaagat
 agagacgtgtacctgcagggtcccatttgggccaaaattcctcacacagatggacacttcaccctctctcttatggcggcctt
 tggactcaagaaccgcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctccggcggagtttcagctacaag
 25 tttgcttattcatcactcaatactccacaggacaagtgagcgtggaaattgaatgggagctgcagaaaagaaacagcaaacgc
 tggaatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctgccaacggtgatttactgtggacaacaatggactttatactgag
 cctcgcctcattggcacccgttacctcaccctcccctgtaa;

SM_10-8 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 31):

| MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
 GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA EF
 QERLKEDTSFGGNLGRAVFAQAKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD
 40 SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
 GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK
 45 QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRL
KFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
 ADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
 50 HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTDTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR
 NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHK
 55 DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSDVIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL
 QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLVQGIWAKIPHTDGHFHPSPLMG
 GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 60 KRWNPEVQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL;

65

SM 10-8 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 39):

5 | atggctgccgatgggtatcttccaagattggctcggaggacactctctgaaggaataagacagtgggtggaagctcaa
 10 | acctggcccaccaccacaaagcccgcagagcggcataaggacgacagcaggggtcttggcttctgggtacaagtacctc
 15 | ggaccctcaacggactc gacaaggagagccgggtcaacgaggcagacgccgcggccctcggagcacgacaaa gcctatg
 20 | accggcagctc gacagcggagacaacccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagtccaggagcgccttaagaag
 25 | atactgtctttggggcaacctcggacgagcagcttccaggcgaaaaagagggttcttgaacctctggcctggtgaggaac
 30 | ctgttaagacggctccgggaaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctcgggaaccggaaaagg
 35 | cgggccagcagcctcgaagaaaaagattgaatttggtcagactggagacgcagactcagctacatccccagcctctcggg
 40 | cagccaccagcagccccctctggtctgggaactaatac gatggctacaggcagtgccgcaccaatggcagacaataacgag
 45 | ggcgccgacggagtgggtaattctcgggaaattggcattgcgattccacatggatggcgacagagtcaccaccagca
 50 | cccgaacctgggccctgccacctacaacaaccacctctacaacaaattccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcac
 55 | tactttgctacagcacccttgggggtatttggactcaacagattccactgccactttaccacgtgactggcaaagactcacc
 60 | aacaacaactggggattccgaccaagagactcaagttcaagctcttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacggt
 65 | acgacgacgattgccaataacctaccagcacggttcaggtgttactgactcggagtagaccagctccgtagtctcggctcgg
 70 | cgcacaaaggatgcctcccgcgttccagcagacgtctcatggtgccacagtatggatacctcaccctgaacaacgggagt
 75 | caggcagtaggacgctcttcttactgcctggagtagtcttctctcagatgctgcgtaccgtaacaactttaccttcagctaca
 80 | ctttgaggacgttcttccacagcagctacgctcagccagagctctggaccgtctcatgaatcctctcaccagctacctg
 85 | tattacttgagcagaacagacactccaagtggaaaccaccacgcagtcgaaggcttcagtttctcaggccggagcagtgacatt
 90 | cgggaccagctaggaactggttctcggaccctgttaccgccagcagcagatcaaaagacatctcgggataacaacaacag
 95 | tgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaatccgggccccggccatggcaagcc
 100 | acaaggacgatgaagaaaagttttctcagagcgggggttctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggaca
 105 | ttgaaaaggctcatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatcccgtggctacggagcagtatggttctgtatctacca
 110 | acctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaagggcgttcttccaggcatggtctggcaggaca
 115 | gagatgtgtaccttcaggggccatctgggcaaaagattccacacacggacggacatttaccacctctcccctcatgggtggatt
 120 | cggacttaaacacctctccacagattctcatcaagaacacccccgtacctcgaatcctcaccacctcagtgccggcaaa
 125 | gtttcttctctcatcacacagtactccacgggacaggtcagcgtggagatcagtgaggagctgcagaaggaaaacagcaaac
 130 | gctggaatcccgaagttcagctacactccaactacaacaagtctgtaaatgtggacttactgtggacactaatggcgtgtattcag
 135 | agcctcggccccattggcaccagatactgactcgtaatctgtaa;

60 | SM 100-3 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 32):

65 | | MAADGYLPDWLEDLSEGLRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
 70 | GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF
 75 | QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD

SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDANSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
 GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYK
 5 QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRL
 KFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
 10 ADVFMVPQYGYLTLNNGSRAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVFP
 HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTDTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR
 15 NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHK
 DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL
 QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMG
 20 GFGLKHPPPQILIKNTPPANPSTTFSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 KRWNPEVQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYTEPRPIGTRYLTRNL;

25 SM 100-3 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 40):

] atggctgccgatggttatctccagattggctcgaggacactctctctgaaggaaagacagtggtggaagctcaa
 acctggcccaccaccaccaaagcccgcagagcggcataaggacgacagcaggggtcttgtgcttctgggtacaagtacctc
 30 ggaccttcaacggactcgacaagggagagccggcaacgaggcagacgccggggccctcgagcacgacaaaagcctatg
 accggcagctcgacagcggagacaaccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagttcaggagcgccttaaagaag
 35 atactgttttgggggcaacctcggacgagcagctctccaggcgaagaaagaggggtcttgaacctctgggcctggttagggaac
 ctgttaagacggctccgggaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctgggaaccggaaagg
 cgggccagcagcctgcaagaaaaagattgaatttggtcagactggagacgaaactcagctctgacccccagcctctcgga
 40 cagccaccagcagccccctctggtctgggaactaatacgtatggctacaggcagtggcgcaccaatggcagacaatac gag
 ggcgccgacggagtgggtaattcctcgggaaattggcattgcgattccacatggatgggcgacagagtcaccaccagca
 45 cccgaacctgggccctgccacctacaacaaccacctctacaacaaattccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcac
 tactttggctacagcacccttgggggtatttggacttcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcaaagactcacc
 aacaacaactggggattccgacccaagagactcaagtcaagctcttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacggt
 50 acgacgacgattccaataaccttaccagcacggtcagtggttactgactcggagtaccagctcccgtactcctcggctcg
 gcgcatcaaggatgcctcccgccgtcccagcagactcttcatggtgccacagtatggatacctcaccctgaacaacgggag
 55 tcgggcagtaggacgctcttacttactgctggagacttctctcagatgctgcgtaccggtacaactttacctcagctac
 acttttggagacgttcttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcaccgaccagctac
 gtattacttgagcagaacagacactccaagtggaccaccacgcagtcaggctcagtttctcagccggagcggagtacat
 60 tcgggaccagctaggaactggcttctggaccctgttaccgccaagcagcagatcaaaagacatctcgggataacaacaaca
 gtgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaatccggggcccgccatggcaagc
 65 cacaaggacgatgaagaaaagtffffctcagagcgggggtctcatcttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggac

attgaaaaggatgattacagacgaagaggaaatcaggacgaccaatcccgtggctacggagcagatggttctgtatctacc
 aacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgcagatgtcaacacacaaggcgttctccaggcatggtctggcaggac
 5 agagatgtgtacctcaggggccatctgggcaagattccacacacggacggacatttcacccctctcccctcatgggtgga
 ttggacttaaacacctctccacagattctcatcaagaacaccccgtacctgcgaatcttcgaccacctcagtgccggcaa
 10 agtttcttctctcatcacacagtactccacgggacaggtcagcgtggagatcgagtgaggagctgcagaaggaaaacagcaaa
 cgctggaatcccgaagtcagtacttccaactacaacaagtctgtaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgtataca
 gagcctcgcgccattggcaccagatacctgactcgtaatctgtaa;

SM 100-10 (secuencia de aminoácidos) (SEQ ID NO: 33):

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLP
 20 GYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA
 EFERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPD
 25 SSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGS
 GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYK
 30 QISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF
 RPKRLKFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFP
 ADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
 35 HSSYAHSQSLDRMLNPLIDQYLYLSRTDAPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSR
 NWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPAMASHK
 40 DDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNL
 QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMG
 45 GFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS
 KRWNPEVQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL;

SM 100-10 (secuencia de nucleótidos) (SEQ ID NO: 41):

atggctgccgatggttatcttccagattggctcaggacactctctgaaggaataagacagtggggaagctcaa
 50 acctggcccaccaccacaaagcccgcagagcggcagacagcagcaggggtcttgcttctgggtacaagtacctc
 ggaccctcaacggactcgacaaggagagccggcgaacgaggcagacgccgcggccctcagacacgacaaaagcctatg
 55 accggcagctcgacagcggagacaaccgtacctcaagtacaaccacgccgacgcggagttcaggagcgccttaagaag
 atacgtcttttgggggcaacctcggacgagcagcttccaggcgaaaaagagggttcttgacctctggcctggttaggaac
 60 ctgtaagacggctccgggaaaaagaggccggtagagcactctctgtggagccagactcctcctcgggaaccggaaagg
 cgggtcagcagcctgcaagaaaaagattgaatttggcagactggagacgcagactcagctcagccccagcctctcggga
 65 cagccaccagcagccccctctggtctgggaactaacatgatggctacaggcagtgccgcaccaatggcagacaataacgag
 ggcgccgacggagtggttaattctcgggaaattgcattgcattccacatggatggcgacagagtcaccaccagca

cccgaacctggccctgccacactacaacaaccacctacaaaacaaattccagccaatcaggagcctcgaacgacaatcac
 tactttggctacagcacccttgggggtattttgacttcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcaagactcatc
 5 aacaacaactggggattccgacccaagagactcaagttcaagctctttaacattcaagtcaaagaggtcacgcagaatgacggg
 acgacgacgattgccaataacctaccagcacggttcaggtgttactgactcggagtaccagctcccgtacgtcctcggctcg
 10 gcgcatcaaggatgcctcccggcgttcccagcagacgtcttcatggtgccacagfatggatacctcacctgaacaacggggag
 tcaggcagtaggacgctcttattttactgcctggagtactttccttctcagatgctgcgtaccggtaacaactttaccttcagctac
 15 acttttgaggacgttccfttccacagcagctacgctcacagccagagtctggaccgtctcatgaatcctctcatcgaccagtacct
 gtattacttgagcagaacagacgctccaagtgggaaccaccacgcagtcaaggcttcagttttctcaggccggagcagtgacat
 tcgggaccagctaggaactggcttctgaccctgttaccgccagcagcagatcaaaagacatctcgggataacaacaaca
 20 gtgaatactcgtggactggagctaccaagtaccacctcaatggcagagactctctggtgaatccggggcccgccatggcaagc
 cacaaggacgatgaagaaaagtftttctcagagcgggggttctcatctttgggaagcaaggctcagagaaaacaagtgtggac
 25 attgaaaaggatgattacagacgaagaggaaatcaggacaaccaatcccgtggctacggagcagtatggttctgtatctacc
 aacctccagagaggcaacagacaagcagctaccgagatgtcaacacacaaggcgttcttccagcagtgctcggcaggac
 agagatgtgtacctcagggggcccatctgggcaaaagattccacacacggacggacattttcacccctctcccctcatgggtgga
 30 ttcggacttaaacacctctccacagattctcatcaagaacaccccggtacctgcgaatccttcgaccacctcagtgcgggcaa
 agtttgcttctcctcacacagctactccacgggacaggtcagcgtggagatcagtgaggagctgcagaagaaaacagcaaa
 35 cgctggaatcccgaagttcagctacttccaactacaacaagtctgtaatgtggactttactgtggacactaatggcgtgtattca
 gagcctcggcccattggcaccagatacctgactcgtaatctgtaa.

Ácidos nucleicos y células huésped

La presente descripción proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de la cápside de VAA variante (como se describió anteriormente), así como también células huésped que comprenden un ácido nucleico objeto. Los ácidos nucleicos y las células huésped son útiles para generar viriones VAAR (como se describe más abajo).

La presente descripción proporciona células huésped, por ejemplo, células huésped aisladas, que comprenden un ácido nucleico objeto. Una célula huésped objeto puede denominarse "célula huésped modificada genéticamente" y típicamente es una célula aislada, por ejemplo, una célula en cultivo *in vitro*. Una célula huésped objeto es útil para producir un virión de VAAR objeto, como se describe más abajo. Cuando una célula huésped objeto se usa para producir un virión de VAAR objeto, se denomina "célula de empaquetamiento." En algunas modalidades, una célula huésped objeto se modifica genéticamente de forma estable (es decir, se transfecta de forma estable) con un ácido nucleico objeto. En otras modalidades, una célula huésped objeto se modifica genéticamente de forma transitoria (es decir, se transfecta transitoriamente) con un ácido nucleico objeto.

Un ácido nucleico objeto se introduce de forma estable o transitoria en una célula huésped, mediante el uso de técnicas establecidas, que incluyen, pero no se limitan a, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por liposomas y similares. Para la transformación estable, un ácido nucleico objeto generalmente incluirá además un marcador seleccionable, por ejemplo, cualquiera de varios marcadores seleccionables bien conocidos, tales como resistencia a neomicina y similares.

Una célula huésped objeto se genera introduciendo un ácido nucleico objeto en cualquiera de una variedad de células, por ejemplo, células de mamífero, incluidas, por ejemplo, células murinas y células de primates (por ejemplo, células humanas). Las células de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células primarias y líneas celulares, donde las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células 293, células COS, células HeLa, células Vero, fibroblastos de ratón 3T3, fibroblastos C3H10T1/2, células CHO y similares.

En algunas modalidades, una célula huésped objeto incluye, además de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside mutante, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas rep de VAA. En otras modalidades, una célula huésped objeto comprende además un vector VAAr, como se describe más abajo. Como se describe con más detalle más abajo, se genera un virión de VAAr mediante el uso de una célula huésped objeto.

Viriones de VAAr infecciosos

Un virión infeccioso de VAAr objeto comprende una proteína de la cápside de VAA variante y un ácido nucleico heterólogo (descrito con mayor detalle más abajo), y exhibe una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por un VAA de tipo salvaje (por ejemplo, VAA2 (tipo salvaje VAA serotipo 2)) o un VAA que comprende una proteína de la cápside de tipo salvaje. Por "resistencia aumentada" se entiende que un virión de VAAr infeccioso objeto exhibe una infectividad aumentada en presencia de anticuerpos contra VAA humanos. Como se describió anteriormente, la infectividad viral puede expresarse como la relación de partículas virales infecciosas a partículas virales totales. Por lo tanto, una infectividad aumentada significa una relación aumentada de partículas virales infecciosas con respecto al total de partículas virales. Para determinar la resistencia de un VAA a los anticuerpos contra VAA humanos, se mide la infectividad del VAA en presencia de diversas concentraciones de anticuerpos contra VAA humanos para obtener la concentración de anticuerpos (por ejemplo, concentración sérica, concentración de IgIV, etc.) (mg/mL) necesarios para reducir la eficiencia de la suministro de genes (es decir, la infectividad) al 50 % de la que se necesita en ausencia de anticuerpos humanos anti-VAA. Se dice que un virus que requiere una concentración de anticuerpo más alta para reducir la eficiencia de suministro de genes al 50 % en ausencia de anticuerpos humanos contra VAA tiene una mayor resistencia a la neutralización de anticuerpos. Por lo tanto, un aumento de dos veces en la resistencia significa un aumento de dos veces en la concentración de anticuerpo requerida para reducir la eficiencia de suministro de genes al 50 % de la que se obtiene en ausencia de anticuerpos humanos contra VAA. En algunas modalidades, un virión de VAAr infeccioso objeto exhibe al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 17 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, etc.) mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos que la resistencia exhibida por un VAA de tipo salvaje (por ejemplo, VAA2 (VAA de tipo salvaje serotipo 2)) o un VAA que comprende una proteína de la cápside de tipo salvaje.

Puede decirse que un virión de VAAr infeccioso objeto exhibe una transducción aumentada de células de mamífero en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos. En algunas modalidades, un virión de VAAr infeccioso objeto exhibe al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 17 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, etc.) mayor transducción de células de mamífero en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos que la transducción exhibida por un VAA de tipo salvaje (por ejemplo, VAA2 (serotipo de VAA de tipo salvaje 2)) o un VAA que comprende una proteína de la cápside de tipo salvaje.

En algunas modalidades, un virión de VAAr infeccioso objeto exhibe una unión disminuida a un anticuerpo neutralizante que se une a una proteína de la cápside de VAA de tipo salvaje. Por ejemplo, un virión de VAAr infeccioso objeto puede exhibir al menos aproximadamente 1,5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 12 veces, al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 17 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 200 veces, al menos aproximadamente 250 veces, al menos aproximadamente 300 veces, etc.) unión reducida (por ejemplo, afinidad reducida) a un anticuerpo neutralizante que se une a una proteína VAA de la cápside de tipo salvaje, en comparación con la afinidad de unión del anticuerpo a proteína de la cápside de VAA de tipo salvaje.

En algunos casos, un anticuerpo neutralizante contra VAA se une a un virión de VAAr infeccioso objeto con una afinidad de menos de aproximadamente 10^{-7} M, menos de aproximadamente 5×10^{-6} M, menos de

aproximadamente 10^{-6} M, menos de aproximadamente 5×10^{-5} M, menos de aproximadamente 10^{-5} M, menos de aproximadamente 10^{-4} M, o menor.

En algunos casos, un virión infeccioso VAAr exhibe un aumento *in vivo* del tiempo de residencia en comparación con un VAA de tipo salvaje. Por ejemplo, un virión de VAAr infeccioso objeto exhibe un tiempo de residencia que es al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 25 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 100 %, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces o más, más largo que el tiempo de residencia de un VAA de tipo salvaje.

Se puede determinar si un virión de VAAr infeccioso objeto dado presenta una unión reducida a un anticuerpo neutralizante y/o una mayor resistencia a un anticuerpo neutralizante mediante el uso de cualquier ensayo conveniente conocido por un experto en la técnica.

En algunos casos, un virión de VAAr infeccioso comprende proteínas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 de tipo salvaje. En otros casos, un virión de VAAr infeccioso comprende, además de una o más proteínas de la cápside variantes, una o más mutaciones en una o más de las proteínas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40.

Ácidos nucleicos heterólogos

Una molécula de ADN heteróloga adecuada (también denominada en la presente descripción como "ácido nucleico heterólogo") para su uso en un vector de VAAr objeto (por ejemplo, un virión de VAAr infeccioso objeto) puede ser cualquier ácido nucleico heterólogo. En algunas modalidades, el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido (por ejemplo, una proteína que imparte alguna característica deseada a la célula diana, por ejemplo, una proteína fluorescente que permite el seguimiento celular, una enzima que proporciona una actividad ausente o alterada en la célula diana, etc.). En algunas modalidades, el ácido nucleico heterólogo comprende un agente de interferencia de ARN (como se definió anteriormente).

Un ácido nucleico heterólogo objeto generalmente tendrá un tamaño menor de aproximadamente 5 kilobases (kb) e incluirá, por ejemplo, un gen (una secuencia de nucleótidos) que codifica una proteína que está defectuosa o falta en un individuo receptor o célula diana; un gen que codifica una proteína que tiene un efecto biológico o terapéutico deseado (por ejemplo, una función antibacteriana, antiviral o antitumoral/anticancerosa); una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN que inhibe o reduce la producción de una proteína deletérea o no deseada (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica un agente de interferencia de ARN, como se define anteriormente); y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína antigénica.

Los ácidos nucleicos heterólogos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que codifican proteínas usadas para el tratamiento de trastornos endocrinos, metabólicos, hematológicos, cardiovasculares, neurológicos, musculoesqueléticos, urológicos, pulmonares e inmunitarios, incluyendo trastornos tales como enfermedades inflamatorias, autoinmunitarias, crónicas y enfermedades infecciosas, como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, hipercolestemia, enfermedades de almacenamiento lisosómico como deficiencia de activador/gangliosidosis GM2, alfa-manosidosis, aspartilglucosaminuria, enfermedad por almacenamiento de éster de colesterol, deficiencia crónica de hexosaminidasa A, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, Enfermedad de Farber, Fucosidosis, Galactosialidosis, Enfermedad de Gaucher, Gangliosidosis GM1, Enfermedad de células I/Mucopolipidosis II, Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico libre infantil/ISSD, Deficiencia de hexosaminidasa A juvenil, Enfermedad de Krabbe, Deficiencia de lipasa ácida lisosómica, Leucodistrofia metacromática, trastornos mucopolisacáridos (incluido polidistrofia Pseudo-Hurler/mucopolipidosis IIIA, síndrome de Hurler MPSI, síndrome de Scheie MPSI, síndrome de Hurler-Scheie MPS I, síndrome de Hunter MPS II, síndrome de Sanfilippo tipo A/MPS III A, síndrome de Sanfilippo tipo B/MPS III B, síndrome de Sanfilippo tipo C/MPS III C, síndrome de Sanfilippo tipo D/MPS III D, Morquio tipo A/MPS IVA, Morquio tipo B/MPS IVB, MPS IX Deficiencia de hialuronidasa, MPS VI Maroteaux-Lamy, MPS VII Síndrome de Sly, Mucopolipidosis I/Sialidosis, Mucopolipidosis IIIC y Mucopolipidosis tipo IV), Deficiencia de sulfatasa múltiple, Enfermedad de Niemann-Pick, Lipofuscinosis neuronal Ceroid, Enfermedad de Pompe/Enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, Picnodisostosis, Enfermedad de Sandhoff/Inicio en la edad adulta/Gangliosidosis GM2, Enfermedad de Sandhoff/gangliosidosis GM2 - Infantil, Enfermedad de Sandhoff/Gangliosidosis GM2 - Juvenil, enfermedad de Schindler, enfermedad de Salla/enfermedad por almacenamiento de ácido siálico, gangliosidosis de Tay-Sachs/GM2 y enfermedad de Wolman, trastornos de la insulina como diabetes, trastornos del crecimiento, diversos trastornos de la sangre que incluyen diversas anemias, talasemias y hemofilia; defectos genéticos tales como fibrosis quística, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), enfisema o similares.

Los ácidos nucleicos heterólogos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los que codifican cualquiera de una variedad de proteínas, que incluyen, pero no se limitan a: un interferón (por ejemplo, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IFN- ω ; IFN- τ); una insulina (por ejemplo, Novolin, Humulin, Humalog, Lantus, Ultralente, etc.); una eritropoyetina ("EPO"; por ejemplo, Procrit®, Eprex® o Epogen® (epoetina- α); Aranesp® (darbepoyetina- α); NeoRecormon®, Epogin® (epoetina- β); y similares); un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) (por ejemplo, Rituxan® (rituximab); Remicade® (infliximab); Herceptin® (trastuzumab); Humira™ (adalimumab); Xolair® (omalizumab); Bexxar®

(tositumomab); Raptiva™ (efalizumab); Erbitux™ (cetuximab); Avastin® (bevacizumab); y similares), incluido un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, Lucentis® (ranibizumab)); un factor sanguíneo (por ejemplo, Activase® (alteplasa) activador de plasminógeno tisular; NovoSeven® (factor VIIa humano recombinante); Factor VIIa; Factor VIII (por ejemplo, Kogenate®); Factor IX; β-globina; hemoglobina; y similares); un factor estimulante de colonias (por ejemplo, Neupogen® (filgrastim; G-CSF); Neulasta (pegfilgrastim); factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de megacariocitos; y similares); una hormona del crecimiento (por ejemplo, una somatotropina, por ejemplo, Genotropin®, Nutropin®, Norditropin®, Saizen®, Serostim®, Humatrope®, etc.; una hormona del crecimiento humana; y similares); una interleucina (por ejemplo, IL-1; IL-2, que incluye, por ejemplo, Proleukin®; IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9; etc.); un factor de crecimiento (por ejemplo, Regranex® (beclapernin; PDGF); Fiblast® (trafermin; bFGF); Stemgen® (ancestim; factor de células madre); factor de crecimiento de queratinocitos; un factor de crecimiento de fibroblastos ácido, un factor de células madre, un fibroblasto básico factor de crecimiento, factor de crecimiento de hepatocitos y similares); un receptor soluble (por ejemplo, un receptor soluble de unión a TNF-α tal como Enbrel® (etanercept); un receptor de VEGF soluble; un receptor de interleucina soluble; un receptor de células T γ/δ soluble; y similares); una enzima (por ejemplo, α-glucosidasa; Cerazyme® (imiglucarase; β-glucocerebrosidasa, Ceredase® (alglucerasa); un activador enzimático (por ejemplo, activador de plasminógeno tisular); una quimiocina (por ejemplo, IP-10; Mig; Groα/IL-8, RANTES; MIP-1α; MIP-1β; MCP-1; PF-4; y similares); un agente angiogénico (por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); un agente antiangiogénico (por ejemplo, un soluble Receptor VEGF); una vacuna proteica; un péptido neuroactivo como bradiconina, colecistoquinina, gastina, secretina, oxitocina, hormona liberadora de gonadotropina, beta-endorfina, encefalina, sustancia P, somatostatina, prolactina, galanina, hormona liberadora de hormona del crecimiento, bombesina, dinorfina, neurotensina, motilina, tirotropina, neuropéptido Y, hormona luteinizante, calcitonina, insulina, glucagón, vasopresina, angiotensina II, hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo, péptido del sueño, etc.; otras proteínas tales como un agente trombolítico, un péptido natriurético auricular, proteína morfogénica ósea, trombopoyetina, relaxina, fibrilación glial proteína ácida lary, hormona estimulante del folículo, una alfa-1 antitripsina humana, un factor inhibidor de la leucemia, un factor de crecimiento transformante, un factor de crecimiento similar a la insulina, una hormona luteinizante, un factor de activación de macrófagos, factor de necrosis tumoral, un factor quimiotáctico de neutrófilos, un factor de crecimiento nervioso; un inhibidor tisular de metaloproteinasas; un péptido intestinal vasoactivo, angiogenina, angiotropina, fibrina; hirudina; un factor inhibidor de la leucemia; un antagonista del receptor de IL-1 (por ejemplo, Kineret® (anakinra)); un canal iónico, por ejemplo, regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR); distrofina; utrofina, un supresor de tumores; α-glucosidasa ácida de la enzima lisosómica (GAA); y similares. Los ácidos nucleicos adecuados también incluyen aquellos que codifican un fragmento funcional de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente; y ácidos nucleicos que codifican variantes funcionales de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente.

Los ácidos nucleicos heterólogos adecuados también incluyen aquellos que codifican proteínas antigénicas. Un vector de VAAr objeto que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína antigénica es adecuado para estimular una respuesta inmunitaria a la proteína antigénica en un huésped mamífero. La proteína antigénica se deriva de un autoantígeno, un alérgeno, un antígeno asociado a un tumor/cáncer, un virus patógeno, una bacteria patógena, un protozoo patógeno, un helminto patógeno o cualquier otro organismo patógeno que infecte a un huésped mamífero. Como se usa en la presente, el término "un ácido nucleico que codifica una proteína antigénica derivada de" incluye ácidos nucleicos que codifican proteínas antigénicas de tipo salvaje, por ejemplo, un ácido nucleico aislado de un virus patógeno que codifica una proteína viral; ácidos nucleicos sintéticos generados en el laboratorio que codifican proteínas antigénicas que son idénticas en secuencia de aminoácidos a una proteína antigénica de origen natural; ácidos nucleicos sintéticos generados en el laboratorio que codifican proteínas antigénicas que difieren en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, de un aminoácido a aproximadamente 15 aminoácidos) de una proteína antigénica de origen natural, pero que, no obstante, inducen una respuesta inmunitaria a la correspondiente proteína antigénica de origen natural; ácidos nucleicos sintéticos generados en el laboratorio que codifican fragmentos de proteínas antigénicas (por ejemplo, fragmentos de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos, cuyos fragmentos comprenden uno o más epítopos antigénicos), cuyos fragmentos inducen una respuesta inmunitaria a la correspondiente proteína antigénica de origen natural; etc.

De manera similar, una proteína antigénica "derivada de" un autoantígeno, un alérgeno, un antígeno asociado a un tumor/cáncer, un virus patógeno, una bacteria patógena, un protozoo patógeno, un helminto patógeno o cualquier otro organismo patógeno que infecte a un huésped mamífero, incluye proteínas que son idénticas en la secuencia de aminoácidos a una proteína antigénica de origen natural y proteínas que difieren en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, de un aminoácido a aproximadamente 15 aminoácidos) de una proteína antigénica de origen natural, pero que no obstante inducen una respuesta inmunitaria a la correspondiente proteína antigénica de origen natural; y fragmentos de proteínas antigénicas (por ejemplo, fragmentos de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos, cuyos fragmentos comprenden uno o más epítopos antigénicos), cuyos fragmentos inducen una respuesta inmunitaria a la correspondiente proteína antigénica de origen natural.

En algunos casos, una respuesta inmunitaria a una proteína antigénica codificada por un vector objeto VAAr estimulará una respuesta inmunitaria protectora a un organismo patógeno que muestra la proteína antigénica o el

epítopo antigénico (o a una proteína o un epítopo que tiene una reactividad cruzada con la proteína antigénica o los epítomos antigénicos codificados por el VAAr) en el hospedero mamífero. En algunos casos, se inducirá una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) a la proteína antigénica codificada por VAAr en el huésped mamífero. En otros casos, se inducirá una respuesta humoral a la proteína antigénica codificada por VAAr en el huésped mamífero, de manera que se generen anticuerpos específicos para la proteína antigénica. En muchos casos, se inducirá en el huésped mamífero una respuesta inmunitaria TH1 a la proteína antigénica codificada por VAAr. Las proteínas antigénicas adecuadas incluyen antígenos asociados a tumores/cáncer, antígenos virales, antígenos bacterianos y antígenos protozoarios; y fragmentos antigénicos de los mismos. En algunos casos, la proteína antigénica se deriva de un patógeno intracelular. En otros casos, la proteína antigénica es un autoantígeno. En otros casos más, la proteína antigénica es un alérgeno.

Los antígenos específicos de tumor/cáncer incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los diversos MAGE (antígeno E asociado al melanoma), incluido MAGE 1 (por ejemplo, número de acceso del GenBank M77481), MAGE 2 (por ejemplo, número de acceso del GenBank U03735), MAGE 3, MAGE 4, etc.; cualquiera de las diversas tirosinasas; ras mutante; p53 mutante (por ejemplo, números de acceso del GenBank X54156 y AA494311); y antígeno de melanoma p97 (por ejemplo, número de acceso del GenBank M12154). Otros antígenos específicos de tumores/cáncer incluyen el péptido Ras y el péptido p53 asociados con cánceres avanzados, los antígenos HPV 16/18 y E6/E7 asociados con cánceres de cuello uterino, el antígeno MUC11-KLH asociado con carcinoma de mama (por ejemplo, número de acceso del GenBank J03651), CEA (antígeno carcinoembrionario) asociado con cáncer colorrectal (por ejemplo, número de acceso del GenBank X98311), gp100 (por ejemplo, número de acceso del GenBank S73003) o antígenos MART1 asociados con melanoma, y el antígeno PSA asociado con cáncer de próstata (por ejemplo, GenBank número de acceso X14810). La secuencia del gen p53 es conocida (véase, por ejemplo, Harris y otros (1986) Mol. Cell. Biol., 6:4650-4656) y está depositada en GenBank con el número de acceso M14694. Por tanto, las proteínas, ácidos nucleicos y/o viriones objeto pueden usarse como inmunoterapéuticos para cánceres que incluyen, pero no se limitan a, cánceres de cuello uterino, mama, colorrectal, próstata, pulmón y melanomas.

Los antígenos virales se derivan de agentes causales conocidos responsables de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, sarampión, paperas, rubéola, poliomielitis, hepatitis A, B (por ejemplo, número de acceso del GenBank E02707) y C (por ejemplo, número de acceso del GenBank E06890), así como también otros virus de la hepatitis, influenza, adenovirus (por ejemplo, tipos 4 y 7), rabia (por ejemplo, número de acceso del GenBank M34678), fiebre amarilla, encefalitis japonesa (por ejemplo, número de acceso del GenBank E07883), dengue (por ejemplo, número de acceso del GenBank M24444), hantavirus y virus de inmunodeficiencia humana (por ejemplo, número de acceso del GenBank U18552).

Los antígenos bacterianos y parasitarios adecuados incluyen aquellos derivados de agentes causales conocidos responsables de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, difteria, tosferina (por ejemplo, número de acceso del GenBank M35274), tétanos (por ejemplo, número de acceso del GenBank M64353), tuberculosis, neumonías bacterias y fúngicas (por ejemplo, Haemophilus influenzae, Pneumocystis carinii, etc.), cólera, fiebre tifoidea, peste, shigelosis, salmonelosis (por ejemplo, número de acceso del GenBank L03833), legionariopatía, enfermedad de Lyme (por ejemplo, número de acceso del GenBank U59487), malaria (por ejemplo, número de acceso del GenBank X53832), anquilostoma, oncocercosis (por ejemplo, número de acceso del GenBank M27807), esquistosomiasis (por ejemplo, número de acceso del GenBank L08198), tripanosomiasis, leishmaniasis, giardiasis (por ejemplo, número de acceso del GenBank M33641), amebiasis, filariasis (por ejemplo, número de acceso del GenBank J03266), borreliosis y triquinosis.

Los ácidos nucleicos heterólogos adecuados que codifican productos génicos heterólogos incluyen ARN no traducidos, tales como un agente ARNi (como se describe con mayor detalle anteriormente) (por ejemplo, un ARN antisentido; un ARNi; un ARNhc; un ARN bicatenario (ARNbc); un Agente CRISPR, por ejemplo, una proteína Cas9 o similar a Cas9, un ARN similar a ARNcr, un ARN similar a ARNtracr, un ARN guía único y/o un polinucleótido donante; y similares), una ribozima, etc. Pueden usarse agentes de ARNi para inhibir la expresión génica. Algunos agentes de ARNi proporcionan una herramienta que puede usarse subsecuentemente para inhibir la expresión génica (por ejemplo, un agente CRISPR tal como una proteína cas9 o similar a cas9).

Los genes diana incluyen cualquier gen que codifique un producto génico diana (ARN o proteína) que sea perjudicial (por ejemplo, patológico), por ejemplo, un producto génico diana que no funcione correctamente (por ejemplo, debido a una mutación en la secuencia de la proteína codificada, debido a una mutación en las secuencias no codificantes que controlan el nivel de estado estable del producto génico, etc.). Los productos de genes diana incluyen, pero no se limitan a, huntingtina; virus de la hepatitis C; virus de inmunodeficiencia humana; proteína precursora de amiloide; tau; una proteína que incluye una repetición de poliglutamina; un virus del herpes (por ejemplo, varicela zoster); cualquier virus patológico; y similares.

Como tal, un VAAr objeto que incluye un ácido nucleico heterólogo que codifica un agente de ARNi es útil para tratar una variedad de trastornos y afecciones, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, una enfermedad por repetición de trinucleótidos, tal como una enfermedad asociada con repeticiones de poliglutamina, por ejemplo, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa, atrofia muscular espinal y bulbar

(SBMA), atrofia dentato rubro pálido luisiana (DRPLA), etc.; una patología adquirida (por ejemplo, una enfermedad o síndrome manifestado por un estado fisiológico, bioquímico, celular, estructural o biológico molecular anormal) tal como una infección viral, por ejemplo, hepatitis que ocurre o puede ocurrir como resultado de una infección por VHC, síndrome de inmunodeficiencia adquirido, que ocurre como resultado de una infección por VIH; cáncer; y similares.

En muchas modalidades, un ácido nucleico heterólogo que codifica un agente de ARNi está ligado operativamente a un promotor. Los expertos en la técnica conocen promotores adecuados e incluyen el promotor de cualquier gen que codifica una proteína, por ejemplo, un gen regulado endógenamente o un gen expresado constitutivamente. Por ejemplo, los promotores de genes regulados por eventos fisiológicos celulares, por ejemplo, choque térmico, niveles de oxígeno y/o niveles de monóxido de carbono, por ejemplo, en hipoxia, pueden ligarse operativamente a un ácido nucleico que codifica ARNip.

La secuencia de nucleótidos heteróloga seleccionada, tal como el ácido nucleico de interés o que codifica EPO, está operativamente ligada a elementos de control que dirigen la transcripción o expresión de la misma en la secuencia de nucleótidos. *in vivo*. Dichos elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado (por ejemplo, elementos de control celular endógenos). Alternativamente, pueden emplearse secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles incluyen generalmente aquellas derivadas de secuencias que codifican genes de mamíferos o virales. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano de SV40, el promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus del tumor mamario de ratón; promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP); un promotor del virus del herpes simple (HSV), un promotor celular endógeno que es heterólogo del gen de interés, un promotor del citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora temprana inmediata del CMV (CMVIE), un promotor del virus del sarcoma rous (RSV), sintético promotores, promotores híbridos y similares. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de la metalotioneína murina, también encontrarán uso en la presente descripción. Dichas secuencias promotoras están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Stratagene (San Diego, CA).

En algunas modalidades, el promotor específico del tipo celular o específico del tejido estará ligado operativamente al ácido nucleico heterólogo que codifica el producto génico heterólogo, de manera que el producto génico se produzca de forma selectiva o preferencial en un tipo(s) celular(es) o tejido(s) particular(es). En algunas modalidades, un promotor inducible estará ligado operativamente al ácido nucleico heterólogo.

Por ejemplo, los promotores inducibles y específicos de músculo, potenciadores y similares son útiles para la suministro de un producto génico a una célula muscular. Dichos elementos de control incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de las familias de genes de actina y miosina, tales como de la familia de genes myoD; el factor de unión potenciador específico de miocitos MEF-2; elementos de control derivados del gen de la actina esquelética humana y del gen de la actina cardíaca; elementos de la secuencia de la creatina quinasa muscular y el elemento potenciador de la creatina quinasa murina (mCK); elementos de control derivados del gen de la troponina C de contracción rápida esquelética, el gen de la troponina C cardíaca de contracción lenta y el gen de la troponina I de contracción lenta; factores nucleares inducibles por hipoxia; elementos y promotores inducibles por esteroides, tales como el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE); el elemento de consenso de fusión para la inducción de RU486; y elementos que proporcionan la expresión génica regulada por tetraciclina.

El vector de expresión de VAA que alberga la molécula de ADN de interés (el ADN heterólogo) unido por las ITR de VAA, puede construirse insertando directamente la secuencia o secuencias seleccionadas en un genoma de VAA que ha tenido los principales marcos de lectura abiertos de VAA ("ORF") extirpado de los mismos. También pueden eliminarse otras porciones del genoma de VAA, siempre que quede una porción suficiente de las ITR para permitir las funciones de replicación y empaquetamiento. Dichas construcciones pueden diseñarse mediante el uso de técnicas bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núm. 5,173,414 y 5,139,941; Publicaciones Internacionales núm. WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski y otros (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent y otros (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, BJ (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling y Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; y Zhou y otros (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

Alternativamente, las ITR de VAA pueden escindirarse del genoma viral o de un vector de VAA que contiene el mismo y fusionar 5' y 3' de una construcción de ácido nucleico seleccionada que está presente en otro vector mediante el uso de cualquier método conveniente conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, un enfoque adecuado usa técnicas de ligadura estándar, tales como las descritas en Sambrook y otros, *supra*. Por ejemplo, las ligaduras pueden realizarse en Tris-Cl 20 mM pH 7,5, MgCl 10 mM₂, DTT 10 mM, 33 µg/mL BSA, NaCl 10 mM-50 mM, y ATP 40 µM, 0,01-0,02 (Weiss) unidades de ADN ligasa T4 de 0 °C a 16 °C (para la ligadura del "extremo pegajoso") o 1 ATP mM, 0,3-0,6 (Weiss) unidades de ADN ligasa de T4 a 14 °C (para la ligadura de "extremos romos"). Las ligaduras intermoleculares de "extremos pegajoso" se realizan normalmente a concentraciones de ADN total de 30-100 µg/mL (concentración final total de 5-100 nM). Los vectores VAA que contienen ITR se han descrito en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,139,941. En particular, allí se describen varios vectores VAA que están disponibles en la American Type Culture Collection ("ATCC") con los números de acceso 53222, 53223,

53224, 53225 y 53226.

Adicionalmente, los genes quiméricos pueden producirse sintéticamente para incluir secuencias de ITR de VAA dispuestas en 5' y 3' de una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas. Pueden usarse codones preferidos para la expresión de la secuencia del gen quimérico en células de músculo de mamífero. La secuencia quimérica completa se ensambla a partir del solapamiento de oligonucleótidos preparados mediante métodos estándar. Ver, por ejemplo, Edge, Nature (1981) 292:756; Nambair y otros Science (1984) 223:1299; Jay y otros J. Biol. Chem. (1984) 259:6311.

10 Generación de viriones de VAAr infecciosos objeto

A modo de introducción, es típico emplear una célula huésped o "productora" para la replicación y empaquetamiento del vector VAAr. Dicha célula productora (normalmente una célula huésped de mamífero) generalmente comprende o se modifica para que comprenda varios tipos diferentes de componentes para la producción de VAAr. El primer componente es un genoma de vector viral adenoasociado recombinante (VAAr) (o "ProVector de VAAr") que puede ser replicado y empaquetado en partículas de vector por la célula de empaquetamiento huésped. El ProVector de VAAr normalmente comprenderá un polinucleótido heterólogo (o "transgén"), con el que se desea alterar genéticamente otra célula en el contexto de la terapia génica (ya que el empaquetamiento de dicho transgén en partículas de vector de VAAr puede usarse de manera efectiva para suministrar el transgén a una variedad de células de mamíferos). El transgén generalmente está flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de VAA que comprenden secuencias que se reconocen durante la escisión, replicación y empaquetamiento del vector de VAA, así como también durante la integración del vector en el genoma de una célula huésped.

Un segundo componente es un virus auxiliar que puede proporcionar funciones auxiliares para la replicación de VAA. Aunque comúnmente se emplea adenovirus, también pueden usarse otros virus auxiliares como se conoce en la técnica. Alternativamente, las funciones de virus auxiliares requeridas pueden aislarse genéticamente de un virus auxiliar y los genes codificantes pueden usarse para proporcionar funciones de virus auxiliares en trans. Los elementos del vector de VAA y el virus auxiliar (o funciones del virus auxiliar) pueden introducirse en la célula huésped de forma simultánea o secuencial en cualquier orden.

Los componentes finales para la producción de VAA que se proporcionarán en la célula productora son "genes de empaquetamiento de VAA" tal como los genes rep y cap de VAA que proporcionan proteínas de replicación y encapsidación, respectivamente. Se pueden proporcionar varias versiones diferentes de genes de empaquetamiento de VAA (incluidos casetes rep y cap unidos y casetes rep y/o cap separados en los que los genes rep y/o cap pueden dejarse bajo el control de los promotores nativos o ligado operativamente a promotores heterólogos. Dichos genes de empaquetamiento de VAA pueden introducirse de forma transitoria o estable en la célula de empaquetamiento huésped, como se conoce en la técnica y se describe con más detalle a continuación.

40 1. Vector VAAr

Un virión de VAAr objeto, que incluye el ADN heterólogo de interés (donde el "ADN heterólogo de interés" también se denomina como "ácido nucleico heterólogo" en la presente descripción), puede producirse mediante el uso metodológico estándar, conocida por los expertos en la técnica. Los métodos implican generalmente las etapas de (1) introducir un vector de VAAr objeto en una célula huésped; (2) introducir una construcción auxiliar de VAA en la célula huésped, donde la construcción auxiliar incluye regiones codificantes de VAA que se expresan en la célula huésped para complementar las funciones auxiliares de VAA que faltan del vector VAA; (3) introducir uno o más virus auxiliares y/o vectores de función accesoria en la célula huésped, en donde el virus auxiliar y/o vectores de función accesoria proporcionan funciones accesorias capaces de soportar la producción de virión VAA recombinante eficiente ("VAAr") en la célula huésped; y (4) cultivar la célula huésped para producir viriones VAAr. El vector de expresión VAA, construcción auxiliar VAA y el virus auxiliar o vector(es) de función accesoria pueden introducirse en la célula huésped ya sea simultáneamente o en serie, mediante el uso de técnicas de transfección estándar.

Los vectores de expresión de VAA se construyen mediante el uso de técnicas conocidas para proporcionar al menos como componentes ligados operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluyen una región de inicio de la transcripción, el ADN de interés y una región de terminación de la transcripción. Los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales en una célula de músculo de mamífero. La construcción resultante que contiene los componentes ligados operativamente está unida (5' y 3') con secuencias de ITR de VAA funcionales.

Las secuencias nucleotídicas opcionales de las regiones ITR de VAA son conocidas. Ver, por ejemplo, Kotin, R. M. (1994) "Human Gene Therapy" 5:793-801; Berns, K. I. "Parvoviridae and their Replication" en Fundamental Virology, 2da Edición, (B. N. Fields y D. M. Knipe, editores.) para la secuencia de VAA-2. Las ITR de VAA usadas en los vectores de la invención no necesitan tener una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje y pueden alterarse, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos. Adicionalmente, los ITR de VAA pueden derivarse de cualquiera de varios serotipos de VAA, que incluyen, pero no se limitan a, VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-7, etc. Además, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un

vector de expresión de VAA no necesitan ser necesariamente idénticas o derivadas del mismo serotipo o aislado de VAA, siempre que funcionen según lo previsto, es decir, para permitir la escisión y el rescate de la secuencia de interés de un vector o genoma de la célula huésped, y para permitir la integración de la molécula de ADN en el genoma de la célula receptora cuando los productos del gen Rep de VAA están presentes en la célula. Las ITR permiten la replicación de la secuencia del vector en presencia de una mezcla apropiada de proteínas Rep. Las ITR también permiten la incorporación de la secuencia del vector en la cápside para generar una partícula de VAA.

Para producir viriones de VAAr, se introduce un vector de expresión de VAA en una célula huésped adecuada mediante el uso de técnicas conocidas, tal como por transfección. Generalmente, se conocen en la técnica varias técnicas de transfección. Ver, por ejemplo, Graham y otros (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook y otros (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis y otros (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu y otros (1981) *Gene* 13:197. Los métodos de transfección particularmente adecuados incluyen la coprecipitación con fosfato de calcio (Graham y otros (1973) *Virology*, 52:456-467), microinyección directa en células cultivadas (Capecchi, M.R. (1980) *Cell* 22: 479-488), electroporación (Shigekawa y otros (1988) *BioTechniques* 6:742-751), transferencia génica mediada por liposomas (Mannino y otros (1988) *BioTechniques* 6:682-690), transducción mediada por lípidos (Felgner y otros (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417), y suministro de ácido nucleico mediante el uso de microproyectiles de alta velocidad (Klein y otros (1987) *Nature* 327:70-73).

Para los propósitos de esta descripción, las células huésped adecuadas para producir viriones de VAAr incluyen microorganismos, células de levadura, células de insectos y células de mamíferos, que pueden usarse, o se han usado, como receptores de una molécula de ADN heteróloga. El término incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Por tanto, una "célula huésped" para producir viriones de VAAr generalmente se refiere a una célula que ha sido transfectada con una secuencia de ADN exógena. Las células de la línea celular humana estable, 293 (fácilmente disponibles a través de, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de acceso ATCC CRL1573) se usan en muchas modalidades. Particularmente, la línea celular humana 293 es una línea celular de riñón embrionario humano que se ha transformado con fragmentos de ADN de adenovirus tipo 5 (Graham y otros (1977) *J. Gen. Virol.* 36:59), y expresa los genes E1a y E1b de adenovirus (Aiello y otros (1979) *Virology* 94:460). La línea celular 293 se transfecta fácilmente y proporciona una plataforma particularmente conveniente en la que producir viriones VAAr.

2. Funciones auxiliares de VAA

Las células huésped que contienen los vectores de expresión de VAA descritos anteriormente deben volverse capaces de proporcionar funciones auxiliares de VAA con el fin de replicar y encapsidar las secuencias de nucleótidos flanqueadas por las ITR de VAA para producir viriones de VAAr. Las funciones auxiliares de VAA son generalmente secuencias codificantes derivadas de VAA que pueden expresarse para proporcionar productos génicos de VAA que, a su vez, funcionan en trans para la replicación productiva de VAA. Las funciones auxiliares de VAA se usan en la presente descripción para complementar las funciones de VAA necesarias que faltan en los vectores de expresión de VAA. Por lo tanto, las funciones auxiliares de VAA incluyen uno o ambos de los principales ORF de VAA, específicamente, las regiones codificantes rep y cap, u homólogos funcionales de las mismas. En el contexto de la presente descripción, las funciones de cap incluyen una o más proteínas de la cápside mutantes, en donde al menos una proteína de la cápside comprende al menos una mutación, como se describió anteriormente.

Por "región codificante de rep de VAA" se entiende la región reconocida en la técnica del genoma de VAA que codifica las proteínas de replicación Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40. Se ha demostrado que estos productos de expresión de Rep poseen muchas funciones, incluido el reconocimiento, la unión y el corte del origen de la replicación del ADN del VAA, la actividad de la helicasa del ADN y la modulación de la transcripción de los promotores del VAA (u otros heterólogos). Los productos de expresión de Rep se requieren colectivamente para replicar el genoma de VAA. Para una descripción de la región codificante de rep de VAA, véase, por ejemplo, Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. e Immunol.* 158:97-129; y Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801. Los homólogos adecuados de la región codificante de rep de VAA incluyen el gen rep del herpesvirus humano 6 (HHV-6) que también se sabe que media la replicación del ADN de VAA-2 (Thomson y otros (1994) *Virology* 204:304-311).

Las proteínas cap de VAA incluyen VP1, VP2 y VP3, en donde al menos una de VP1, VP2 y VP3 comprende al menos una mutación, como se describe anteriormente.

Las funciones auxiliares de VAA se introducen en la célula huésped transfectando la célula huésped con una construcción auxiliar de VAA antes o simultáneamente que la transfección del vector de expresión de VAA. Por lo tanto, las construcciones auxiliares de VAA se usan para proporcionar al menos una expresión transitoria de los genes rep y/o cap de VAA para complementar las funciones de VAA faltantes que son necesarias para la infección por VAA productiva. Las construcciones auxiliares de VAA carecen de ITR de VAA y no pueden replicarse ni empaquetarse por sí mismas. Estas construcciones pueden estar en forma de plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varias construcciones auxiliares de VAA, tales como los plásmidos pVAA/Ad y pIM29+45 usados comúnmente que codifican productos de expresión tanto Rep como Cap. Ver por ejemplo,

Samulski y otros (1989) *J. Virol.* 63:3822-3828; y McCarty y otros (1991) *J. Virol.* 65:2936-2945. Se han descrito varios otros vectores que codifican productos de expresión Rep y/o Cap. Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núm. 5,139,941.

5 Tanto los vectores de expresión de VAA como las construcciones auxiliares de VAA pueden construirse para contener uno o más marcadores seleccionables opcionales. Los marcadores adecuados incluyen genes que confieren resistencia o sensibilidad a los antibióticos, imparten color o cambian las características antigénicas de aquellas células que han sido transfectadas con una construcción de ácido nucleico que contiene el marcador seleccionable cuando las células crecen en un medio selectivo apropiado. Varios genes marcadores seleccionables que son útiles en la práctica de los métodos de la descripción incluyen el gen de resistencia a la higromicina B (que codifica la aminoglucósido fosfotransferasa (APH)) que permite la selección en células de mamífero al conferir resistencia a la higromicina; el gen de la neomicina fosfotransferasa (que codifica la neomicina fosfotransferasa) que permite la selección en células de mamífero al conferir resistencia a G418; y similares. Los expertos en la técnica conocen otros marcadores adecuados.

15

3. Funciones de los accesorios VAA

La célula huésped (o célula de empaquetamiento) también debe volverse capaz de proporcionar funciones no derivadas de VAA, o "funciones accesorias", para producir viriones de VAAr. Las funciones accesorias son funciones virales y/o celulares no derivadas de VAA de las que VAA depende para su replicación. Por lo tanto, las funciones accesorias incluyen al menos aquellas proteínas y ARN que no son de VAA que se requieren en la replicación de VAA, incluidas las implicadas en la activación de la transcripción del gen de VAA, empalme de ARNm de VAA específico de etapa, replicación de ADN de VAA, síntesis de productos de expresión de Cap y ensamblaje de la cápside de VAA. Las funciones accesorias basadas en virus pueden derivarse de cualquiera de los virus auxiliares conocidos.

25

Particularmente, las funciones accesorias pueden introducirse y luego expresarse en las células huésped mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Comúnmente, las funciones accesorias se proporcionan mediante la infección de las células huésped con un virus auxiliar no relacionado. Se conocen varios virus auxiliares adecuados, incluidos los adenovirus; virus del herpes tal como los virus del herpes simple de tipos 1 y 2; y virus vaccinia. Las funciones accesorias no virales también encontrarán uso en la presente descripción, tales como las proporcionadas por la sincronización celular mediante el uso de cualquiera de los diversos agentes conocidos. Ver, por ejemplo, Buller y otros (1981) *J. Virol.* 40:241-247; McPherson y otros (1985) *Virology* 147:217-222; Schlehofer y otros (1986) *Virology* 152:110-117.

35

Alternativamente, las funciones accesorias pueden proporcionarse mediante el uso de un vector de funciones accesorias. Los vectores de funciones accesorias incluyen secuencias de nucleótidos que proporcionan una o más funciones accesorias. Un vector de función accesoria es capaz de introducirse en una célula huésped adecuada con el fin de apoyar la producción eficiente del virión VAA en la célula huésped. Los vectores de funciones accesorias pueden estar en forma de plásmido, fago, transposón, cósmido u otro virus. Los vectores accesorios también pueden estar en forma de uno o más fragmentos de ADN o ARN linealizados que, cuando se asocian con los elementos de control y enzimas apropiados, pueden transcribirse o expresarse en una célula huésped para proporcionar funciones accesorias.

40

Las secuencias de ácido nucleico que proporcionan las funciones accesorias pueden obtenerse de fuentes naturales, tales como el genoma de una partícula de adenovirus, o construirse mediante el uso de métodos recombinantes o sintéticos conocidos en la técnica. Con respecto a esto, las funciones accesorias derivadas de adenovirus se han estudiado ampliamente y se han identificado y caracterizado parcialmente varios genes de adenovirus implicados en funciones accesorias. Ver, por ejemplo, Carter, B.J. (1990) "Adeno-Associated Virus Helper Functions", en *CRC Handbook of Parvoviruses*, volumen I (P. Tijssen, editor), y Muzyczka, N. (1992) *Curr. Topics. Microbiol. and Immun.* 158:97-129. Específicamente, se cree que las regiones de genes adenovirales tempranos E1a, E2a, E4, ARN VAI y, posiblemente, E1b participan en el proceso accesorio. Janik y otros (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1925-1929. Se han descrito funciones accesorias derivadas de herpesvirus. Ver, por ejemplo, Young y otros (1979) *Prog. Med. Virol.* 25:113. También se han descrito funciones accesorias derivadas del virus Vaccinia. Ver, por ejemplo, Carter, B.J. (1990), *supra.*, Schlehofer y otros (1986) *Virology* 152:110-117.

55

Como consecuencia de la infección de la célula huésped con un virus auxiliar, o la transfección de la célula huésped con un vector de función accesoria, se expresan funciones accesorias que transactivan la construcción auxiliar de VAA para producir proteínas Rep y/o Cap de VAA. Los productos de expresión de Rep escinden el ADN recombinante (incluido el ADN de interés, por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo) del vector de expresión de VAA. Las proteínas Rep también sirven para duplicar el genoma de VAA. Las proteínas Cap expresadas se ensamblan en cápsides y el genoma de VAA recombinante se empaqueta en las cápsides. Por lo tanto, se produce una replicación productiva de VAA y el ADN se empaqueta en viriones de VAAr.

60

Después de la replicación de VAA recombinante, los viriones de VAAr pueden purificarse de la célula huésped mediante el uso de una variedad de métodos de purificación convencionales, tales como gradientes de CsCl.

65

Además, si se emplea una infección para expresar las funciones accesorias, el virus auxiliar residual puede inactivarse mediante el uso de métodos conocidos. Por ejemplo, el adenovirus puede inactivarse calentando a temperaturas de aproximadamente 60 °C durante, por ejemplo, 20 minutos o más. Este tratamiento inactiva de manera efectiva sólo el virus auxiliar ya que el VAA es extremadamente estable al calor mientras que el adenovirus auxiliar es termolábil.

Los viriones de VAAr resultantes están entonces listos para su uso para la suministro de ADN, como en aplicaciones de terapia génica, o para la suministro de un producto génico a un huésped mamífero.

Suministro de un ácido nucleico heterólogo

La presente descripción proporciona además métodos para suministrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana y/o a un individuo que lo necesite. En algunas modalidades, un individuo que lo necesita es un ser humano que ha estado previamente expuesto de forma natural a VAA y, como resultado, alberga anticuerpos anti-VAA (es decir, anticuerpos neutralizantes de VAA). Según los resultados positivos de los ensayos clínicos que implican el suministro de genes VAA, por ejemplo, en el hígado, el músculo y la retina (todos los tejidos afectados por anticuerpos neutralizantes contra este vehículo), existen muchas aplicaciones terapéuticas/enfermedades dianas de este tipo.

Un método objeto generalmente implica: (i) administrar una cantidad efectiva de un virión de VAAr objeto a un individuo, y/o (ii) poner en contacto una célula diana con un virión objeto. Generalmente, los viriones VAAr se administran a un sujeto mediante el uso de técnicas de transducción ya sea, *in vivo* ("directo") o *in vitro* ("indirectas"). Si se transduce *in vitro* ("indirectamente"), una célula receptora deseada (es decir, "célula diana") puede obtenerse del individuo, transducirse con viriones VAAr y reintroducirse en el individuo. Alternativamente, pueden usarse células singénicas o xenogénicas cuando esas células no generarán una respuesta inmunitaria inapropiada en el individuo.

Se han descrito métodos adecuados para el suministro e introducción de células diana transducidas en un individuo. Por ejemplo, las células pueden transducirse *in vitro* combinando viriones de VAA recombinantes con células, por ejemplo, en medios apropiados, y rastreando aquellas células que albergan el ADN de interés mediante el uso de técnicas convencionales tales como transferencias Southern y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. A continuación, las células transducidas pueden formularse en composiciones farmacéuticas, que se describen con más detalle más abajo, y la composición puede introducirse en el sujeto mediante diversas técnicas, tales como inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal.

Para *in vivo* (es decir, suministro "directa"), los viriones de VAAr se formularán en composiciones farmacéuticas y generalmente se administrarán por vía parenteral (por ejemplo, administrados por vía intramuscular, subcutánea, intratumoral, transdérmica, intratecal, intravenosa, etc.).

Las composiciones farmacéuticas comprenderán suficiente material genético para producir una cantidad terapéuticamente efectiva del producto de expresión génica de interés, es decir, una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas del estado patológico en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Las composiciones farmacéuticas también contendrán un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y que pueda administrarse sin una toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Adicionalmente, pueden estar presentes en tales vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampones del pH y similares. Se conoce en la técnica una amplia variedad de excipientes farmacéuticamente aceptables y no es necesario analizarlos en detalle en la presente descripción. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito ampliamente en una variedad de publicaciones, que incluyen, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ma edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel y otros, editores, 7^{ma} edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe y otros, editores, 3^{ra} edición. Amer. Pharmaceutical Assoc.

Las dosis apropiadas dependerán del mamífero que se esté tratando (por ejemplo, primate humano o no humano u otro mamífero), la edad y el estado general del sujeto que se va a tratar, la gravedad del estado que se está tratando, la proteína terapéutica particular en cuestión, su modo de administración, entre otros factores. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad efectiva apropiada.

Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente efectiva se situará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos clínicos. Por ejemplo, para la inyección *in vivo*, es decir, la inyección directamente en el músculo esquelético o cardíaco, una dosis terapéuticamente efectiva será del orden de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{15} de los viriones VAAr, por ejemplo, de aproximadamente 10^8 a 10^{12} viriones VAAr. Para

transducción *in vitro*, una cantidad efectiva de viriones de VAAr que se suministrarán a las células será del orden de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{13} de los viriones VAAr. Un experto en la técnica puede establecer fácilmente otras dosificaciones eficaces mediante ensayos de rutina que establezcan curvas de respuesta a la dosis.

5 La dosificación del tratamiento puede ser por un esquema de dosis única o un esquema de múltiples dosis. Así mismo, al sujeto se le pueden administrar tantas dosis como sea apropiado. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un número apropiado de dosis.

10 Las células de interés (es decir, "células diana") son típicamente de mamíferos, donde el término se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, laboratorio, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, ratones, ratas, conejos, etc. En algunas modalidades, la célula diana es una célula humana.

15 Las células diana de interés incluyen cualquier célula susceptible de infección por un virión de VAAr objeto. En algunos casos, por ejemplo, cuando el método es un método para suministrar un ácido nucleico heterólogo a una célula objetivo, la célula objetivo puede ser una célula extraída de un individuo (por ejemplo, una célula "primaria"), o la célula objetivo puede ser una célula de cultivo de tejidos (por ejemplo, de una línea celular establecida).

20 Las células diana ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, células hepáticas, células pancreáticas (por ejemplo, células de los islotes: células alfa, células beta, células delta, células gamma y/o células épsilon), células del músculo esquelético, células del músculo cardíaco, fibroblastos, células retinianas, células de la articulación sinovial, células pulmonares, células T, neuronas, células gliales, células madre, células progenitoras hematopoyéticas, células progenitoras neurales, células endoteliales y células cancerosas. Las células diana de células madre ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, células madre hematopoyéticas, células madre neurales, células madre de la cresta neural, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células madre mesenquimales, células madre mesodérmicas, células madre hepáticas, células madre pancreáticas, células madre musculares y células madre retinianas.

30 El término "célula madre" se usa en la presente descripción para referirse a una célula de mamífero que tiene la capacidad tanto de autorrenovarse como de generar una progenie diferenciada (véase, por ejemplo, Morrison y otros (1997) *Cell* 88:287-298). Generalmente, las células madre también tienen una o más de las siguientes propiedades: la capacidad de experimentar una replicación asincrónica o simétrica, que es donde las dos células hijas después de la división pueden tener diferentes fenotipos; amplia capacidad de autorrenovación; capacidad de existencia en forma mitóticamente inactiva; y regeneración clonal de todo el tejido en el que existen, por ejemplo, la capacidad de las células madre hematopoyéticas para reconstituir todos los linajes hematopoyéticos. Como apreciará un experto en la técnica, las "células progenitoras" se diferencian de las células madre en que típicamente no tienen la capacidad de autorrenovación extensa y, a menudo, pueden generar un subconjunto más restringido de los linajes en el tejido a partir del cual derivan, por ejemplo, sólo linajes linfoides o eritroides en un entorno hematopoyético. Como se usa en la presente, el término "célula madre" abarca tanto "células madre" como "células progenitoras" como se definió anteriormente.

45 Las células madre pueden caracterizarse tanto por la presencia de marcadores asociados con epítomos específicos identificados por anticuerpos como por la ausencia de ciertos marcadores identificados por la falta de unión de anticuerpos específicos. Las células madre también pueden identificarse mediante ensayos funcionales tanto *in vitro* e *in vivo*, particularmente ensayos relacionados con la capacidad de las células madre para dar lugar a una progenie diferenciada múltiple.

50 Las células madre adecuadas de interés incluyen, pero no se limitan a: células madre hematopoyéticas y células progenitoras derivadas de las mismas (patente de los Estados Unidos núm. 5,061,620); células madre de la cresta neural (véase Morrison y otros (1999) *Cell* 96:737-749); células madre neurales y células progenitoras neurales; células madre embrionarias; células madre mesenquimales; células madre mesodérmicas; células madre hepáticas, células madre musculares, células madre retinianas, células madre pluripotentes inducidas (células iPS), etc. Otras células "progenitoras" hematopoyéticas de interés incluyen células dedicadas a linajes linfoides, por ejemplo, células T inmaduras y poblaciones de células B.

55 Pueden usarse poblaciones purificadas de células madre o progenitoras. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas humanas pueden seleccionarse positivamente mediante el uso de anticuerpos específicos para CD34, thy-1; o seleccionado negativamente mediante el uso de marcadores específicos de linaje que pueden incluir glicoforina A, CD3, CD24, CD16, CD14, CD38, CD45RA, CD36, CD2, CD19, CD56, CD66a y CD66b; marcadores específicos de células T, marcadores específicos de tumores/cáncer, etc. Los marcadores útiles para la separación de células madre mesodérmicas incluyen FcγRII, FcγRIII, Thy-1, CD44, VLA-4α, LFA-1β, HSA, ICAM-1, CD45, Aa4.1, Sca-1, etc. Las células madre de la cresta neural pueden seleccionarse positivamente con anticuerpos específicos para el receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR), y seleccionarse negativamente para los marcadores sulfatida, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de mielina P₀, periferina y neurofilamento. Las células madre mesenquimales humanas pueden separarse positivamente mediante el uso de los marcadores SH2, SH3 y SH4.

5 Las células diana que se emplean pueden ser frescas, congeladas o haber sido sometidas a cultivo previo. Pueden ser fetales, de recién nacidos, de adultos. Las células hematopoyéticas pueden obtenerse de hígado fetal, médula ósea, sangre, particularmente G-CSF o sangre periférica movilizada con GM-CSF, o cualquier otra fuente convencional. La manera en que las células madre se separan de otras células del linaje hematopoyético o de otro linaje no es crítica para esta descripción. Como se describió anteriormente, puede obtenerse una población sustancialmente homogénea de células madre o progenitoras mediante el aislamiento selectivo de células libres de marcadores asociados con células diferenciadas, mientras que muestran características epitópicas asociadas con las células madre.

10 Los ácidos nucleicos que pueden suministrarse a un individuo incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos heterólogos definidos anteriormente. Las proteínas que pueden suministrarse mediante el uso un método objeto también incluyen un fragmento funcional de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente; y variantes funcionales de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente.

15 En algunas modalidades, se produce una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína en el huésped mamífero. Si se produce una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína particular en el huésped mamífero mediante el uso de un método objeto se determina fácilmente mediante el uso de ensayos apropiados para la proteína particular. Por ejemplo, cuando la proteína es EPO, se mide el hematocrito.

20 Cuando el VAAr codifica una proteína antigénica, las proteínas antigénicas adecuadas que pueden suministrarse a un individuo mediante el uso de un método objeto incluyen, pero no se limitan a, antígenos asociados al tumor/cáncer, autoantígenos (antígenos "propios"), antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos protozoarios y alérgenos; y fragmentos antigénicos de los mismos. En algunos casos, se inducirá una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) a la proteína antigénica codificada por VAAr en el huésped mamífero. En otros casos, se inducirá una respuesta humoral a la proteína antigénica codificada por VAAr en el huésped mamífero, de manera que se generen anticuerpos específicos para la proteína antigénica. En muchos casos, se inducirá en el huésped mamífero una respuesta inmunitaria TH1 a la proteína antigénica codificada por VAAr. Si se ha generado una respuesta inmunitaria a la proteína antigénica se determina fácilmente mediante el uso de métodos bien establecidos. Por ejemplo, puede usarse un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima para determinar si se ha generado un anticuerpo contra una proteína antigénica. Los métodos para detectar CTL específicos de antígeno se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, una célula diana marcada de forma detectable que expresa la proteína antigénica en su superficie se usa para analizar la presencia de CTL específicos de antígeno en una muestra de sangre.

35 Si se ha suministrado una cantidad terapéuticamente efectiva de un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido, un agente de ARNi, etc.) a un huésped mamífero mediante el uso de un método objeto se determina fácilmente mediante el uso de cualquier ensayo apropiado. Por ejemplo, cuando el producto génico es un agente ARNi que inhibe el VIH, puede medirse la carga viral.

40 Métodos de generación e identificación de viriones de VAAr modificados

La presente descripción proporciona un método para generar e identificar un virión de virus adenoasociado recombinante infeccioso modificado (VAAr) que comprende una proteína de la cápside variante que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una sustitución de aminoácidos (incluidas deleciones, inserciones, etc.) en comparación a una proteína de la cápside de VAA inicial. Una proteína de la cápside de VAA iniciadora comprende una secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33.

50 El método generalmente implica generar una biblioteca de viriones de VAAr mutante; y seleccionar la biblioteca para viriones de VAAr modificados con propiedades alteradas con relación a un virión de VAAr iniciador. El virión iniciador de VAAr comprende una proteína de la cápside de VAA variante que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33. La presente descripción proporciona además bibliotecas y composiciones que comprenden las bibliotecas.

55 En algunos casos, una etapa de selección dada se repite dos, tres, cuatro o más veces para enriquecer una biblioteca de VAA objeto en busca de propiedades de virión alteradas. En algunos casos, siguiendo la selección de una biblioteca de VAA, se aíslan y secuencian clones individuales.

Generación de una biblioteca de VAA mutante

60 Se genera una biblioteca de VAA mutante que comprende una o más mutaciones con relación a un gene *cap* iniciador del VAA. Un gen iniciador *cap* es un *cap* que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33. Mutaciones en el gene *cap* del VAAr se generan mediante el uso de cualquier método conocido. Métodos adecuados para la mutagénesis de un gen *cap* iniciador de un VAA incluyen, pero no se limitan a, un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, mutagénesis de saturación, mutagénesis de intercambio de bucles, mutagénesis de mezcla de fragmentos (es decir, mezcla de ADN) y similares. Los métodos para generar mutaciones están bien descritos en la técnica. Ver, por

ejemplo, Zhao y otros Nat Biotechnol. marzo de 1998;16(3):234-5; Koerber y otros; Mol Ther. octubre de 2008;16(10):1703-9; Koerber y otros; Mol Ther. Diciembre de 2009; 17 (12):2088-95; patente de Estados Unidos núm. 6,579,678; Patente de Estados Unidos núm. 6,573,098; y Patente de Estados Unidos núm. 6,582,914; todos los cuales son por sus enseñanzas relacionadas con la mutagénesis.

5 En algunos casos, una biblioteca de VAA mutante que comprende mutaciones en el gen *cap* se generará mediante el uso de un proceso de extensión escalonado. El proceso de extensión escalonada implica la amplificación del gen *cap* mediante el uso de un método basado en PCR. La plantilla del gen *cap* se cebe mediante el uso de cebadores de PCR específicos, seguido de ciclos repetidos de desnaturalización y de hibridación/extensión muy corta
10 catalizada por polimerasa. En cada ciclo, los fragmentos en crecimiento se aparean con diferentes plantillas en función de la complementariedad de la secuencia y se extienden más. Los ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión se repiten hasta que se forman secuencias de longitud completa. Las secuencias de longitud completa resultantes incluyen al menos una mutación en el gen *cap* en comparación con un gen *cap* del VAA de tipo salvaje.

15 Los productos de PCR que comprenden las secuencias *cap* de VAA que incluyen una o más mutaciones se insertan en un plásmido que contiene un genoma de VAA de tipo salvaje. El resultado es una biblioteca de VAA *cap* mutantes. Por lo tanto, la presente descripción proporciona una biblioteca de genes *cap* mutantes del VAA que comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 10^{10} miembros, y que comprenden mutaciones en el gen *cap* del VAA. Un miembro dado de la biblioteca tiene de aproximadamente una a aproximadamente 50 mutaciones
20 en el gen *cap* del VAA. Una biblioteca de materias comprende de 10 a aproximadamente 10^9 miembros distintos, cada uno con una(s) mutación(es) diferente(s) en el gen *cap* del VAA.

Una vez se genera una biblioteca *cap* mutante, se producen partículas virales que luego pueden seleccionarse sobre la base de las propiedades de las cápside alteradas. El ADN del plásmido de la biblioteca se transfecta en una célula huésped adecuada (por ejemplo, células 293), seguido de la introducción en la célula del virus auxiliar. Se recogen
25 las partículas virales producidas por las células huésped transfectadas (partículas de la biblioteca VAAr).

Selección de la biblioteca

30 Una vez que se genera una biblioteca, se selecciona para una propiedad de virión particular (es decir, una propiedad de infección alterada). Las partículas virales se generan como se discutió anteriormente (produciendo por lo tanto una biblioteca de viriones de VAAr modificados), y se someten a una o más etapas de selección para identificar un virión de VAAr modificado con una propiedad alterada de infección (con relación a un virión de VAAr infeccioso que comprende una variante de la proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33). Las propiedades de la infección que se seleccionan pueden incluir, entre
35 otras: 1) unión alterada (por ejemplo, unión disminuida) a anticuerpos neutralizantes de VAA; 2) aumento de la evasión de anticuerpos neutralizantes de VAA; 3) aumento de la infectividad de una célula resistente a la infección por VAA; y 4) unión de heparina alterada.

40 1. Selección de unión reducida a anticuerpos neutralizantes de VAA

En algunos casos, se selecciona una biblioteca de VAA objeto para la unión alterada (por ejemplo, reducida) a los anticuerpos neutralizantes que se unen y neutralizan los viriones de VAA de tipo salvaje, en comparación con la
45 unión de dichos anticuerpos a los viriones de VAA de tipo salvaje y la neutralización de los viriones de tipo salvaje (o con relación a un virión de VAAr infeccioso que comprende una proteína de la cápside variante que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33). Las partículas de la biblioteca de VAA (virión de la biblioteca de VAA) se ponen en contacto con anticuerpos neutralizantes y se prueba la capacidad de las partículas de la biblioteca de VAA para infectar una célula huésped permisiva. Típicamente, las partículas de la biblioteca de VAA se ponen en contacto con diversas concentraciones de anticuerpos neutralizantes. Cuanto mayor sea la concentración de anticuerpos neutralizantes que se requiere para reducir la infectividad de las partículas de la biblioteca de VAA, más resistentes son las partículas de VAA a la neutralización. Puede usarse cualquier ensayo conveniente conocido por un experto en la técnica para medir directamente la unión (por ejemplo, medir la afinidad de unión) de un virión de la biblioteca de VAA a los anticuerpos neutralizantes contra VAA.

55 2. Selección para un aumento de la evasión de anticuerpos neutralizantes de VAA

En algunos casos, se selecciona una biblioteca de VAA objeto para un aumento de la evasión de anticuerpos neutralizantes (es decir, una mayor resistencia a anticuerpos neutralizantes humanos de VAA) con relación a un virión de VAAr infeccioso que comprende una proteína de la cápside variante que comprende una secuencia de
60 aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33. Las partículas de la biblioteca de VAA se ponen en contacto con células diana en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA (normalmente anticuerpos contra VAA neutralizantes humanos). Después de una cantidad de tiempo adecuada para permitir la infección de las células con partículas de la biblioteca de VAA, se adiciona el virus auxiliar y se recolectan las partículas de la biblioteca de VAA que infectaron con éxito la(s) célula(s). En algunos casos, se mide la infectividad (por ejemplo, como se describió anteriormente) para aquellos viriones que exhiben una infección exitosa. En algunos casos, el ciclo de infección, la adición del virus auxiliar y la recolección de partículas de VAA se repite una, dos, tres o más

veces. La selección puede ocurrir con diferentes cantidades (concentraciones) de anticuerpos neutralizantes de VAA para seleccionar varios grados de evasión (por ejemplo, cada ronda repetida puede usar un aumento de la concentración de anticuerpos con respecto a la ronda anterior).

5 3. Selección para aumentar la infectividad de células no permisivas

En algunos casos, se selecciona una biblioteca de VAA objeto para aumentar la infectividad de las células no permisivas (con relación a un virión de VAAr infeccioso que comprende una proteína de la cápside variante que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33). Las partículas de la biblioteca de VAA se ponen en contacto con una célula no permisiva (por ejemplo, una población de células no permisivas). Después de una cantidad de tiempo adecuada para permitir la infección de las células con partículas de la biblioteca de VAA, se adiciona el virus auxiliar y se recolectan las partículas de la biblioteca de VAA que infectaron con éxito la(s) célula(s) no permisivas. En algunos casos, el ciclo de infección, la adición del virus auxiliar y la recolección de partículas de VAA se repite una, dos, tres o más veces.

15 4. Selección de unión alterada de heparina

En algunos casos, se selecciona una biblioteca objeto para la unión de heparina alterada, incluida un aumento de la unión de heparina y la unión de heparina disminuida con relación a la unión de heparina del virión del VAA de tipo salvaje (o con relación a un virión de VAAr infeccioso que comprende una proteína de la cápside variante que comprende una secuencia de aminoácidos expuesto en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33). Las partículas de la biblioteca de VAA se ponen en contacto con una matriz de afinidad de heparina. Por ejemplo, las partículas de la biblioteca de VAA se cargan en una columna de afinidad de heparina en condiciones que permiten la unión de las partículas de la biblioteca de VAA a la heparina. Las condiciones ilustrativas incluyen el equilibrio de la columna con NaCl 0,15 M y Tris 50 mM a pH 7,5. Después de permitir que la partícula de la biblioteca de VAA se una a la matriz de afinidad de heparina, el complejo de partícula de la biblioteca de VAA/matriz de afinidad de heparina se lava con volúmenes de tampón que contienen concentraciones progresivamente crecientes de NaCl y, a cada concentración de NaCl, se recogen las partículas de la biblioteca de VAA eluidas. Por ejemplo, después de unir el complejo de matriz de afinidad de partículas/heparina de la biblioteca de VAA se lava con un volumen de tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 200 mM, y se recogen las partículas de la biblioteca de VAA eluidas. Las etapas de elución se repiten con un tampón Tris 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl aproximadamente 250 mM, NaCl aproximadamente 300 mM, NaCl aproximadamente 350 mM, NaCl aproximadamente 400 mM, NaCl aproximadamente 450 mM, NaCl aproximadamente 500 mM, NaCl aproximadamente 550 mM, NaCl aproximadamente 600 mM, NaCl aproximadamente 650 mM, NaCl aproximadamente 700 mM o NaCl aproximadamente 750 mM.

Las partículas de la biblioteca de VAA que eluyen a concentraciones de NaCl inferiores a aproximadamente 450 mM de NaCl exhiben propiedades de unión a heparina disminuidas con relación a el VAA de tipo salvaje. Las partículas de la biblioteca de VAA que eluyen a concentraciones de NaCl superiores a aproximadamente 550 mM de NaCl exhiben un aumento de las propiedades de unión a heparina con relación a el VAA de tipo salvaje.

En algunos casos, las partículas de la biblioteca de VAA eluidas se amplifican por coinfección de células permisivas con un virus auxiliar y se vuelven a fraccionar en una matriz de afinidad de heparina. Esta etapa puede repetirse varias veces para enriquecer las partículas de la biblioteca de VAA con propiedades de unión a heparina alteradas.

En los presentes métodos, una o más etapas de selección pueden seguir a la generación de partículas de la biblioteca de VAA. Por ejemplo, en algunos casos, el método comprende seleccionar el aumento de la unión de heparina, seguido de seleccionar la disminución de la unión a los anticuerpos neutralizantes. En otros casos, el método comprende seleccionar la unión disminuida a anticuerpos neutralizantes, seguido de seleccionar la unión aumentada de heparina. En otros casos, el método comprende seleccionar la unión disminuida de heparina, seguido de seleccionar la unión disminuida a anticuerpos neutralizantes. En otros casos, el método comprende seleccionar la unión disminuida a anticuerpos neutralizantes, seguido de seleccionar la unión disminuida de heparina. En otros casos, el método comprende seleccionar la unión disminuida a los anticuerpos neutralizantes, seguido de seleccionar para el aumento la infectividad de una célula madre. En otros casos, el método comprende seleccionar la unión disminuida a los anticuerpos neutralizantes, seguido de seleccionar para el aumento de la evasión de los anticuerpos neutralizantes. En otros casos, el método comprende seleccionar para el aumento de la evasión de anticuerpos neutralizantes, seguido de seleccionar para la unión disminuida a los anticuerpos neutralizantes.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona una biblioteca de virus adenoasociado (VAA) que incluye una pluralidad de ácidos nucleicos, cada uno de los cuales incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante. La proteína de la cápside de VAA variante codificada incluye al menos una sustitución de aminoácido con relación a una secuencia establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33. La presente descripción proporciona una biblioteca de partículas de virus adenoasociado mutante (VAA), que incluye una pluralidad de partículas de VAA, cada una de las cuales incluye una proteína de la cápside de VAA que incluye al menos una sustitución de aminoácidos con relación a una secuencia establecida en una de las SEQ ID NOs: 10-

13 y 26-33. Los ácidos nucleicos que codifican proteínas de la cápside de VAA mutantes se describen anteriormente, al igual que las propiedades de las proteínas de la cápside de VAA mutantes codificadas.

La presente descripción proporciona además una biblioteca que comprende al menos uno de: (i) dos o más viriones de VAAr infecciosos, cada uno de los cuales comprende una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante y un ácido nucleico heterólogo; (ii) dos o más ácidos nucleicos aislados, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante; (iii) dos o más células huésped, cada una de las cuales comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante; y (iv) dos o más proteínas de la cápside de VAA variantes; donde la proteína de la cápside de VAA variante de al menos un miembro de la biblioteca comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos establecida en una de las SEQ ID NO: 10-13 y 26-33.

Composiciones y estuches

También se proporcionan composiciones y estuches para usar en los métodos de la presente descripción. Las composiciones y estuches objeto incluyen al menos uno de: un virión de VAAr infeccioso objeto, un vector de VAAr objeto, un ácido nucleotídico objeto que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante objeto, una célula huésped aislada que comprende un ácido nucleico objeto (es decir, una célula huésped modificada genéticamente objeto que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante objeto); una biblioteca temática (por ejemplo, cualquiera de las bibliotecas descritas anteriormente); y una proteína de la cápside de VAA variante objeto. Una composición o estuche puede incluir cualquier combinación conveniente de los anteriores. Una composición o estuche también puede incluir un virus auxiliar y/o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un virus auxiliar. Un estuche también puede incluir reactivos para la generación de ácidos nucleicos (es decir, ácidos nucleicos "mutantes") que codifican proteínas de la cápside de VAA variantes modificadas.

Además de los componentes anteriores, los estuches objeto pueden incluir además instrucciones para practicar los métodos objeto. Estas instrucciones pueden estar presentes en los estuches objeto en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el estuche. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o piezas de papel en la cual la información se imprime, en el empaque del estuche, en un prospecto y similares. Otra forma más de estas instrucciones es un medio legible por computadora, por ejemplo, disquete, disco compacto (CD), unidad flash y similares, en el que se ha grabado la información. Otra forma más de estas instrucciones que pueden estar presentes es una dirección de sitio web que puede usarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio separado.

La invención, como está ahora completamente descrita, resultará evidente para un experto en la técnica que pueden realizarse varios cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los experimentos más abajo sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc), pero deben tomarse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de cualquier otra manera, las partes son las partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es la atmosférica o cercana. Pueden usarse abreviaturas estándar, por ejemplo, pb, par(es) de base(s); kb, kilobase(s); mL, mililitro(s); µL, microlitro(s); nL, nanolitro(s); pL, picolitro(s); s o seg, segundo(s); min, minuto(s); h o hr, hora(s); aa, aminoácido(s); kb, kilobase(s); pb, par(es) de base(s); nt, nucleótido(s); im, intramuscular(mente); ip, intraperitoneal(mente); sc, subcutánea(mente); iv, intravenosa(mente); y similares.

Ejemplo 1:

Los vectores de terapia génica de virus adenoasociados (VAA) han demostrado ser muy prometedores en varios ensayos clínicos hasta la fecha. Sin embargo, los anticuerpos contra VAA circulantes, que resultan de la exposición infantil o la administración previa de un vector de VAA, han impedido la implementación de la terapia génica de VAA para muchos pacientes potenciales. Hemos aislado nuevas variantes de VAA que son capaces de mejorar la evasión de los anticuerpos contra VAA, tanto in vitro como in vivo. La rigurosa presión resultante de las selecciones mediante el uso de sueros humanos de baja y alta potencia e IgIV humana desarrolló variantes de VAA capaces de evadir la neutralización de anticuerpos de sueros humanos individuales, IgIV humana y sueros de ratón, las variantes más evasivas hasta la fecha.

Materiales y Métodos

Líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron a 37 °C y 5 % de CO₂, a menos que se indique de cualquier otra manera, se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Se cultivaron células HEK293T, HeLa y HT1080 en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco, Carlsbad, CA) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se cultivaron células CHO K1 y CHO pgsA en medio F-12K (ATCC) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Invitrogen). Se cultivaron células Pro5 y Lec1 en medio MEM-alfa (Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco) y penicilina/estreptomicina al 1 % (Invitrogen).

Sueros humanos combinados para la selección

Se obtuvieron dieciocho muestras individuales de suero humano de Innovative Research, Inc. (Southfield, MI) y se determinó el título de anticuerpos neutralizantes para VAA2 de tipo salvaje para cada muestra (**Tabla 2**). Dado que las muestras individuales probablemente posean variaciones tanto en las afinidades como en las especificidades del epítipo de los anticuerpos, se generaron tres combinaciones de sueros potentes ($\alpha = A + F + G$, $\beta = B + H + M$ y $\gamma = I + J + N$) mediante la mezcla de volúmenes iguales de muestras de suero individuales. La selección en presencia de estas variaciones de anticuerpos debería dar como resultado un aumento general de la resistencia a muchos anticuerpos humanos preexistentes. Las selecciones posteriores se realizaron en presencia de Gamimune N, 10 % Human IgIV(Bayer, Elkhart IN) para seleccionar la resistencia a un intervalo aún más amplio de anticuerpos.

Tabla 2: Títulos de anticuerpos neutralizantes de muestras individuales de suero humano

Los títulos de anticuerpos neutralizantes (NAb) para cada muestra se informan como el recíproco de la fracción de volumen de suero necesaria para reducir la infectividad al 37 % del valor medido en ausencia de suero. A continuación, se generaron tres combinaciones de sueros ($\alpha = A + F + G$, $\beta = B + H + M$ y $\gamma = I + J + N$) mezclando cantidades equivalentes de tres muestras de suero individuales.

Tabla 2

Muestra de suero humano	Título ~ NAB	Muestra de suero humano	Título ~ NAB
A	500	J	500
B	275	K	172
C	200	L	<75
D	<75	M	2200
E	<75	N	5000
F	350	O	<75
G	425	P	<75
H	450	Q	<75
I	200	R	120

Generación de bibliotecas y producción viral

Para crear la biblioteca de mutagénesis de saturación, se generó una biblioteca de VAA2 *cap* mediante PCR propensa a errores seguida del proceso de extensión escalonada descrito por Zhao *et al.* mediante el uso de 5'-GCGGAAGCTTCGATCAACTACGC-3' (SEQ ID NO: 14) y 5'-GGGGCGGCCGCAATTACAGATTACGAGTCAGGTATCTGGTG-3' (SEQ ID NO: 15) como cebadores directos e inversos, respectivamente. Las selecciones mediante el uso de sueros humanos individuales combinados revelaron una variante que contenía cuatro mutaciones puntuales (descritas en la sección de resultados) que sirvieron como base para la biblioteca de mutagénesis de saturación. El gen *cap* para esta variante se sometió a mutagénesis adicional cambiando los aminoácidos en sitios específicos. Se usaron el cebador 5'-cattNNKgaccagtctaggaactgg-3' (SEQ ID NO: 16) y el cebador de complemento inverso correspondiente para mutagenizar el sitio de aminoácidos R471. Se usaron el cebador 5'-gccacaaggacgatgaagaaNNKtttttctcagagcgggggttctcatcttgggaagcaaggctcaNNKaaaacaagtgtggacattg-3' (SEQ ID NO: 17) y el cebador de complemento inverso correspondiente para mutagenizar los sitios de aminoácidos K532 y E548. Se usaron el cebador 5'-ccaacctccagagagggcNNKagacaagcagctacc-3' (SEQ ID NO: 18) y el cebador de complemento inverso correspondiente para mutagenizar el sitio de aminoácidos N587. Se usaron el cebador 5'-ccaactacaacaagtctNNKaatgtggacttactgtggacNNKaatggcgtgtatt-3' (SEQ ID NO: 19) y el cebador de complemento inverso correspondiente para mutagenizar los sitios de aminoácidos V708 y T716. Una biblioteca que consiste de

VAA2 que contiene regiones de bucle *cap* aleatorizadas y una biblioteca que contiene ADN mezclado de los genes *cap* VAA1, VAA2, VAA4, VAA5, VAA6, VAA8, VAA9 tipo salvaje se empaquetaron y combinaron para las etapas de selección iniciales (Koerber y otros; Mol Ther. 2008 Oct; 16 (10): 1703-9; y Koerber y otros; Mol Ther. 2009 Dic; 17 (12): 2088-95; ambos se incorporan aquí como referencia en su totalidad).

Para la segunda y tercera rondas de evolución, se generaron bibliotecas de mutagénesis aleatorias sometiendo genes *cap* de la biblioteca de intercambio de bucles/mezcla y la biblioteca de mutagénesis de saturación para PCR propensa a errores usando 5'-CATGGGAAAGGTGCCAGACG-3' (SEQ ID NO: 20) y 5'-ACCATCGGCAGCCATACCTG-3' (SEQ ID NO: 21) como cebadores directo e inverso, respectivamente, como se describió anteriormente. Las bibliotecas de VAA competentes para la replicación y los vectores de VAA recombinantes que expresan GFP bajo el control de un promotor de CMV se empaquetaron mediante el uso de células HEK293T (ATCC) mediante el uso del método de transfección de fosfato de calcio, y los virus se purificaron mediante centrifugación en gradiente yodioxal. Vectores de VAA recombinantes que expresan GFP o luciferasa bajo el control de un promotor de CMV para su uso *in vivo* se purificaron adicionalmente mediante filtración con Amicon. Los títulos genómicos resistentes a la ADNasa se determinaron mediante PCR cuantitativa. (Excoffon y otros, Proc Natl Acad Sci U S A. 10 de marzo de 2009; 106(10):3865-70; y Maheshri y otros, Nat Biotechnol. febrero 2006; 24(2):198-204; ambos se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad).

Selección y evolución de bibliotecas

Una ronda de selección se define como infección de células HEK293T mediante el uso de la biblioteca de partida de VAA (incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente para los sueros humanos individuales combinados o durante 1 hora a 37 °C con IgIV inactivada por calor antes de la infección), seguida de rescate de adenovirus y cosecha de variantes exitosas. Cada ciclo de evolución consiste en mutagénesis del gen *cap* para crear la biblioteca inicial y tres rondas de selección. Se realizaron tres rondas de evolución con cada biblioteca, con análisis clonal realizado entre cada ronda de evolución. Las bibliotecas de partida para cada ronda de evolución se generaron como se describe anteriormente. Después de la tercera ronda de selección, los genes *cap* del VAA se aislaron del conjunto de variantes de VAA exitosas y se amplificaron mediante PCR. Los genes *cap* se insertaron en el plásmido de empaquetamiento de VAA recombinante pXX2 mediante el uso de *NotI* y *HindIII*. A continuación, los genes *cap* se secuenciaron en la instalación de secuenciación de ADN de la Universidad de California, Berkeley, y se analizaron mediante el uso del software Geneious (Biomatters, Auckland, Nueva Zelanda). Se generaron modelos tridimensionales de la cápside del VAA2 (número de acceso 1LP3 del Protein Databank) en Pymol (DeLano Scientific, San Carlos, CA).

Análisis de transducción in vitro de variantes que evitan anticuerpos

Células HEK293T se platearon a una densidad de 3×10^4 células/pocillo 24 horas antes de la infección. Las variantes se incubaron a 37 °C durante 1 hora con IgIV inactivada por calor, sueros humanos individuales o sueros de ratones individuales antes de la infección, y luego las células se infectaron con VAAr-GFP a una MOI genómica de 2000. El porcentaje de células positivas para GFP se evaluó 48 horas después de la infección mediante el uso de un sistema de análisis e imágenes microcelulares ImageXpress (dispositivos moleculares, Sunnyvale, CA) y el software de análisis de imágenes MetaXpress, versión 3.1.0, módulo de aplicación de puntuación de células de longitud de onda múltiple (dispositivos moleculares).

Análisis de transducción in vitro

Para determinar las eficiencias relativas de transducción de los mutantes seleccionados en comparación con los serotipos parentales de VAA de tipo salvaje, HEK293T, CHO K1, CHO pgsA (que carece de todos los glucosaminoglicanos de superficie), CHO Pro5 (la línea parental de varios mutantes de glucosilación, incluidas las células Lec1), CHO Lec1 (glucosilación defectuosa), células HeLa y HT1080 (una línea celular de fibrosarcoma humano) se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células por pocillo 24 horas antes de la infección. Las células se infectaron con VAAr1-GFP, VAAr2-GFP, VAAr6-GFP, la mezcla 100.1-GFP, la mezcla 100.3-GFP, SM 10.2-GFP o la mezcla 100.7-GFP en un intervalo de MOI de 100-1000. El porcentaje de células positivas para GFP se evaluó 48 horas después de la infección mediante el uso de un citómetro de flujo Beckman-Coulter Cytomics FC500 (Beckman-Coulter, Brea, CA).

Análisis in vivo de variantes que evitan anticuerpos

Para el análisis de la expresión génica *in vivo*, se prepararon ratones Balb/c hembras, de ocho semanas de edad, con 4 mg de IgIV por ratón o solución salina tamponada con fosfato (para ratones de control) mediante inyección en la vena de la cola 24 horas antes de la administración de la mezcla 100-3 recombinante (ver SEQ ID NO: 12), SM 10-2 (ver SEQ ID NO: 10) o vectores VAA2. Los ratones se infectaron con 10^{11} genomas virales de vectores VAA recombinantes que codifican luciferasa bajo el control de un promotor de CMV mediante inyección en la vena de la cola. Para la obtención de imágenes de bioluminiscencia, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2 % y oxígeno. El sustrato de D-luciferina (GOLD Biotechnology, St. Louis, MO) se inyectó por vía intraperitoneal, a una dosis de 500 µg/g de peso corporal. Las imágenes se generaron mediante el uso de un generador de imágenes

VivoVision IVIS Lumina (Xenogen, Alameda, CA). Para cada ratón, se tomaron imágenes ventrales de 7-10 minutos después de la inyección del sustrato, cada semana durante cuatro semanas. Cinco semanas después de la infección, se recogió suero mediante punción cardíaca y luego se perfundió a los ratones con solución salina al 0,9 %.

Se recogieron y congelaron el corazón, el hígado, los pulmones, el riñón, el bazo, el cerebro, la médula espinal y el músculo de las extremidades traseras. Las muestras de tejido congelado se homogeneizaron y se resuspendieron en tampón de lisis informador (Promega, Mannheim, Alemania) para *in vitro* análisis de luciferasa. El lisado que contenía luciferasa se clarificó mediante centrifugación durante 10 minutos a 10.000 g. Para analizar las muestras, se adiciona 20 μ L del lisado a 100 μ L del tampón de ensayo de luciferasa, se mezclaron, se incubaron durante 5 minutos y se colocaron en el luminómetro. La señal se integró durante 30 segundos con un retraso de 2 segundos y se informó en unidades de luz relativa (RLU) detectadas por un luminómetro TD 20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA). La señal de luciferasa se normalizó al contenido de proteína total determinado por un ensayo de ácido bicinconínico (Pierce).

Resultados

Nuestros resultados demuestran que el VAA puede evolucionar para superar significativamente la neutralización por anticuerpos contra el VAA, tanto *in vitro* e *in vivo*. Se aislaron nuevas variantes de VAA que requerían títulos de anticuerpos neutralizantes de 2 a 35 veces más altos (mediante el uso de IgIV humana) que los VAA de tipo salvaje *in vitro*. Las propiedades de neutralización de anticuerpos también se traducen en una mejor transducción *in vivo* en presencia de anticuerpos neutralizantes. El aislamiento de estos nuevos clones resistentes a los anticuerpos contra VAA permite la implementación más amplia de tratamientos basados en VAA como vector de suministro de ácido nucleico (incluidos los individuos con títulos altos de anticuerpos que actualmente no son elegibles para la terapia génica de VAA).

Generación y selección de bibliotecas VAA a través de la evolución dirigida

La **Figura 1a** muestra un esquema del enfoque de evolución dirigida usado para aislar nuevas variantes de VAA capaces de evadir la neutralización de anticuerpos humanos. Se crearon bibliotecas de virus mediante el uso de las técnicas de mutagénesis de ADN descritas en los siguientes párrafos (**Figura 1a**, etapas 1 y 2). Durante las selecciones iniciales, se incubaron grupos de bibliotecas virales desarrolladas a partir de mutaciones de PCR propensas a errores en genes *cap* de VAA2 con varias diluciones de la combinación de sueros humanos α de baja potencia durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la infección de las células HEK293T (etapa 3). Después de tres rondas de selección contra la combinación de sueros humanos α de baja potencia (**Figura 1a**, etapas 4 y 5), se obtuvieron varias variantes con mayor resistencia a este conjunto de sueros neutralizantes (**Figura 1a**, etapa 6, **Figura 7a**). La variante 1.45, contenía dos mutaciones puntuales (N312K, N449D), que dieron como resultado > 10 veces más resistencia a la neutralización por la combinación α en comparación con el VAA2 de tipo salvaje.

El gen *cap* de la variante 1,45 se sometió a mutagénesis aleatoria adicional y la biblioteca resultante se seleccionó para tres rondas adicionales de selección contra las combinaciones β y γ , en paralelo. Como solo se observaron mejoras menores en la evasión de anticuerpos (datos no mostrados), los genes *cap* recuperados se combinaron y se sometieron a una diversificación adicional mediante la mezcla de ADN y la PCR de EP. Tres rondas más de selección contra cantidades crecientes de sueros de las combinaciones β y γ dieron como resultado un enriquecimiento sustancial en la cantidad de virus recuperado de la biblioteca viral en comparación con el VAA2 de tipo salvaje (**Figura 7b, c**). La secuenciación de los genes exitosos *cap* de ambas combinaciones revelaron varios mutantes de baja frecuencia y un único mutante dominante, la variante γ 4,3, que contenía cuatro mutaciones puntuales (N312K, N449D, N551S e I698V), presentes dentro de ambas bibliotecas. En presencia de IgIV humana, la variante 1,45 demostró una modesta resistencia mejorada de 1,2 veces a la neutralización, mientras que γ 4,3 demostró una resistencia mejorada de 3,1 veces a la neutralización (**Figura 7d**). Esta observación confirma la hipótesis de que pueden usarse combinaciones de sueros humanos individuales para aislar variantes de VAA capaces de mejorar la evasión de anticuerpos presentes en la población humana en general.

El éxito moderado de la variante γ 4,3 en resistir la neutralización por anticuerpos contra VAA impulsó el desarrollo de una biblioteca basada en el gen *cap* de γ 4,3. Los sitios de aminoácidos R471, K532, E548, N587, V708, T716, previamente determinados como sitios inmunogénicos en la cápside de VAA2, se sometieron a mutagénesis de saturación en un intento de encontrar mutaciones de aminoácidos que pudieran mejorar la resistencia a los anticuerpos de γ 4,3. Esta biblioteca de "mutagénesis de saturación", junto con una biblioteca "mezclada" compuesta de *cap* quimeras de 7 serotipos de VAA parentales y una biblioteca de "intercambio de bucle" compuesta de VAA2 *cap* con regiones de bucle sustituido se sometieron a tres rondas adicionales de selección, en las que los conjuntos de bibliotecas virales se incubaron con diversas diluciones de IgIV humana durante una hora a 37 °C antes de la infección de las células HEK293T. Después de la infección con bibliotecas de VAA y la amplificación de las variantes de VAA infecciosas a través de la superinfección de adenovirus, se cuantificó el número de genomas virales o título viral de cada condición de biblioteca y se comparó con los títulos de VAA2 de tipo salvaje como método para determinar el éxito de la selección (**Figura 1b**). Para cada ronda de selección mediante el uso de la mutagénesis de saturación y las bibliotecas de intercambio de bucle/mezclado, se usaron complejos virales de las condiciones de dilución de IgIV 1:10 y 1:100 que produjeron títulos virales más altos que el VAA2 de tipo salvaje como punto de

partida para la ronda de selección posterior. Después de tres rondas de selección, los genes virales *cap* exitoso se aislaron y probaron individualmente para determinar el virus con la suministro de genes más eficiente. Además, los genes *cap* aislados de la tercera ronda de selección se sometieron a rondas adicionales de mutagénesis por PCR propensa a errores, y el proceso se repitió para aumentar iterativamente la aptitud del virus.

La Figura 1 representa la evolución dirigida del VAA para la evasión de anticuerpos mejorada. **(a)** Esquema de evolución dirigida. 1) Se crea una biblioteca viral diversificando genéticamente el gen *cap* mediante el uso varios enfoques complementarios. 2) Los virus se empaquetan en células HEK293T mediante el uso de transfección de plásmido, luego se recolectan y purifican. 3) La biblioteca viral se incuba con IgIV humana a varias concentraciones y se introduce en células HEK293T *in vitro*. 4) Los virus exitosos se amplifican y recuperan mediante superinfección de adenovirus. 5) Los clones exitosos se enriquecen mediante selecciones repetidas en MOI más bajos. 6) El ADN viral aislado revela genes *cap* exitosos. 7) Los genes *cap* exitosos se mutan nuevamente para servir como un nuevo punto de partida para la selección. **(b)** Selección de mutantes de evasión de anticuerpos a partir de bibliotecas de mutagénesis de saturación/intercambio de bucles/mezclado. Se infectaron células HEK293T con bibliotecas virales durante 24 horas. Las partículas virales que infectaron productivamente las células se amplificaron mediante infección por adenovirus y el VAA rescatado se cuantificó mediante qPCR. Una dilución 1:10 de IgIV corresponde a una concentración de 10 mg IgIV/mL. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$).

La Figura 7 demuestra la generación de evasores de anticuerpos humanos basados en VAA2. **(a)** Cuatro clones virales seleccionados después de tres rondas de selección contra la combinación α de baja rigurosidad demuestran una mayor resistencia a 1 μ L de suero α a una MOI de 1. Dos rondas adicionales de diversificación (es decir, mutagénesis y mezcla de ADN) y selección (3 rondas de cantidades crecientes de suero) dieron como resultado una recuperación viral significativamente mejorada en presencia de grandes cantidades de combinaciones altamente potentes **(b)** β y **(c)** γ . **(d)** Adicionalmente, dos clones virales (1,45 y γ 4,3) demuestran resistencias mejoradas de 1,23 y 3,10 veces a la combinación muy diversa de anticuerpos preexistentes presentes con combinada inmunoglobulina intravenosa humana (IgIV) de $\sim 100\ 000$ individuos en comparación con el tipo salvaje VAA2.

*Aumento en la evasión de anticuerpos de las nuevas variantes de VAA evolucionadas *in vitro**

De los doce clones seleccionados y empaquetados para el análisis individual de las bibliotecas de mutagénesis de saturación y de intercambio de bucle/mezclado después de nueve rondas de cribado contra IgIV humana, los doce requirieron títulos de anticuerpos neutralizantes más altos que los VAA1 y VAA2 de tipo salvaje (**Figura 2a** y **Tabla 1**). La mezcla 100-3 variante (ver SEQ ID NO: 12), que requería 35 veces más concentración de IgIV *in vitro* para la neutralización que el VAA2 de tipo salvaje, todavía era capaz de transducir aproximadamente el 10 % de las células en presencia de 1 mg/mL de IgIV (**Figura 2b**). Además, la variante SM 10-2 de la biblioteca de mutagénesis de saturación de VAA2 requirió un 7,5 veces más concentración de IgIV *in vitro* para neutralización que VAA2 de tipo salvaje. Además, la mezcla 100-3 y SM 10-2 variantes (ver SEQ ID NO: 10) mostraron una transducción mejorada en presencia de muestras de suero de pacientes individuales excluidos de un ensayo clínico de hemofilia B (**Figura 3**) (Nathwani y otros, N Engl J Med. 22 de diciembre de 2011; 365(25)2357-65).

La Figura 2 representa los perfiles de neutralización de variantes de evasión de anticuerpos. Los genes *cap* de mutantes que evitan los anticuerpos aislados después de tres rondas de evolución se usaron para empaquetar el VAA recombinante que codifica GFP y se incubaron con IgIV humana antes de la infección de las células HEK293T. La fracción de partículas infecciosas restantes se determinó mediante el uso de imágenes de fluorescencia de alto contenido y se normalizó al título infeccioso en ausencia de IgIV. Se muestran dos clones de cada biblioteca con resistencia a IgIV. Los datos de los otros clones analizados se muestran en la **Tabla 1**. **(a)** Curvas de neutralización. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$). **(b)** Imágenes de fluorescencia representativas de varias diluciones de IgIV muestran que los mutantes son capaces de la transducción de HEK293T en presencia de altas concentraciones de anticuerpos neutralizantes.

La Figura 3 representa los perfiles de neutralización de variantes de evasión de anticuerpos. Se adquirieron sueros humanos de individuos que fueron excluidos de los ensayos clínicos de hemofilia B debido a la presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra VAA. Se incubó el VAA recombinante que codifica GFP con muestras de suero humano individuales antes de la infección de las células HEK293T. La fracción de partículas infecciosas restantes se determinó mediante el uso de microscopía de fluorescencia y se normalizó al título infeccioso en ausencia de sueros humanos. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$).

El análisis de secuencia de los doce clones reveló que las dos variantes con la mayor resistencia a los anticuerpos neutralizante, la mezcla 100-3 (ver SEQ ID NO: 12) y la mezcla 100-1 (ver SEQ ID NO: 11), son cápsides mezcladas casi idénticas que contienen fragmentos de VAA1-4, VAA6 y VAA9 (**Figura 4**). Las diferencias en los aminoácidos 469 (residuo de VAA6 a residuo de VAA7) y 598 (residuo de VAA6 a residuo de VAA1) entre las dos variantes se traducen en un aumento de casi 3 veces en el título de anticuerpos neutralizantes para la mezcla 100-3 (ver SEQ ID NO: 12) (**Tabla 1**). La mezcla 100-7 variante (ver SEQ ID NO: 13), que tenía la cuarta resistencia más alta a anticuerpos neutralizantes (**Tabla 1**), es también una cápside mezclada que contiene fragmentos de VAA1, VAA6 y VAA8 (**Figura 4**), que concuerda bien con los datos reportados que muestran que VAA1 y VAA8 de tipo salvaje son eficaces para evadir anticuerpos contra VAA2. Curiosamente, la variante SM 10-2 (SEE SEQ ID NO: 10) retuvo las

mutaciones puntuales adquiridas por la variante γ 4.3 y también retuvo residuos de tipo salvaje en los sitios de saturación de mutagénesis. La variante SM 10-2 (SEE SEQ ID NO: 10) adquirió mutaciones puntuales adicionales en el residuo superficial D472N y el residuo interno L735Q.

5 **La Figura 4** representa las secuencias de aminoácidos de clones de mutagénesis de saturación/intercambio de bucle/mezclada. (a) Se muestran esquemas de la proteína de la cápside para los dos clones de cada biblioteca con las concentraciones de IgIV neutralizante más altas. Cada región está sombreada de acuerdo con el serotipo parental del que se deriva. Las flechas negras indican (de izquierda a derecha) los codones de inicio de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. Las flechas grises indican (de izquierda a derecha) las regiones de bucle de superficie I, II, III, IV y V basadas en la cápside de VAA2. (b) Se muestran modelos moleculares de la cápside VAA2 completa, basados en la estructura resuelta, para los dos clones de cada biblioteca con las concentraciones de IgIV neutralizante más altas. Cada región está sombreada de acuerdo con el serotipo parental del que se deriva. Para la mezcla de la variante 100-3 (ver SEQ ID NO: 12), las flechas negras indican diferencias con la mezcla de la variante 100-1 (ver SEQ ID NO: 11). Para la variante SM 10-2 (VER SEQ ID NO: 10), las mutaciones N449D, D472N, N551S e I698V son mutaciones de superficie (negro).

20 **Tabla 1: Se usaron títulos de anticuerpos neutralizantes de IgIV de clones de biblioteca y serotipos parentales** de IgIV humana para neutralizar vectores de VAA-GFP recombinantes con cápsides de VAA1, VAA2, VAA8 de tipo salvaje y variantes recuperadas de las bibliotecas de mutagénesis de saturación e intercambio de bucles/mezcla. Se muestra la concentración de IgIV (mg/mL) requerida para reducir la eficiencia de la suministro de genes al 50 % de la que se obtiene en ausencia de IgIV, y se compara con la concentración requerida para reducir la suministro de VAA2. Todas las variantes analizadas requirieron concentraciones más altas de IgIV que las VAA1 y VAA2 de tipo salvaje. El título de anticuerpos neutralizantes se determinó ajustando las curvas en la Figura 2 a una curva exponencial. Las SEQ ID NO se enumeran como "aminoácidos, nucleótidos".

25

Tabla 1

Clon	SEQ ID NO:	Concentración neutralizante de IgIV	Resistencia al doblez con relación a VAA2
		<i>mg/mL</i>	
VAA1	1	0,026	1,757
VAA2	2	0,015	1,000
VAA8	8	0,092	6,113
Mezcla 10-2	26, 34	0,037	2,443
Mezcla 10-6	27, 35	0,028	1,842
Mezcla 10-8	28, 36	0,084	5,583
Mezcla 100-1	11, 23	0,183	12,178
Mezcla 100-2	29, 37	0,073	4,831
Mezcla 100-3	12, 24	0,529	35,227
Mezcla 100-7	13, 25	0,090	6,025
SM 10-1	30, 38	0,071	4,732
SM 10-2	10, 22	0,113	7,519
SM 10-8	31, 39	0,051	3,409
SM 100-3	32, 40	0,074	4,941
SM 100-10	33, 41	0,066	4,393

50 La mezcla 100-3 (ver SEQ ID NO: 12), la mezcla 100-1 (ver SEQ ID NO: 11) y la mezcla 100-7 (ver SEQ ID NO: 13) de las variantes tienen perfiles de transducción que imitan los perfiles de transducción de los serotipos VAA1 y VAA6 parentales (**Figura 5**). Además, las mutaciones en SM 10-2 (ver SEQ ID NO: 10) no previenen la dependencia de la heparina (como se observa en el serotipo parental VAA2) lo que conduce a un perfil similar al VAA2 (**Figura 5**).

55 **La Figura 5** demuestra el tropismo *in vitro* de nuevas variantes de VAA. Se usaron vectores de VAA recombinantes que expresan proteína verde fluorescente para transducir un panel de líneas celulares: CHO, pgsA (que carece de todos los glicosaminoglicanos de superficie), Pro5, Lec1 (que carece de ácido siálico), HEK293T, HeLa y HT1080 (línea celular de fibrosarcoma humano) para perfilar las propiedades de transducción de las nuevas variantes de VAA. Las barras de error indican la desviación estándar ($n = 3$).

60 Aumento de la evasión de anticuerpos de las nuevas variantes de VAA evolucionadas *in vivo*

65 Para determinar el patrón de localización de la mezcla 100-3 y la mezcla 100-7 variantes, se examinó la actividad de la enzima luciferasa en varios tejidos de ratones ingenuos inyectados con VAA2, la mezcla 100-3 o la mezcla 100-7 (**Figura 6a**). La mezcla 100-7 variante muestra similar tropismo *in vivo* a VAA2, excepto por una transducción 7 veces mayor del corazón, una transducción 5 veces mayor de los pulmones y una transducción 4,5 veces menor del hígado. La mezcla 100-3 variante exhibió una transducción del cerebro más de 4 veces mayor, una transducción de los pulmones más de 3 veces mayor y una transducción de músculo 27 veces mayor que el VAA2. El análisis del

suero de estos ratones mostró que la mezcla 100-3 variante requería igual o mayores concentraciones séricas *in vitro* para neutralización que VAA1 y VAA8 para suero de ratones que recibieron vectores de suministro de genes VAA1, VAA2, VAA8 o la mezcla 100-3 (**Figura 11**). La mezcla 100-7 requería igual o mayores concentraciones séricas *in vitro* para neutralización que VAA1 para suero de ratones a los que recibieron vectores de suministro de genes VAA1, VAA2, VAA8, la mezcla 100-3 o SM 10-2 (**Figura 11**). Además, ambas variantes fueron menos neutralizadas por suero de ratones que recibieron vectores de suministro de genes VAA2 que todos los serotipos de VAA de tipo salvaje probadas. Curiosamente, la mezcla 100-3 variante también se neutralizó menos por el suero de ratones inmunizados contra ella que cualquiera de los otros serotipos o variantes probados (**Figura 11**). Estos datos ilustran la posibilidad de que estas variantes puedan usarse en combinación con serotipos de VAA de tipo salvaje o la otra variante en aplicaciones que requieren múltiples administraciones de vectores.

La Figura 11 muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes de los clones de la biblioteca y los serotipos parentales en sueros de ratón inmunizados. Se usaron sueros de ratones a los que se les administraron clones de bibliotecas o VAA de tipo salvaje para neutralizar vectores de VAA-GFP recombinantes con cápsides de VAA1, VAA2, VAA8 de tipo salvaje y variantes recuperadas de las bibliotecas de mutagénesis de saturación/mezcla/intercambio de bucle. Se muestra la dilución de suero necesaria para reducir la eficiencia de la suministro de genes al 50 % de la que se obtiene en ausencia de suero.

Para determinar la capacidad de la mezcla 100-7 y la mezcla 100-3 variantes para evadir la neutralización de anticuerpos *in vivo*, los ratones se inmunizaron pasivamente con IgIV humana antes de la inyección de VAA. La mezcla 100-7 variante tuvo una transducción cardíaca, hepática y muscular significativamente mayor que VAA2, medida por la actividad de la enzima luciferasa (**Figura 6b**). La mezcla 100-3 variante tuvo una transducción cardíaca y muscular significativamente mayor en comparación con el VAA2 (**Figura 6b**).

La Figura 6 muestra la localización y neutralización *in vivo* de nuevas variantes de VAA. (a) Se administraron vectores de VAA recombinantes que codifican la luciferasa mediante inyección en la vena de la cola a ratones hembra BALB/c. Después de 5 semanas, se determinaron los niveles de actividad luciferasa y se normalizaron a la proteína total para cada muestra analizada. (b) Se administraron vectores de VAA recombinantes que expresan la luciferasa mediante inyección en la vena de la cola a ratones BALB/c hembras 24 horas después de la inyección en la vena de la cola de 4 mg de IgIV humana. Después de 5 semanas, los niveles de expresión de luciferasa se normalizaron a la proteína total para cada muestra analizada. Las barras de error indican la desviación estándar (n = 3), * = p < 0,05. RLU, unidad relativa de luciferasa.

La variante γ 4.3, aislada de una biblioteca propensa a errores basada en VAA2 seleccionada frente a un grupo de sueros humanos individuales, contenía cuatro mutaciones puntuales (N312K, N449D, N551S e I698V). Curiosamente, dos de estas posiciones (N449 y N551) se identificaron previamente como residuos inmunogénicos mediante el uso de otras combinaciones de suero humano, lo que demuestra que los epítomos antigénicos que involucran estos sitios son el objetivo de muchos anticuerpos neutralizantes diferentes. Por lo tanto, estos sitios son objetivos interesantes y valiosos para la mutación. El emparejamiento de la evolución dirigida y el diseño racional en la biblioteca de mutagénesis de saturación dio como resultado el aislamiento de la variante SM 10-2, que era capaz de una mayor resistencia a los anticuerpos que VAA1 y VAA2 *in vitro*. La variante SM 10-2 incorpora dos mutaciones puntuales adicionales (D472N y L735Q) a las encontradas en la variante γ 4.3. Se demostró previamente que la mutación D472N aumenta el nivel de síntesis de la cápside en las células HEK293. De manera similar, el reemplazo de la cadena lateral de lisina cargada positivamente en la posición del aminoácido 735 con la cadena lateral de glutamina no cargada puede funcionar para estabilizar la cápside, ya que también está presente en la mezcla 100-7 variante a pesar de estar ubicada dentro del interior de la cápside ensamblada (**Figura 4**).

La creación de cápsides quiméricas de VAA permite la creación de variantes virales que pueden fusionar propiedades conveniente de múltiples serotipos de VAA. Aunque también se ha demostrado que VAA8 y VAA9 son mucho más resistentes a la neutralización por IgIV que VAA2, los aminoácidos específicos de estas cápsides solo estaban presentes en pequeños tramos en la superficie de las variantes mezcladas aisladas durante nuestras selecciones (**Figura 4**). La variante que muestra la evasión más eficiente de la neutralización de anticuerpos *in vitro*, la mezcla 100-3, muestra similar tropismo *in vitro* a sus serotipos parentales VAA1 y VAA6, pero a una tasa de infectividad más alta que cualquiera de los serotipos de tipo salvaje. Las diferencias en los aminoácidos 469 y 598 entre la mezcla 100-1 y la mezcla 100-3 variantes se traducen en un aumento de casi 3 veces en el título de anticuerpos neutralizantes para la mezcla 100-3. Un estudio de Lochrie y otros informó que los residuos inmunogénicos reconocidos por los sueros humanos y la IgIV son diferentes, lo que sugiere que diferentes humanos pueden producir varios anticuerpos neutralizantes para diferentes conjuntos de epítomos en la cápside de VAA y que el escape completo de la neutralización no es fácil (Lochrie y otros, J Virol. 2006 enero; 80(2):821-34). Nuestro trabajo demuestra que el uso de múltiples rondas de evolución dirigida mediante el uso de varios conjuntos de sueros diferentes que contienen diversas cantidades y potencias de anticuerpos contra VAA dará como resultado el aislamiento de nuevas variantes de VAA que son capaces de mejorar la transducción celular, tanto *in vitro* e *in vivo*, en presencia de combinaciones múltiples de anticuerpos contra VAA.

Las respuestas inmunitarias adaptativas a los componentes del vector de VAA en animales y seres humanos a menudo previenen la readministración de vectores de VAA del mismo serotipo, lo que dificulta las aplicaciones de

5 suministro de genes que requieren administraciones de múltiples vectores. Los ensayos de neutralización in vitro mediante el uso del suero de los ratones usados en los estudios de biodistribución demuestran que las variantes son menos neutralizadas por estos sueros que el VAA de tipo salvaje (**Figura 11**), que puede ser útil para estrategias de terapia génica en las que es necesaria la readministración de vectores. Por ejemplo, la mezcla 100-3 no se neutralizó por suero de ratones inyectados con VAA2, y VAA2 no se neutralizó por suero de ratones inyectados con la mezcla 100-3, lo que sugiere que esta variante puede usarse en combinación con serotipos de VAA de tipo salvaje o en aplicaciones que requieren múltiples administraciones de vectores. En conclusión, hemos utilizado la evolución dirigida para aislar nuevas variantes de VAA que son capaces de reducir la neutralización por anticuerpos contra VAA derivados de pacientes humanos individuales, suero humano combinado y suero de ratón, tanto in vitro como in vivo.

15 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a modalidades específicas de la misma, los expertos en la técnica deberán comprender que pueden realizarse diversos cambios y los equivalentes pueden sustituirse sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, pueden realizarse muchas modificaciones para adaptar una situación particular, material, composición en cuestión, proceso, etapa o etapas de un proceso, al alcance, espíritu objetivo de la presente invención. Se pretende que todas estas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones anexas a la presente.

20 Listado de secuencias

- 20 <110> Los Regentes de la Universidad de California
 Schaffer, David V.
 Kotterman, Melissa A
 Hwang, Bum-Yeol
 Koerber, James T.
- 25 <120> Variantes de virus adenoasociados y métodos de uso de las mismas
- 30 <130> BERK-216WO
- <150> US 61/829,735
- <151> 2013-05-31
- 35 <160> 41
- <170> PatentIn versión 3,5
- <210> 1
- <211> 736
- 40 <212> PRT
- <213> virus adenoasociado 1
- <400> 1
- 45 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15
- 50 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
- 55 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
- 60 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
- 65 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

30 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

80 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
340 345 350

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

5 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
645 650 655

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

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

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

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

30 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> virus adenoasociado 2

35 <400> 2

40 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

45 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

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

60 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

65 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro

ES 2 897 508 T3

115 120 125

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

10 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160

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

20 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190

25 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205

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

35 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

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

45 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

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

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

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

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

70 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350

75 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365

80 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

5

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

10

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

15

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

20

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460

25

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 465 470 475 480

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590

65

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

70

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

75

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

80

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

ES 2 897 508 T3

645 650 655

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

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

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

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

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

30 <210> 3
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> virus adenoasociado 3

35 <400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

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

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

10 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

15 Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205

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

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

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

35 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

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

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

50 Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320

55 Arg Gly Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325 330 335

60 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350

65 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365

70 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380

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

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

ES 2 897 508 T3

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

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

15 Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser
450 455 460

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

25 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn
485 490 495

30 Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn
500 505 510

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

40 Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly
530 535 540

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

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

55 Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
580 585 590

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

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

<210> 4
<211> 734
<212> PRT
20 <213> virus adenoasociado 4
<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

70 Leu Ile Glu Ser Pro Gln Gln Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys
145 150 155 160

75 Lys Gly Lys Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Val Phe Glu Asp Glu Thr
165 170 175

ES 2 897 508 T3

Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro Glu Gly Ser Thr Ser Gly Ala Met Ser
 180 185 190
 5
 Asp Asp Ser Glu Met Arg Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Val Glu Gly
 195 200 205
 10
 Gly Gln Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys
 210 215 220
 15
 Asp Ser Thr Trp Ser Glu Gly His Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr
 225 230 235 240
 20
 Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Arg Leu Gly Glu
 245 250 255
 25
 Ser Leu Gln Ser Asn Thr Tyr Asn Gly Phe Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 260 265 270
 30
 Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 275 280 285
 35
 Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Met Arg Pro Lys Ala Met Arg Val
 290 295 300
 40
 Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu
 305 310 315 320
 45
 Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp
 325 330 335
 50
 Ser Ser Tyr Glu Leu Pro Tyr Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser
 340 345 350
 55
 Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 60
 Cys Gly Leu Val Thr Gly Asn Thr Ser Gln Gln Gln Thr Asp Arg Asn
 370 375 380
 65
 Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly
 385 390 395 400
 70
 Asn Asn Phe Glu Ile Thr Tyr Ser Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser
 405 410 415
 75
 Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile
 420 425 430
 80
 Asp Gln Tyr Leu Trp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Thr Gly Thr Thr Leu

ES 2 897 508 T3

435 440 445
 5 Asn Ala Gly Thr Ala Thr Thr Asn Phe Thr Lys Leu Arg Pro Thr Asn
 450 455 460
 10 Phe Ser Asn Phe Lys Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Ser Ile Lys Gln
 465 470 475 480
 15 Gln Gly Phe Ser Lys Thr Ala Asn Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Thr
 485 490 495
 20 Gly Ser Asp Ser Leu Ile Lys Tyr Glu Thr His Ser Thr Leu Asp Gly
 500 505 510
 25 Arg Trp Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Pro
 515 520 525
 30 Ala Asp Ser Lys Phe Ser Asn Ser Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Lys
 530 535 540
 35 Gln Asn Gly Asn Thr Ala Thr Val Pro Gly Thr Leu Ile Phe Thr Ser
 545 550 555 560
 40 Glu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Asn Ala Thr Asp Thr Asp Met Trp Gly
 565 570 575
 45 Asn Leu Pro Gly Gly Asp Gln Ser Asn Ser Asn Leu Pro Thr Val Asp
 580 585 590
 50 Arg Leu Thr Ala Leu Gly Ala Val Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg
 595 600 605
 55 Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp
 610 615 620
 60 Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Ile Gly Gly Phe Gly Leu Lys His
 625 630 635 640
 65 Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro
 645 650 655
 70 Ala Thr Thr Phe Ser Ser Thr Pro Val Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr
 660 665 670
 75 Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Gln Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu
 675 680 685
 80 Arg Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly
 690 695 700

Gln Gln Asn Ser Leu Leu Trp Ala Pro Asp Ala Ala Gly Lys Tyr Thr
 705 710 715 720

5

Glu Pro Arg Ala Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr His His Leu
 725 730

10

<210> 5
 <211> 724
 <212> PRT
 <213> virus adenoasociado 5

15

<400> 5

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

20

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

25

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

30

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

35

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu
 65 70 75 80

40

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

45

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

50

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

55

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

60

Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
 145 150 155 160

65

Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
 165 170 175

70

Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
 180 185 190

75

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala
 195 200 205

ES 2 897 508 T3

5 Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
210 215 220

10 Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro
225 230 235 240

15 Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp
245 250 255

20 Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
260 265 270

25 Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln
275 280 285

30 Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val
290 295 300

35 Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr
305 310 315 320

40 Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
325 330 335

45 Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
340 345 350

50 Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
355 360 365

55 Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
370 375 380

60 Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn
385 390 395 400

65 Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
405 410 415

70 Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
420 425 430

75 Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
435 440 445

80 Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
450 455 460

ES 2 897 508 T3

Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
 465 470 475 480

5 Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
 485 490 495

10 Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
 500 505 510

15 Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
 515 520 525

20 Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
 530 535 540

25 Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
 545 550 555 560

30 Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
 565 570 575

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

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

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

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

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

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

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

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

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

80 Thr Arg Pro Leu

<210> 6
 <211> 736
 5 <212> PRT
 <213> virus adenoasociado 6

 <400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

 55 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

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

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

 65 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

ES 2 897 508 T3

225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

35 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 5
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 10
 Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 15
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 20
 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 Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590
 25
 Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 30
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 35
 Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
 625 630 635 640
 40
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 45
 Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 50
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685
 55
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700
 60
 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> 7
 <211> 737
 <212> PRT
 <213> virus adenoasociado 7

ES 2 897 508 T3

<400> 7

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

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 10

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 15

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 20

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 25

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 30

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 35

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 40

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Ala Lys Lys Arg
 130 135 140
 45

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
 145 150 155 160
 50

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 55

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
 180 185 190
 60

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Val Gly Ser Gly Thr Val Ala Ala Gly Gly
 195 200 205
 65

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn
 210 215 220
 70

Ala Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 75

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

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60 Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala Gly Asn Arg Glu Leu Gln
 450 455 460

65 Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala Glu Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480

70 Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Leu Asp
 485 490 495

75 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510

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

ES 2 897 508 T3

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

Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr Thr Leu Glu Asn Val Leu
545 550 555 560

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 Leu

60 <210> 8
<211> 738
<212> PRT
<213> virus adenoasociado 8

<400> 8

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

ES 2 897 508 T3

1 5 10 15
 5 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 10 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 15 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 20 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 25 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 30 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 35 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 40 Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 45 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
 145 150 155 160
 50 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 55 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
 180 185 190
 60 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
 195 200 205
 65 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
 210 215 220
 70 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 75 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
 245 250 255
 80 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp
 260 265 270

ES 2 897 508 T3

Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 5
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 10
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 15
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 20
 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
 25
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 30
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 35
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr
 405 410 415
 40
 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
 45
 Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
 450 455 460
 50
 Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 55
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
 485 490 495
 60
 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
 65
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile

ES 2 897 508 T3

530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Asn Leu

70 <210> 9
<211> 736
<212> PRT
<213> virus adenoasociado 9

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

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 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

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 <210> 10
<211> 735
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia de aminoácido sintética

55 <400> 10

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

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

70 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro

ES 2 897 508 T3

35 40 45
 5 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 10 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 15 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 20 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 25 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 30 Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 35 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160
 40 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 45 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190
 50 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205
 55 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 60 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 65 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 70 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270
 75 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285
 80 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300

ES 2 897 508 T3

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

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

15 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
340 345 350

20 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
355 360 365

25 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
370 375 380

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

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

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

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

50 Asp Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
450 455 460

55 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asn Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
465 470 475 480

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

65 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
500 505 510

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

75 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
530 535 540

80 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Ser Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
545 550 555 560

85 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr

ES 2 897 508 T3

50 55 60

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

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

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

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

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

30 Pro Leu Ile Glu Ser Pro Gln Gln Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly
145 150 155 160

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

40 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
 325 330 335
 5
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Asp Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350
 10
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
 355 360 365
 15
 Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 20
 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
 25
 Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 30
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 35
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 40
 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
 45
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 50
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 55
 Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 60
 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
 65
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala

ES 2 897 508 T3

580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 <210> 12
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de aminoácido sintética

60 <400> 12

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

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

75 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

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

85 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

ES 2 897 508 T3

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Asp Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350
 5
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
 355 360 365
 10
 Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 15
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400
 20
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 25
 Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 30
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 35
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 40
 Arg Gly Ser Pro Thr Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 45
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 50
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 55
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 60
 Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 65
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 70
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 75
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590
 80
 Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

ES 2 897 508 T3

595 600 605

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

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

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

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

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

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

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

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

45 <210> 13
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de aminoácido sintética

55 <400> 13

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

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

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

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

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

85 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

ES 2 897 508 T3

85 90 95

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

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

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

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

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

30 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

80 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
 5
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 10
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400
 15
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 20
 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
 25
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 30
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 35
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 40
 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
 45
 Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 50
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 55
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 60
 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
 65
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

610 615 620

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

40 <400> 14
gcggaagctt cgatcaacta cgc 23

45 <210> 15
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética

55 <400> 15
ggggcggccg caattacaga ttacgagtcg ggtatctggt g 41

60 <210> 16
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<221> misc_característica

ES 2 897 508 T3

<222> (5)..(6)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 16
 5 cattnkgac cagtctagga actgg 25

 <210> 17
 <211> 90
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética
 15

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (21)..(22)
 20 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (69)..(70)
 25 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 17
 gccacaagga cgatgaagaa nnktttttc ctcagagcgg ggttctcatc tttggaagc 60
 30 aaggctcann kaaacaagt gtggacattg 90

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

 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética
 40

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (18)..(19)
 45 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 18
 ccaacctcca gagaggcnk agacaagcag ctacc 35
 50

 <210> 19
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

 60 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

 65 <220>
 <221> misc_característica

ES 2 897 508 T3

<222> (42)..(43)
 <223> n e s a, c, g, o t

<400> 19
 5 ccaactacaa caagtctnkn aatgtggact ttactgtgga cnnkaatggc gtgtatt 57

<210> 20
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

15 <400> 20
 catgggaaag gtgccagacg 20

<210> 21
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 21
 accatcggca gccatacctg 20

30 <210> 22
 <211> 2208
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 22
 40 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga 60
 cagtgggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaacg cgcgagagcg gcataaggac 120
 gacagcaggg gtctgtgtct tcttgggtac aagtacctcg gaccctcaa cggactcgac 180
 45 aagggagagc cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa agcctatgac 240
 cggcagctcg acagcggaga caaccctgac ctcaagtaca accacgccga cgcgagagtt 300
 50 caggaacgcc ttaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcggacgagc agtctccag 360
 gcgaaaaaaga gggttcttga acctctgggc ctggttgagg aacctgtaa gacggctccg 420
 ggaaaaaaga ggccgtaga gactctctct gtggagccag actcctcctc gggaaccgga 480
 55 aaggcgggcc agcagcctgc aagaaaaaga ttgaatttg gtcagactgg agacgcagac 540
 tcagtacctg acccccagcc tctcggacag ccaccagcag ccccctctgg tctgggaact 600
 60 aatac gatgg ctacaggcag tggcgacca atggcagaca ataacgaggg cgccgacgga 660
 gtgggtaatt cctcgggaaa ttggcattgc gattccacat ggatgggcca cagagtcac 720
 accaccagca cccgaacctg ggcctgccc acctacaaca accacctcta caaacaatt 780
 65 tccagccaat caggagcctc gaacgacaat cactacttg gctacagcac ccctggggg 840

ES 2 897 508 T3

tattttgact tcaacagatt ccaactgccac tttcaccac gtgactggca aagactcatc 900

5 aacaacaact ggggattccg acccaagaga ctcaagtca agctcttaa cattcaagtc 960

aaagaggta cgcagaatga cggtagcagc acgattgccca ataaccttac cagcacggtt 1020

cagggtgtta ctgactcggga gtaccagctc cctgactgcc tcggctcggc gcatcaagga 1080

10 tgcctcccgc cgttcccagc agacgtctc atggtgccac agtatggata cctcacctg 1140

aacaacggga gtcaggcagt aggacgtct tcaatttact gcctggagta ctttcctct 1200

15 cagatgctgc gtaccggtaa caacttacc ttcagctaca cttttgagga cgttccttc 1260

cacagcagct acgctcacag ccagagtctg gaccgtctca tgaatcctct catcgaccag 1320

tacctgtatt acttgagcag aacagacact ccaagtggaa ccaccacgca gtcaaggctt 1380

20 cagttttctc aggccggagc gagtgcatt cggaaccagt ctaggaactg gcttcctgga 1440

ccctgttacc gccagcagcg agtatcaaag acatctcggg ataacaaca cagtgaatac 1500

25 tctgtgactg gagctacca gttaccctc aatggcagag actctctggt gaatccgggc 1560

ccggccatgg caagccaca ggacgatgaa gaaaagttt ttctcagag cggggttctc 1620

atctttggga agcaaggctc agagaaaaca agtgtggaca ttgaaaaggt catgattaca 1680

30 gacgaagagg aatcaggac aaccaatccc gtggctacgg agcagtatgg ttctgtatct 1740

accaacctcc agagaggcaa cagacaagca gctaccgag atgtcaacac acaaggcgtt 1800

35 cttccaggca tggctcggca ggacagagat gtgtacctc aggggcccat ctgggcaaag 1860

attccacaca cggacggaca tttcacccc tctcccctca tgggtggatt cggactaaa 1920

cacctctc cacagattct catcaagaac accccggtac ctgcgaatcc ttcgaccacc 1980

40 ttcagtgcgg caaagttgc ttctctatc acacagtact ccacgggaca ggtagcgtg 2040

gagatcgagt gggagctgca gaaggaaaac agcaaacgt ggaatcccga agttcagtag 2100

45 acttcaact acaacaagtc tgtaatgtg gactttactg tggactacta tggcgtgtat 2160

tcagagctc gccccattgg caccagatac ctgactcgtat atcagtaa 2208

<210> 23

50 <211> 2211

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 23

atggctgctg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga 60

60 cagtgggtgga agctcaaac tggcccacca ccaccaaac cgcagagcgc gcataaggac 120

gacagcaggg gtctgtgct tctgggttac aagtacctc gaccctcaa cggactcgac 180

65 aagggagagc cggtaacga ggcagacgca gcggccctcg agcacgaca ggctctagac 240

cagcagctca aggccgtgta caaccctac ctcaagtaca accacgccga cgcggagttc 300

ES 2 897 508 T3

cagcagcggc ttcagggcga cacatcgtt gggggcaacc tcggcagagc agtctccag 360
 5 gcaaaaaaga gggttctga acctctgtg ctggtgagc aagcgggtga gacggctct 420
 ggaaagaaga gaccgttgat tgaatcccc cagcagcccg actcctccac gggatcggc 480
 aaaaaaggca agcagccggc taaaagaga ctcaatttg gtcagactgg cgactcagag 540
 10 tcagtccccg acccacaacc tctcggagaa cctccagcaa cccccgtgc tgtgggacct 600
 actacaatgg cttcaggtagg tggcgacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 660
 15 gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggga cagagtcac 720
 accaccagca cccgcacctg ggcctgccc acctacaata accacctcta caagcaaac 780
 tccagtgtt caacggggg cagaacgac aaccactact tcggctacag caccctctg 840
 20 gggatattg actcaacag attcactgc cactttcac cacgtgactg gcagcgactc 900
 atcaacaaca attggggatt ccggccaag agactcaact taaactct caacatcaa 960
 25 gtcaaggagg tcacgacgaa tgatggcgc acaaccatg ctaataacct taccagcag 1020
 gtcaagtct tctcggactc agactatcag ctcccgtacg tgctcgggc ggctcagag 1080
 ggctgcctcc cgccgtccc agcagacgtc tcatggtgc cacagtatg atacctacc 1140
 30 ctgaacaacg ggagtcagc agtaggacgc tctcattt actgcctgga gtacttct 1200
 tctcagatgc tgcgtaccg aaacaactt acctcagct acactttga ggacgttct 1260
 35 ttccacagca gctacgctca cagccagagt ctggaccgct tcatgaatcc tctcatgac 1320
 cagtacctgt attacctgaa cagaactcag aatcagtcg gaagtgccca aaacaaggac 1380
 ttgctgtta gccgggggc tccagctggc atgtctgtc agcccaaaa ctggctacct 1440
 40 ggaccctgt atcggcagca ggcgtttct aaaacaaaa cagacaaca caacagcaac 1500
 ttacctgga ctggtgttc aaaatataac ctaatgggc gtgaatctat aatcaacct 1560
 45 ggactgcta tggcctcaca caaagacgac aaagacaagt tcttccat gagcgggtgc 1620
 atgattttg gaaaggagag cgccggagct taaacactg cattggacaa tgtcatgac 1680
 acagacgaag aggaaatcaa agccactaac cccgtggcca ccgaaagatt tgggactgtg 1740
 50 gcagtcaatc tccagagcag cagcacagac cctcgcaccg gagatgtgca tttatggga 1800
 gccttacctg gaatggtg gcaagacaga gacgtatacc tgcagggtcc cattgggcc 1860
 55 aaaatctc acacagatgg acacttcac ccgtctctc ttatggcgg cttggactc 1920
 aagaaccgc ctctcagat cctcatcaa aacacgcctg ttcctgcgaa tcctccggcg 1980
 gagtttcag ctacaaagt tcttcattc atcaccat actccacagg acaagtgagt 2040
 60 gtggaaatg aatgggagct gcagaagaa aacagcaagc gctggaatcc cgaagtgcag 2100
 tacacatcca attatgcaaa atctgccaac gttgattta ctgtggacaa caatggact 2160
 65 tatactgagc ctgccccat tggcaccgt tacctaccc gtcccctga a 2211

ES 2 897 508 T3

<210> 24
 <211> 2211
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 24
 10 atggctgctg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga 60
 cagtggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaacg cgcagagcg gcataaggac 120
 15 gacagcaggg gtcttgct tctgggtac aagtacctcg gaccttcaa cggactcgac 180
 aagggagagc cggtaacga ggcagacgca gcggccctcg agcacgacaa ggctacgac 240
 cagcagctca agccgggta caaccctac ctcaagtaca accacgccga cgcggagttc 300
 20 cagcagcggc ttcagggcga cacatcgtt gggggcaacc tcggcagagc agtctccag 360
 gccaaaaaga gggttctga acctctgtg ctggtgagc aagcgggta gacggctct 420
 25 ggaagaaga gaccgtgat tgaatcccc cagcagcccg actcctccac gggatcggc 480
 aaaaaaggca agcagccggc taaaagaga ctcaatttg gtcagactgg cgactcagag 540
 tcagtccccg acccacaacc tctggagaa cctccagca cccccgtgc tgtgggacct 600
 30 actacaatgg cttcaggtgg tggcgacca atggcagaca ataacgaag cgcgcagcga 660
 gtgggtaatg cctcaggaa ttggcattgc gattccatc ggctgggca cagagtcac 720
 accaccagca cccgcacctg ggcctgccc acctacaata accacctta caagcaaac 780
 35 tccagtgtt caacggggc cagcaacgac aaccactact tcggctacag caccctctgg 840
 gggattttg actcaacag attccactgc cactttcac cactgactg gcagcgactc 900
 40 atcaacaaca attggggatt ccggccaag agactcaact taaactctt caacatcaa 960
 gtcaaggagg tcacgacgaa tgatggcgtc acaaccatcg ctaataacct taccagcagc 1020
 45 gtcaagtct tctcgactc agactatcag ctcccgtacg tgctcgggtc ggctcagcag 1080
 ggctgcctcc cgccgtccc agcagacgtc tcatggtgc cacagatgg atacctcacc 1140
 ctgaacaacg ggagtcagc agtaggacgc tctcattt actgcctgga gtacttct 1200
 50 tctcagatgc tgcgtaccg aaacaactt acctcagct acactttga ggacgttct 1260
 ttccacagca gctacgctca cagccagagt ctggaccgtc tcatgatcc tctcatgac 1320
 cagtacctgt attacctgaa cagaactcag aatcagtcg gaagtgccca aaacaaggac 1380
 55 ttgctgtta gccgggggtc tccaactggc atgtctgtc agcccaaaa ctggctacct 1440
 ggaccctgt atcggcagca gcgcgttct aaaacaaaa cagacaaca caacagcaac 1500
 60 ttacctgga ctggtgctc aaaatatac ctaatgggc gtgaatctat aatcaacct 1560
 ggactgcta tggcctcaca caaagcagc aaagacaagt tcttccat gagcgggtc 1620
 atgattttg gaaaggagag cgcggagct taaacactg cattggacaa tgctatgatc 1680
 65 acagacgaag aggaaatcaa agccactaac cccgtggcca ctgaaagatt tgggactgtg 1740

ES 2 897 508 T3

gcagtcaatc tccagagcag cagcacagac cctgcgaccg gagatgtgca tgccatggga 1800

gccttacctg gaatgggtg gcaagacaga gacgtatacc tgcagggctc tatttgggcc 1860

5 aaaattcctc acacggatgg acactttcac ccgtctcctc tcatggggcg ctttggactc 1920

aagaaccgcg ctctcagat cctcatcaaa aacacgcctg ttctgcgaa tcctccggcg 1980

10 gagttttcag ctacaaagt tgcttcattc atcaccagc attccacagg acaagtgagc 2040

gtggagattg aatgggagct gcagaaagaa aacagcaaac gctggaatcc cgaagtgcag 2100

tatacatcta actatgcaaa atctgccaac gttgatttca ctgtggacaa caatggactt 2160

15 tatactgagc ctgccccat tggcaccctg tacctcaccg gtcccctgta a 2211

<210> 25

20 <211> 2211

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<400> 25

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctgaggaca acctctctga gggcattcgc 60

30 gagtgggtgg cgctgaaacc tggagccccg aagcccaaag ccaaccagca aaagcaggac 120

gacggccggg gtctgggtct tcttggtac aagtacctcg gaccctcaa cggactcgac 180

aaggggggagc ccgtaacgc ggcggatgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

35 cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgctgtata accacgccga cgccgagttt 300

caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggagcgc agtcttccag 360

40 gccaagaagc gggttctcga acctctcgtt ctggttgagg aaggcgctaa gacggctcct 420

ggaaagaaac gtccggtaga gcaatcgcca caagagccag actcctcctc gggcatcggc 480

aagacaggcc agcagccccg taaaaagaga ctcaattttg gtcagactgg cgactcagag 540

45 tcagtccccg accacaacc tctggagaa cctccagcaa cccccgctgc tgtgggacct 600

actacaatgg cttcaggcgg tggcgcacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 660

50 gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcca cagagtcatc 720

accaccagca ccggaacatg ggccttgccc acctataaca accacctcta caagcaaatc 780

tccagtgctt cgacgggggc cagcaacgac aaccactact tcggctacag caccctctgg 840

55 gggtatattg actttaacag attccactgc cacttttcac cacgtgactg gcagcgactc 900

atcaacaaca actggggatt ccggccaag agactcagct tcaagctctt caacatccag 960

60 gtcaaggagg tcacgacgaa tgatggcgtc acaaccatcg ctaataacct taccagcagc 1020

gttcaagtct tctcgactc ggagtaccag ctccgtacg tcctcggctc tgcgcaccag 1080

ggctgcctcc ctccgtccc ggcggacgtg tcatgattc cgcaatacgg ctacctgacg 1140

65 ctcaacaatg gcagccaagc cgtgggacgt tcatcctttt actgcctgga atatttcct 1200

ES 2 897 508 T3

tctcagatgc tgagaacggg caacaacttt acctcagct acaccttga ggaagtgcct 1260
 5 ttccacagca gctacgcgca cagccagagc ctggaccggc tgatgaatcc tctcatcgat 1320
 caatacctgt attacctgaa cagaactcaa aatcagtccg gaagtgccca aaacaaggac 1380
 ttgctgttta gccgtgggtc tccagctggc atgtctgttc agcccaaaaa ctggctacct 1440
 10 ggaccctgtt atcggcagca ggcggtttct aaaacaaaaa cagacaacaa caacagcaat 1500
 tttacctgga ctgggtcttc aaaatataac ctcaatgggc gtgaatccat catcaaccct 1560
 15 ggcaactgta tggcctcaca taaagacgac gaagacaagt tctttccat gagcgggtgc 1620
 atgatttttg gaaaagagag cgccggagct tcaaactg cattggacaa tgcatgatt 1680
 acagacgaag aggaaattaa agccactaac cctgtggcca ccgaaagatt tgggaccgtg 1740
 20 gcagtcaatt tccagagcag cagcacagac cctgcgaccg gagatgtgca tgctatggga 1800
 gcattacctg gcatggtgtg gcaagataga gacgtgtacc tgcaggttcc cattggggcc 1860
 25 aaaattcctc acacagatgg acactttcac ccgtctctc ttatggggcg ctttgactc 1920
 aagaaccgcg ctctcagat cctcatcaaa aacacgcctg ttctgcgaa tcctccggcg 1980
 gagtttcag ctacaaagt tgctcattc atcacccaat actccacagg acaagtgagc 2040
 30 gtggagattg aatgggagct gcagaaagaa aacagcaaac gctggaatcc cgaagtgcag 2100
 tatacatcta actatgcaaa atctgccaac attgatttca ctgtggacaa caatggactt 2160
 35 tatactgagc ctgccccat tggcaccctg tacctcacc gtccccagta a 2211

<210> 26
 <211> 736
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

45 <400> 26

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

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

20 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

25 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

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

35 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

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

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

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

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

60 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

65 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

40 <400> 27

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

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

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

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

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

65 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

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

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

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

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

25 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

75 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350

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

ES 2 897 508 T3

Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 5

Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400
 10

Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 15

Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 20

Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 25

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 30

Arg Gly Ser Pro Thr Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 35

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 40

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 45

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 50

Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 55

Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 60

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 65

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590
 70

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 75

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 80

ES 2 897 508 T3

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

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

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

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

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

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

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

35 <210> 28
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

 <400> 28

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

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

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

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

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

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

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

80

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

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

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

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

20 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Lys Glu Thr Thr Asp Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr
 325 330 335

70 Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly
 340 345 350

75 Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met
 355 360 365

80 Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val
 370 375 380

ES 2 897 508 T3

Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu
 385 390 395 400
 5

Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe
 405 410 415
 10

His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro
 420 425 430
 15

Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser
 435 440 445
 20

Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Thr
 450 455 460
 25

Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg
 465 470 475 480
 30

Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe
 485 490 495
 35

Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile
 500 505 510
 40

Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Asp Lys
 515 520 525
 45

Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly
 530 535 540
 50

Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Ala
 545 550 555 560
 55

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu
 565 570 575
 60

Gln Ser Ser Pro Ala Thr Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly
 580 585 590
 65

Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala
 595 600 605
 70

Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly
 610 615 620
 75

Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr
 625 630 635 640
 80

ES 2 897 508 T3

Pro Val Pro Ala Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala
645 650 655

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

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

15 Tyr Thr Ser Asn Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp
690 695 700

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

Thr Arg Pro

25 <210> 29
<211> 736
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos sintética
<400> 29

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

40 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

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

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

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

60 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

65 Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

ES 2 897 508 T3

130 135 140

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

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

15 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350

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

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

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

ES 2 897 508 T3

Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 5
 Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 10
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 15
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 20
 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
 25
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 30
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 35
 Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 40
 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
 45
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590
 50
 Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 55
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 60
 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 Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 65
 Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr

ES 2 897 508 T3

660 665 670

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

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

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

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

25 <210> 30
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

35 <400> 30

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

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

50 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

85 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly

ES 2 897 508 T3

145 150 155 160

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

10 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 5
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 10
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 15
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 20
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 25
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 30
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 35
 Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 40
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 45
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 50
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590
 55
 Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 60
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 65
 Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
 625 630 635 640
 70
 Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 75
 Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 80
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln

ES 2 897 508 T3

675 680 685

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

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

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

20 <210> 31
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

30 <400> 31

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

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

45 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

80 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160

85 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

ES 2 897 508 T3

165 170 175

5 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190

10 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205

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

20 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

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

30 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

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

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

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

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

55 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350

60 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365

65 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380

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

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

80 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
 5
 Asp Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460
 10
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 15
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
 485 490 495
 20
 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
 25
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 530 535 540
 30
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Ser Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 545 550 555 560
 35
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 565 570 575
 40
 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
 45
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
 610 615 620
 50
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
 625 630 635 640
 55
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
 645 650 655
 60
 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
 65
 Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr

ES 2 897 508 T3

690 695 700

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

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

15 <210> 32
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética

25 <400> 32

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

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

35 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

70 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160

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

80 Gly Asp Ala Asn Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro

ES 2 897 508 T3

180 185 190

5 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205

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

15 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

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

25 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

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

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

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

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

50 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350

55 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365

60 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380

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

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

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

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

ES 2 897 508 T3

Asp Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460
 5
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 10
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
 485 490 495
 15
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
 500 505 510
 20
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
 515 520 525
 25
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 530 535 540
 30
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Ser Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 545 550 555 560
 35
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 565 570 575
 40
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590
 45
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
 595 600 605
 50
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
 610 615 620
 55
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
 625 630 635 640
 60
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
 645 650 655
 65
 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 Val 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

ES 2 897 508 T3

705 710 715 720

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

10 <210> 33
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos sintética
 <400> 33

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

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

30 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

65 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160

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

75 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
 180 185 190

80 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
 195 200 205

ES 2 897 508 T3

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

10 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

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

20 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

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

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

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

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

45 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350

50 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365

55 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380

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

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

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

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

80 Asp Ala Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460

ES 2 897 508 T3

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 465 470 475 480

5 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
 10 500 505 510

Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
 15 515 520 525

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 20 530 535 540

Gln Gly Ser Glu Lys Thr Ser Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 25 545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 30 565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 35 580 585 590

Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
 40 595 600 605

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
 45 610 615 620

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
 50 625 630 635 640

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
 55 645 650 655

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
 60 660 665 670

Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys
 65 675 680 685

Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr
 70 690 695 700

Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr
 75 705 710 715 720

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 80 725 730 735

ES 2 897 508 T3

<210> 34
 <211> 2211
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

10 <400> 34
 atggctgccg atggtatct tcagattgg ctgaggaca acctctcga gggcattcgc 60
 gagtggggg actgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac 120
 15 gacggccggg gtctgggtct tctggctac aagtacctcg gaccctcaa cggactcgac 180
 aagggggagc ccgtaacgc ggcgatgca gggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
 cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctctgtata accacgccga cgccgagttt 300
 20 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtcttt gggggcaacc tcggcgagc agtctccag 360
 gccaaaaaga gggttctga acctctcggc ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420
 25 ggaagaaac gtccggtaga gcagtcgcca caagagccag actcctcctc gggcattggc 480
 aagacaggcc agcagccgc taaaaagaga ctcaatttg gtcagactgg cgactcagag 540
 tcagtccccg acccacaacc tctcgagaa cctcccgag cccctcagg tgtgggatct 600
 30 cttaaatgg cttcagtggt tggcgacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 660
 gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggca cagagtcac 720
 35 accaccagca cccgacctg ggcctgccc acctacaata accacctcta caagcaaatc 780
 tccagtgtt caacgggggc cagcaacgac aaccactact tcggctacag caccctgg 840
 gggatattg actcaacag attcactgc cactttcac cacgtgactg gcaaagactc 900
 40 atcaacaaca attggggatt cggcccaag agactcaact tcaagctctt caacatcaa 960
 gtcaaggagg tcagacgaa tgatggcgtc acgaccatcg ctaataacct taccagcagc 1020
 45 gttcaagtct tctggactc ggagtaccag ttgccgtacg tctcggctc tgcgcaccag 1080
 ggctgcctcc ctccgtccc ggcggacgtg tcatgattc cgagtcagg ctacctaacg 1140
 ctcaacaatg gcagccaggc agtgggacgg tcatccttt actgcctgga atattccca 1200
 50 tcgcagatgc tgagaacggg caacaacttt acctcagct acaccttga ggaagtgcct 1260
 ttccacagca gctacgcgca cagccagagc ctggaccggc tgatgaatcc tctcatcgac 1320
 55 cagtacctgt attacctgaa cagaactcaa aatcagtcgg gaagtgccca aaacaaggac 1380
 ttgctgtta gccgtgggtc tccagctggc atgtctgtc agcccaaaa ctggctacct 1440
 ggaccctgt accggcagca gtgcgttct aaaacaaaa cagacaaca caacagcaac 1500
 60 ttacctgga ctggtgctc aaaatatac ctaatgggc gtgaatctat aatcaacct 1560
 ggactgcta tggcctaca caaagacgac aaagacaagt tcttccat gagcgggtc 1620
 65 atgattttg gaaaggagag cgccggagct tcaaacactg cattggacaa tgcatgatc 1680

ES 2 897 508 T3

acagacgaag aggaaatcaa agccactaac cccgtggcca ccgaaagatt tgggactgtg 1740
 gcagtcaatc tccagagcag cagcacagac cctgcgaccg gagatgtgca tgttatggga 1800
 5 gccttacctg gaatggtgtg gcaagacaga gacgtatacc tgcaggggcc tatttggggc 1860
 aaaattcctc acacagatgg acactttcac ccgtctctc ttatggggcg ctttgactc 1920
 aagaaccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacgcctg ttctgcgaa tcctccggcg 1980
 10 gagtttcag ctacaaagt tgctcattc atcaccaat actccacagg acaagtgagc 2040
 gtggagattg aatgggagct gcagaaagaa aacagcaagc gctggaatcc cgaagtgcag 2100
 15 tacacatcca attatgcaaa atctgccaac gttgattca ctgtggacaa caatggactt 2160
 tatactgagc ctgccccat tggcaccctg tacctaccc gtcccctgta a 2211

 20 <210> 35
 <211> 2211
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

 <400> 35
 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60
 30 gaatggtggg actgaaacc tggagccccg aaacccaaag tcaaccagca aaagcaggac 120
 aacgctcggg gtctgtgct tccgggttac aaatacctcg gaccctcaa cggactcgac 180
 35 aagggggagc ccgtcaacgc ggccgacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcttacgac 240
 cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctccgtata accacgccga cgccgagttt 300
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc ttggacgagc agtcttcag 360
 40 gccaagaaga gggttctga acctttgtg ctggttgagg aaggtgctaa gacggctcct 420
 ggaaagaaac gtccggtaga gcagtcgcca caagagccag actcctcctc gggcattggc 480
 45 aagacaggcc agcagcccgc taaaaagaga ctcaatttg gtcagactgg cgactcagag 540
 tcagtccccg accacaacc tctcgagaa cctccagcaa cccccgtgc tggggacct 600
 actacaatgg cttcaggcgg tggcgcacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 660
 50 gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggca cagagtcatc 720
 accaccagca cccgcacctg ggcctgccc acctacaata accacctcta caagcaaac 780
 55 tccagtgtct caacgggggc cagcaacgac aaccactact tgggtacag caccctgg 840
 ggtattttg actcaacag attcactgc cactttcac cacgtgactg gcaaagactc 900
 atcaacaaca attggggatt cggcccaag agactcaact tcaagctctt caacatcaa 960
 60 gtcaaggagg tcacgacgaa tgatggcgtc acgacctcg ctaataacct taccagcag 1020
 gttcaagtct tctcgactc ggagtaccag ttgccgtacg tcctcggtc tgcgcaccag 1080
 65 ggctgcctcc ctccgtccc ggccgacgtg tcatgattc cgcaatacgg ctacctgacg 1140

ES 2 897 508 T3

ctcaacaatg gcagccaggc agtgggacgg tcatccttt actgcctgga atattccca 1200
 tcgcagatg tgagaacggg caataactt accttcagct acactttga ggacgttct 1260
 5 ttccacagca gctacgctca cagccagagc ctggaccggc tgaatgatcc tctcatcgac 1320
 cagtacctgt attacctgaa cagaactcag aatcagtccg gaagtgccca aaacaaggac 1380
 10 ttgctgttta gccgtgggic tccaactggc atgtctgttc agcccaaaaa ctggctacct 1440
 ggaccctgtt atcggcagca gcgcgtttct aaaacaaaa cagacaacaa caacagcaac 1500
 tttacctgga ctggtgcttc aaaatataac ctaatgggc gtgaatctat aatcaaccct 1560
 15 ggactgcta tggcctcaca caaagacgac gaagacaagt tcttcccat gagcgggtgc 1620
 atgattttg gaaaggagag cgccggagct tcaaacactg cattggacaa tgcatgatc 1680
 acagacgaag aggaaatcaa agccactaac cccgtggcca ctgaaagatt tgggactgtg 1740
 20 gcagtcaatc tccagagcag cagcacagac cctgcgaccg gagatgtgca tgccatggga 1800
 gccttacctg gaatggtgtg gcaagacaga gacgtatacc tgcagggtcc tatttgggcc 1860
 25 aaaattctc acacggatgg acactttcac ccgtctctc tcatgggagg ctttggactt 1920
 aagcaccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacgcctg ttctgcgaa tcctccggca 1980
 gagtttcgg ctacaaagt tgctcattc atcaccagc attccacagg acaagtgagc 2040
 30 gtggagattg aatgggagct gcagaagaa aacagcaaac gctggaatcc cgaagtgcag 2100
 tatacatcta actatgcaaa atctgccaac gttgattca ctgtggacaa caatggactt 2160
 35 tatactgagc ctgccccat tggcaccctg tacctaccc gtcccctgta a 2211

<210> 36
 <211> 2208
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (955)..(955)
 50 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (971)..(972)
 55 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (981)..(981)
 60 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (986)..(986)
 65 <223> n es a, c, g, o t

ES 2 897 508 T3

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1235)..(1235)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1694)..(1696)
 <223> n es a, c, g, o t
 10
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1698)..(1698)
 <223> n es a, c, g, o t
 15
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1763)..(1765)
 <223> n es a, c, g, o t
 20
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1778)..(1778)
 <223> n es a, c, g, o t
 25
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (2204)..(2204)
 <223> n es a, c, g, o t
 30
 <400> 36
 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60
 35
 gaatggtggg acttgaacc tggagccccg aaacccaag tcaaccagca aaagcaggac 120
 aacgctcggg gtcttgtct tccgggttac aaatacctcg gaccctcaa cgactcgac 180
 aagggggagc cgtcaacgc ggccgacgca gccgccctcg agcacgacaa ggctacgac 240
 40
 cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctctcgtata accacgccga cgccgagttt 300
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc ttggacgagc agtcttcag 360
 45
 gccaagaaga gggttctcga accttttggc ctggttgagg aagtgctaa gacggctcct 420
 ggaagaagaac gtccggtaga gcagtcgcca caagagccag actcctcctc gggcattggc 480
 aagacaggcc agcagccccg taaaagaga ctcaattttg gtcagactgg cgactcagag 540
 50
 tcagtccccg acccacaacc tctcggagaa cctccagcaa cccccgctgc tgtgggacct 600
 actacaatgg ctccaggcgg tggcgcacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 660
 55
 gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcca cagagtcac 720
 accaccagca cccgaacatg ggcctgccc acctataaca accacctcta caagcaaatc 780
 tccagtgtct caacgggggc cagcaacgac aaccactact tcggctacag caccccctgg 840
 60
 gggatttttg attcaacag attcactgc cacttttcac cacgtgactg gcagcgactc 900
 atcaataaca attggggatt cggcccaag agactcaact tcaaactctt caacntccaa 960
 65
 gtcaaggagg nnacgacgaa ngatgncgtc acaaccatcg ctaataacct taccagcagc 1020
 gttcaagtct tctcggactc ggagtaccag ctccgtacg tcctcggctc tggcaccag 1080

ES 2 897 508 T3

ggctgcctcc ctccgttccc ggcgagctg ttcattgattc cgcaatacgg ctacctgacg 1140
 ctcaacaatg gcagccaggc agtgggacgg tcatccttt actgcctgga atattccca 1200
 5 tgcagatgc tgagaacggg caataacttt acctncagct acactttga ggacgttct 1260
 ttccacagca gctacgctca cagccagagc ctggaccggc tgatgaatcc tctcatcgac 1320
 10 cagtacctgt attacctgaa cagaactcag aatcagtcgg gaagtgccca aaacaaggac 1380
 ttgctgttta gccgtgggtc tccaactggc atgtctgttc agcccaaaaa ctggctacct 1440
 15 ggaccctgtt atcggcagca ggcggtttct aaaacaaaa cagacaaca caacagcaac 1500
 ttacctgga ctggctctc aaaatataac ctaaatgggc gtgaatctat aatcaacct 1560
 ggactgcta tggcctcaca caaagacgac gaagacaagt tcttcccat gagcgggtgc 1620
 20 atgattttg gaaaggagag cgccggagct tcaaactcgt cattggacaa tgcattgatc 1680
 acagacgaag agannnchna gccactaacc ccgtggccac tgaagattt gggactgtgg 1740
 cagtcaatct ccaagcagca cannnacct gcgaccgnag atgtgcatgc catgggagcc 1800
 25 ttacctggaa tgggtggga agacagagac gtatactgc agggctctat tgggcaaaa 1860
 attcctcaca cggatggaca cttcaccgg tctccttca tggcgggctt tggacttaag 1920
 30 caccgcctc ctcatgctc catcaaaaac acgcctgttc ctgcaatcc tccggcagag 1980
 tttcggcta caaagttgc ttcattcctc acccagatt ccacaggaca agtgagcgtg 2040
 35 gagattgaat gggagctgca gaaagaaaac agcaaacgct ggaatcccga agtgacgat 2100
 acatctaact atgcaaaatc tgccaacgtt gatttactg tggacaaca tggactttat 2160
 actgagctc gccccattgg caccggtac ctacccgctc ccngtaa 2208
 40
 <210> 37
 <211> 2211
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética
 <400> 37
 50 atggctccg atggttatct tccagattgg ctgaggaca acctcttga gggcatccgc 60
 gagtggggg acttgaacc tggagccccg aaaccxaaag ccaaccagca aaagcaggac 120
 gacggccggg gtctgggtct tctggctac aagtacctcg gaccctcaa cggactcgac 180
 55 aagggggagc ccgcaacgc ggccgatgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
 cagcagctca gagcgggtga caatccgtac ctgcgtgata accacgccga cgccgagttt 300
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360
 60 gccaagaaga gggttctcga accttttgg ctggttgagg aaggtgctaa gacggctcct 420
 ggaagaaac gtccggtaga gcagtcgcca caagagccag actcctcctc gggcattggc 480
 65 aagacaggcc agcagccccg taaaagaga ctcaatttg gtcagactgg cgactcagag 540

ES 2 897 508 T3

tcagtccccg acccacaacc tctcggagaa cctccagcaa cccccgctgc tgtgggacct 600
 actacaatgg cttcaggcgg tggcgcacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 660
 5 gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcca cagagtcatc 720
 accaccagca cccgaacatg ggccttgccc acctataaca accacctcta caagcaaatc 780
 10 tccagtgctt caacgggggc cagcaacgac aaccactact tgggctacag caccctctgg 840
 gggattttg attcaacag attcactgc cattctcac cacgtgactg gcagcgactc 900
 atcaacaaca atggggatt cggcccaag agactcaact tcaaactctt caacatcaa 960
 15 gtcaaggagg tcacgacgaa tgatggcgtc acaacctcgt ctaataacct taccagcagc 1020
 gttcaagtct tctcggactc ggagtaccag ctccgtacg tctcggctc tgcgcaccag 1080
 ggctgcctcc ctccgttccc ggcggacgtg tcatgattc cgcagtacgg ctacctaacg 1140
 20 ctcaacaatg gcagccaggc agtgggacgg tcatccttt actgcctgga atattccca 1200
 tcgcagatgc tgagaacggg caataacttt acctcagct acacctcga ggacgtgctt 1260
 25 ttccacagca gctacgcgca cagccagagc ctggaccggc tgatgaatcc tctcatcgac 1320
 cagtacctgt attacctgaa cagaactcag aatcagtcgg gaagtgccca aaacaaggac 1380
 ttgctgttta gccgggggtc tccagctggc atgtctgttc agcccaaaaa ctggctacct 1440
 30 ggaccctgtt accggcagca gcgcgtttct aaaacaaaaa cagacaacaa caacagcaac 1500
 ttacctgga ctggtgctc aaaatataac ctaatgggc gtgaatctat aatcaacctt 1560
 35 ggcactgcta tggcctcaca caaagacgac aaagacaagt tcttcccat gagcgggtgc 1620
 atgattttg gaaaggagag cgccggagct tcaaacactg cattggacaa tgcatgatc 1680
 acagacgaag aggaaatcaa agccactaac cccgtggcca ccgaaagatt tgggactgtg 1740
 40 gcagtcaatc tccagagcag cagcacagac cctgcgaccg gagatgtgca tgttatggga 1800
 gccttacctg gaatggtgtg gcaagacaga gacgtatacc tgcagggtcc catttgggcc 1860
 45 aaaattcctc acacagatgg acactttcac ccgtctctc ttatggggcg ctttggactt 1920
 aagcaccgc ctctcagat cctcatcaa aacacgcctg ttctgcgaa tctccggca 1980
 50 gagtttcgg ctacaaagt tgctcattc atcaccagc attctactgg ccaagtgcag 2040
 gtggagattg aatgggagct gcagaaagaa aacagcaaac gctggaatcc cgaagtgcag 2100
 tatacatcta actatgcaa atctgccaac gttgattca ctgtggacaa caatggactt 2160
 55 tatactgagc ctctcccat tggcaccctg tacctaccc gtcccctgta a 2211

<210> 38
 <211> 2211
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

65 <400> 38

ES 2 897 508 T3

atggctgccg atggtatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga 60
 cagtggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaacg cgcagagcg gcataaggac 120
 5 gacagcaggg gtcttgct tctgggtac aagtacctg gacctcaa cggactcgac 180
 aagggagagc cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa ggctacgac 240
 cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata accacgccga cgccgagttt 300
 10 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtcttt gggggcaacc tcgggcgagc agtctccag 360
 gccaagaagc gggttctga acctctcgt ctggtgagg aaggcgctaa gacggctct 420
 15 ggaagaaac gtccggtaga gcagtcgcca caagagccag actcctcctc gggcatcggc 480
 aagacaggcc agcagcccg taaaaagaga ctcaatttg gtcagactgg cgactcagag 540
 tcagtccccg acccacaacc tctcgagaa cctccagcaa cccccgtgc tggggacct 600
 20 actacaatgg cttcaggcgg tggcgacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 660
 gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcca cagagtcac 720
 25 accaccagca cccgaacatg ggcctgccc acctataaca accacctca caagcaaatc 780
 tccagtgtt cgacggggc cagcaacgac aaccactact tcggctacag caccctgg 840
 ggtattttg acttaacag attcactgc cactttcac cacgtgactg gcagcgactc 900
 30 atcaacaata actggggatt cggcccaag agactcagct tcaagcttt caacatccag 960
 gtcaaggagg tcacgacgaa tgatggcgtc acaacctcg ctaataacct taccagcacg 1020
 35 gttcaagtct tctggactc ggagtaccag ctccgtacg tctcggctc tgcgcaccag 1080
 ggctgcctcc ctccgtccc ggcggacgtg tcatgattc cgcaatacgg ctacctgacg 1140
 ctcaacaatg gcagccaagc cgtgggacgt tcatctttt actgcctgga atatttcct 1200
 40 tctcagatgc tgagaacggg caacaactt acctcagct acaccttga ggaagtgcct 1260
 ttccacagca gctacgcgca cagccagagc ctggaccggc tgatgaatcc tctcatgat 1320
 45 caatacctgt attacctgaa cagaactcaa aatcagtcgg gaagtgccca aaacaaggac 1380
 ttgctgtta gccgtgggtc tccagctggc atgtctgtc agcccaaaa ctggctacct 1440
 ggaccctgtt atcggcagca gcgcgtttct aaaacaaaaa cagacaacaa caacagcaat 1500
 50 ttacctgga ctggtgctt aaaatataac ctcaatggc gtgaatccat catcaaccct 1560
 ggcactgta tggcctcaca caaagacgac gaagacaagt tcttccat gagcgggtgc 1620
 55 atgattttg gaaaagagag gcgggagct taaacactg cattggacaa tgcatgatt 1680
 acggacgaag aggaaattaa agccactaac cctgtggcca ccgaaagatt tgggaccgtg 1740
 gcagtcaatt tccagagcag cagcacagac cctgcgaccg gagatgtgca tgctatggga 1800
 60 gcattacctg gcatggtgtg gcaagataga gacgtgtacc tgcagggtcc catttgggcc 1860
 aaaattcctc acacagatgg acacttcaac ccgtctcctc ttatggggcg ctttgactc 1920
 65 aagaaccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacgcctg ttctgcgaa tcctccggcg 1980

ES 2 897 508 T3

gagtttcag ctacaaagt tgctcattc atcactcaat actccacagg acaagtgagc 2040
 gtggaaattg aatgggagct gcagaaagaa aacagcaaac gctggaatcc cgaagtgcag 2100
 5 tatacatcta actatgcaaa atctgccaac gttgattca ctgtggacaa caatggactt 2160
 tatactgagc ctcgccccat tggcaccctg tacctcacc gtcacctgta a 2211

 10 <210> 39
 <211> 2208
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética

 <400> 39
 20 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga 60
 cagtggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaagc cgcagagcgc gcataaggac 120
 gacagcaggg gtctgtgct tcttgggtac aagtacctcg gaccttcaa cggactcgac 180
 25 aaggagagc cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa agcctatgac 240
 cggcagctcg acagcggaga caaccctgac ctcaagtaca accacgccga cgcggagttt 300
 caggagcgc taaagaaga tacgtcttt gggggcaacc tcggacgagc agtctccag 360
 30 gcgaaaaaga ggttcttga acctctggc ctggtgagg aacctgtaa gacggctccg 420
 ggaaaaaaga ggccgtaga gcaactctct gtggagccag actcctctc gggaaccgga 480
 35 aaggcgggcc agcagcctgc aagaaaaaga ttgaatttg gtcagactgg agacgcagac 540
 tcagtacctg atccccagc tctcggacag ccaccagcag cccctctg tctgggaact 600
 aatacgatg ctacaggcag tggcgacca atggcagaca ataacgagg cgccgacgga 660
 40 gtgggtaatt cctcgggaaa ttggcattgc gattccacat ggatgggca cagagtcac 720
 accaccagca cccgaacctg ggcctgccc acctacaaca accacctta caacaaatt 780
 45 tccagccaat caggagctc gaacgacaat cactacttg gctacagcac ccttggggg 840
 tattttgact tcaacagatt ccaactgcc tttcaccac gtgactggca aagactcatc 900
 aacaacaact ggggattccg acccaagaga ctcaagtca agctcttaa cattcaagtc 960
 50 aaagaggta cgcagaatga cggtagcagc acgattgcca ataacctac cagcacggtt 1020
 caggtgttta ctgactcgga gtaccagctc ccgtatgtcc tcggctcggc gcatcaagga 1080
 55 tgctcccgc cgttcccagc agacgtctc atggtgccac agtatggata cctcaccctg 1140
 aacaacggga gtcaggcagt aggacgtct tcatttact gcctggagta ctttcttct 1200
 cagatgctgc gtaccggtaa caactttacc ttcagctaca ctttgagga cgttccttc 1260
 60 cacagcagct acgctcacag ccagagtctg gaccgtctca tgaatcctct catcgaccag 1320
 tacctgtatt actgagcag aacagacact ccaagtggaa ccaccagca gtcaaggctt 1380
 65 cagtttctc aggccggagc gactgacatt cgggaccagt ctaggaactg gcttctgga 1440

ES 2 897 508 T3

ccctgttacc gccagcagcg agtatcaaag acatctgctgg ataacaacaa cagtgaatac 1500
 tcgtggactg gagctaccaa gtaccacctc aatggcagag actctctggt gaatccgggc 1560
 5 ccggccatgg caagccacaa ggacgatgaa gaaaagttt ttctcagag cggggttctc 1620
 atctttggga agcaaggctc agagaaaaca agtgtggaca ttgaaaaggt catgattaca 1680
 10 gacgaagagg aatcaggac aaccaatccc gtggctacgg agcagtatgg ttctgtatct 1740
 accaacctcc agagaggcaa cagacaagca gctaccgcag atgtcaacac acaaggcgtt 1800
 cttccaggca tggctcggca ggacagagat gtgtacctc aggggcccac ctgggcaaag 1860
 15 attccacaca cggacggaca ttttcacccc tctcccctca tgggtggatt cggactaaa 1920
 caccctctc cacagattct catcaagaac accccggtac ctgcgaatcc ttcgaccacc 1980
 20 ttcagtgcgg caaagtttc ttctctatc acacagtact ccacgggaca ggtcagcgtg 2040
 gagatcgagt gggagctgca gaaggaaaac agcaaacgt ggaatcccga agttcagtac 2100
 acttccaaact acaacaagtc tgtaatgtg gactttactg tggacactaa tggcgtgtat 2160
 25 tcagagcctc gccccattgg caccagatac ctgactcgta atctgtaa 2208

 <210> 40
 <211> 2208
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico sintética
 35
 <400> 40
 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga 60
 40 cagtggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaacg ccgcagagcg gcataaggac 120
 gacagcaggg gtctgtgct tctcgggtac aaglacctcg gaccctcaa cggactcgac 180
 aaggagagc cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa agcctatgac 240
 45 cggcagctcg acagcggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cgcggagttt 300
 caggagcgc ttaaagaaga tacgtcttt gggggcaacc tcggacgagc agtctccag 360
 50 gcgaaaaaga gggttctga acctctggc ctggtgagg aacctgtaa gacggctccg 420
 ggaaaaaaga ggccggtaga gactctctct gtggagccag actcctcctc gggaaccgga 480
 aaggcgggcc agcagcctgc aagaaaaaga ttgaatttg gtcagactgg agacgcaaac 540
 55 tcagtacctg accccagcc tctcggacag ccaccagcag ccccctctgg tctgggaact 600
 aatacgatgg ctacaggcag tggcgacca atggcagaca ataacgagg cgccgacgga 660
 60 gtgggtaatt cctcgggaaa ttggcattgc gattccacat ggatgggca cagagtcac 720
 accaccagca cccgaacctg ggcctgccc acctacaaca accacctta caaacaatt 780
 tccagccaat caggagcctc gaacgacaat cactacttg gctacagcac ccttggggg 840
 65 tattttgact tcaacagatt ccactgccac tttcaccac gtgactggca aagactcatc 900

ES 2 897 508 T3

aacaacaact ggggattccg acccaagaga ctcaagtca agctcttaa cattcaagtc 960
aaagaggta cgcagaatga cggtagcagc acgattgccataaacctac cagcagcgtt 1020
5 cagggttita ctgactcggg gtaccagctc ccgtacgtcc tgggctcggc gcatcaagga 1080
tgctcccgc cgtcccagc agacgtctc atggtgccac agtatggata cctcacctg 1140
10 aacaacggga gtcgggcagt aggacgtctc tcatcttact gcttgagta cttccttct 1200
cagatgctgc gtaccggtaa caacttacc ttcagctaca ctttgagga cgttccttc 1260
cacagcagct acgtcacag ccagagtctg gaccgtctca tgaatcctct catcgaccag 1320
15 tacctgtatt actgagcag aacagacact ccaagtggaa ccaccacgca gtcaaggctt 1380
cagtttctc aggccggagc gtagtgcatt cgggaccagt ctaggaaactg gcttctgga 1440
ccctgttacc gccagcagc agtatcaaag acatctcggg ataacaaca cagtgaatac 1500
20 tcgtggactg gagctacaa gtaccacctc aatggcagag actctctggt gaatccgggc 1560
ccggccatgg caagccaca ggacgatgaa gaaaagttt ttctcagag cggggttctc 1620
25 atcttggga agcaaggctc agagaaaaca agtgggaca ttgaaaagg catgattaca 1680
gacgaagagg aatcaggac gaccaatccc gtggctacgg agcagtatgg ttctgtatct 1740
30 accaacctcc agagaggcaa cagacaagca gctaccgag atgtcaacac acaaggcgtt 1800
cttccaggca tggctcggca ggacagatg gtgtacctc aggggcccac ctgggcaaag 1860
attccacaca cggacggaca tttcacccc tctcccctca tgggtggatt cggactaaa 1920
35 caccctctc cacagattct catcaagaac accccgtac ctgcgaatcc ttcgaccacc 1980
ttcagtcggg caaagtttc ttctctcatc acacagtact ccacgggaca ggtcagcgtg 2040
gagatcgagt gggagctgca gaaggaaaac agcaaacgt ggaatcccga agttcagta 2100
40 acttcaact acaacaagtc tgtaatgtg gacttactg tggactacta tggcgtgtat 2160
acagagcctc gcccattgg caccagatac ctgactcgtat atctgtaa 2208
45
<210> 41
<211> 2208
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico sintética
<400> 41
55 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctgaggaca ctctctga aggaataaga 60
cagtggtgga agctcaaacc tggcccacca ccacaaagc ccgacagcgc gcataaggac 120
gacagcaggg gtctgtgtc tctgggtac aagtacctc gaccctcaa cggactcgc 180
60 aaggagagc cggtaacga ggcagacgc gcggccctc agcacgaca agcctatgac 240
cggcagctc acagcggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cgcggagttt 300
65 caggagcgc taaagaaga tacgtcttt ggggcaacc tcggacgagc agtctccag 360

ES 2 897 508 T3

gcgaaaaaga gggttcttga acctctgggc ctggtgagg aacctgttaa gacggctccg 420
 ggaaaaaaga ggccggtaga gcaactctct gtggagccag actcctctc gggaaccgga 480
 5 aaggcgggtc agcagcctgc aagaaaaaga ttgaatttg gtcagactgg agacgcagac 540
 tcagtacctg acccccagcc tctcggacag ccaccagcag ccccctctgg tctgggaact 600
 aatacagatg ctacaggcag tggcgcacca atggcagaca ataacgaggg cgccgacgga 660
 10 gtgggtaatt cctcgggaaa ttggcattgc gattccacat ggatgggcca cagagtcac 720
 accaccagca cccgaacctg ggccctgcc acctacaaca accacctcta caaacaatt 780
 15 tccagccaat caggagcctc gaacgacaat cactactttg gctacagcac ccctggggg 840
 tattttgact tcaacagatt ccaactgccac tttcaccac gtgactggca aagactcac 900
 aacaacaact ggggattccg acccaagaga ctcaagtca agctcttaa cattcaagtc 960
 20 aaagaggta cgcagaatga cggtagcagc acgattgcca ataacctac cagcacggtt 1020
 cagggtttta ctgactcggg gtaccagctc ccgtacgtcc tcggctcggc gcatcaagga 1080
 25 tgctccccg cgttcccagc agacgtctc atggtgccac agtatggata cctcaccctg 1140
 aacaacggga gtcaggcagt aggacgtct tcaatttact gcttgagta ctttcttct 1200
 cagatgctgc gtaccggtaa caactttacc ttcagctaca ctttgagga cgttccttc 1260
 30 cacagcagct acgctcacag ccagagtctg gaccgtctca tgaatcctct catcgaccag 1320
 tacctgtatt actgagcag aacagacgtc ccaagtggaa ccaccagca gtcaaggctt 1380
 35 cagttttctc aggccggagc gagtgcatt cgggaccagt ctaggaactg gcttctgga 1440
 ccctgttacc gccagcagcg agtatcaaa acatctcggg ataacaaca cagtgaatac 1500
 tcgtggactg gagctaccaa gtaccacctc aatggcagag actctctggt gaatccgggc 1560
 40 ccggccatg caagccaca ggacgatgaa gaaaagttt ttcctcagag cggggttctc 1620
 atctttgga agcaaggctc agagaaaaca agtgtggaca ttgaaaagt catgattaca 1680
 45 gacgaagagg aatcaggac aaccaatccc gtggctacgg agcagtatgg ttctgtatct 1740
 accaacctc agagaggcaa cagacaagca gctaccgag atgtcaacac acaaggcgtt 1800
 ctccaggca tggctcggca ggacagagat gtgtacctc aggggcccat ctgggcaaag 1860
 50 attccacaca cggacggaca tttcaccctc tctcccctca tgggtggatt cggactaaa 1920
 caccctctc cacagattct catcaagaac accccgtac ctgcgaatcc ttcgaccacc 1980
 55 ttcagtgcgg caaagttgc ttccttcac acacagtact ccacgggaca ggtcagcgtg 2040
 gagatcgagt gggagctgca gaaggaaaac agcaaacgt ggaatcccga agttcagtac 2100
 acttcaact acaacaagtc tghtaatgt gactttactg tggactacta tggcgtgtat 2160
 60 tcagagcctc gcccattgg caccagatc ctgactcgtat atctgtaa 2208

REIVINDICACIONES

1. Un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso que comprende:
 - (a) una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 203-736 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12; y
 - (b) un ácido nucleico heterólogo, en donde el VAAr exhibe al menos 5 veces mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por el VAA2.
2. El VAAr infeccioso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el VAAr exhibe un aumento de la transducción de células de mamífero en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la transducción de células de mamífero exhibidas por VAA2.
3. El VAAr infeccioso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las células de mamífero son células hepáticas, células pancreáticas, células del músculo esquelético, células del músculo cardíaco, fibroblastos, células retinianas, células de la articulación sinovial, células pulmonares, células T, neuronas, células gliales, células madre, células endoteliales o células cancerosas.
4. El VAAr infeccioso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende: i) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido; o ii) un agente de interferencia de ARN.
5. El VAAr infeccioso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 203-736 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12.
6. El VAAr infeccioso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el VAAr exhibe al menos 10 veces mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por el VAA2.
7. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 203-736 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 en donde la proteína de la cápside de VAA variante codificada confiere a un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso una mayor resistencia a anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por VAA2, en donde la mayor resistencia es al menos 5 veces mayor que la resistencia exhibida por VAA2.
8. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la proteína de la cápside de VAA variante confiere a un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso una transducción aumentada de células de mamífero en presencia de anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la transducción exhibida por VAA2.
9. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde la proteína de la cápside de VAA variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 203-736 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:12.
10. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 7, 8 o 9, en donde el VAAr exhibe al menos 10 veces mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por el VAA2.
11. Una célula huésped aislada que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 7-10.
12. Un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método para suministrar un producto génico a un individuo que lo necesite.
13. El virión de VAAr para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende: i) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido; o ii) un agente de interferencia de ARN.
14. Una proteína de la cápside del virus adenoasociado (VAA) variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 203-736 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 en donde la proteína de la cápside de VAA variante confiere a un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso una mayor

resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por VAA2, en donde la mayor resistencia es al menos 5 veces mayor que la resistencia exhibida por VAA2.

- 5 15. La proteína de la cápside de VAAr de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la proteína de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 203-736 de la secuencia de aminoácido expuesta en SEQ ID NO: 12.
- 10 16. La proteína de la cápside de VAAr de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en donde el VAAr exhibe una resistencia al menos 10 veces mayor a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por el VAA2.
- 15 17. Una biblioteca que comprende al menos uno de:
 (i) dos o más viriones de VAAr infecciosos, cada uno de los cuales comprende una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante y un ácido nucleico heterólogo;
 (ii) dos o más ácidos nucleicos aislados, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante;
 (iii) dos o más células huésped, cada una de las cuales comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de VAA variante; y
 20 (iv) dos o más proteínas de la cápside de VAA variantes,
 en donde la proteína de la cápside de VAA variante de al menos un miembro de la biblioteca comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, en donde la proteína de la cápside de VAA variante confiere a un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) infeccioso una mayor resistencia a los anticuerpos neutralizantes de VAA humanos en comparación con la resistencia exhibida por VAA2, en donde la mayor
 25 resistencia es al menos 5 veces mayor que la resistencia exhibida por VAA2.
18. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la mayor resistencia es al menos 10 veces mayor que la resistencia exhibida por VAA2.

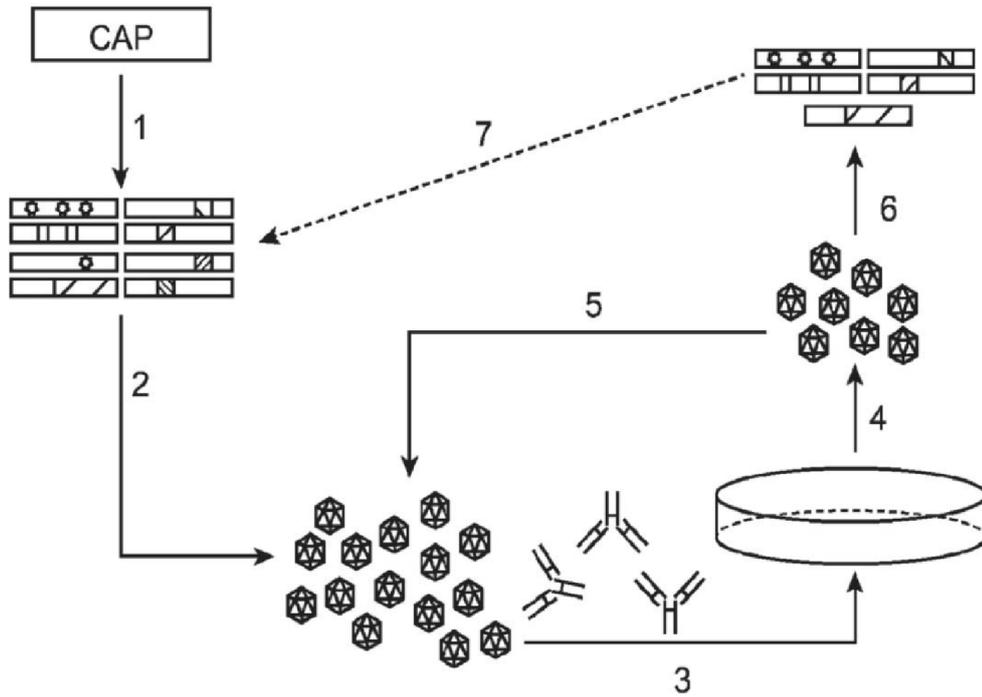


Figura 1A

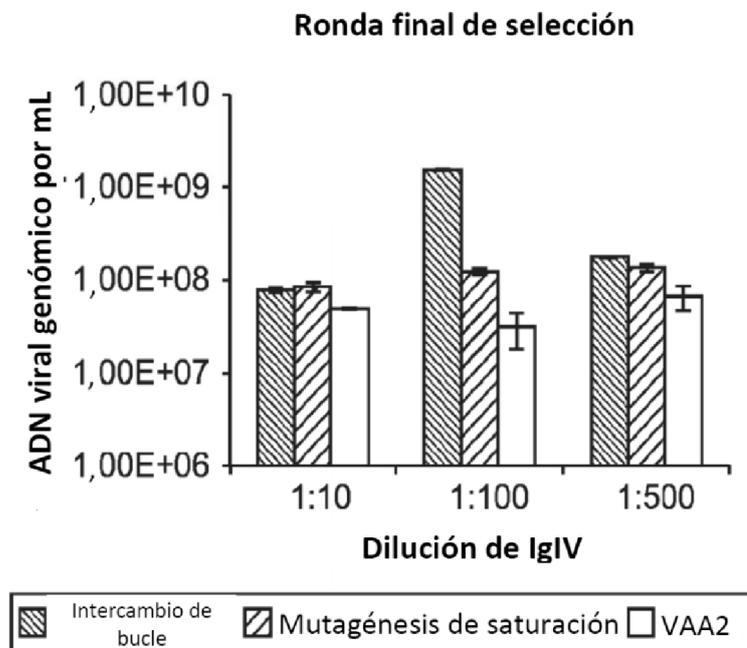


Figura 1B

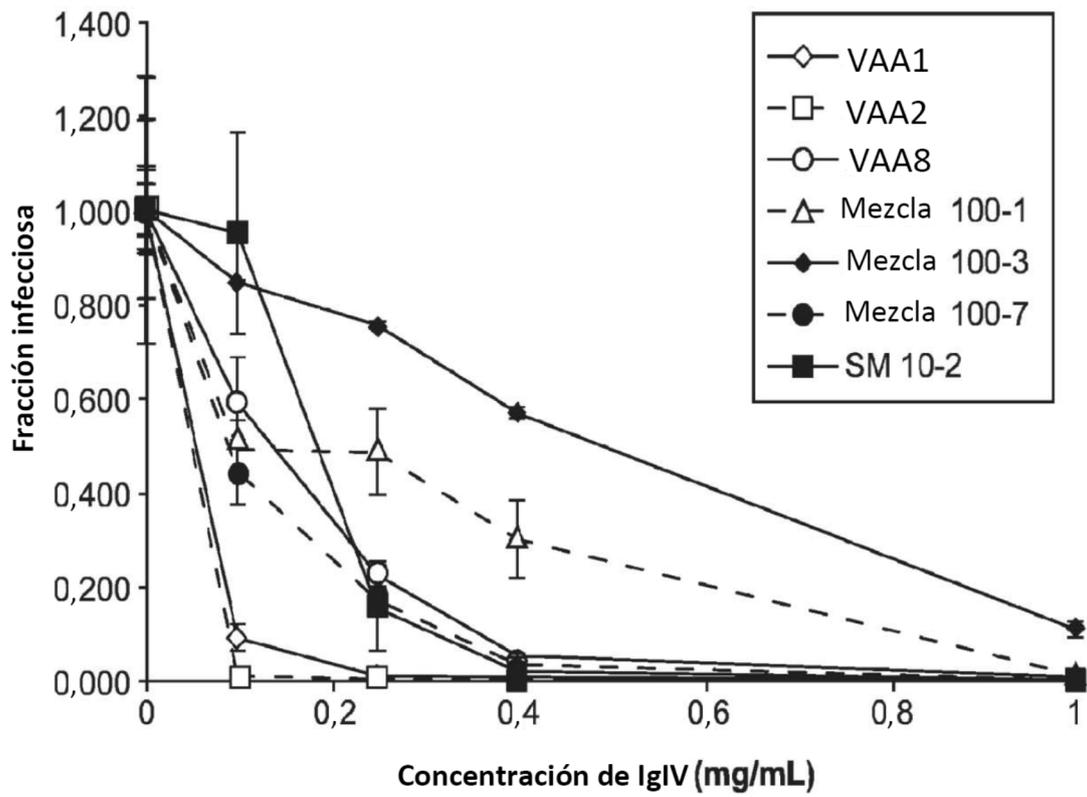


Figura 2A

	VAA1	VAA2	VAA8	Mezcla 100-1	Mezcla 100-3	Mezcla 100-7	SM 10-2
1 mg/mL de IgV							
0,25 mg/mL de IgV							
sin suero							

Figura 2B

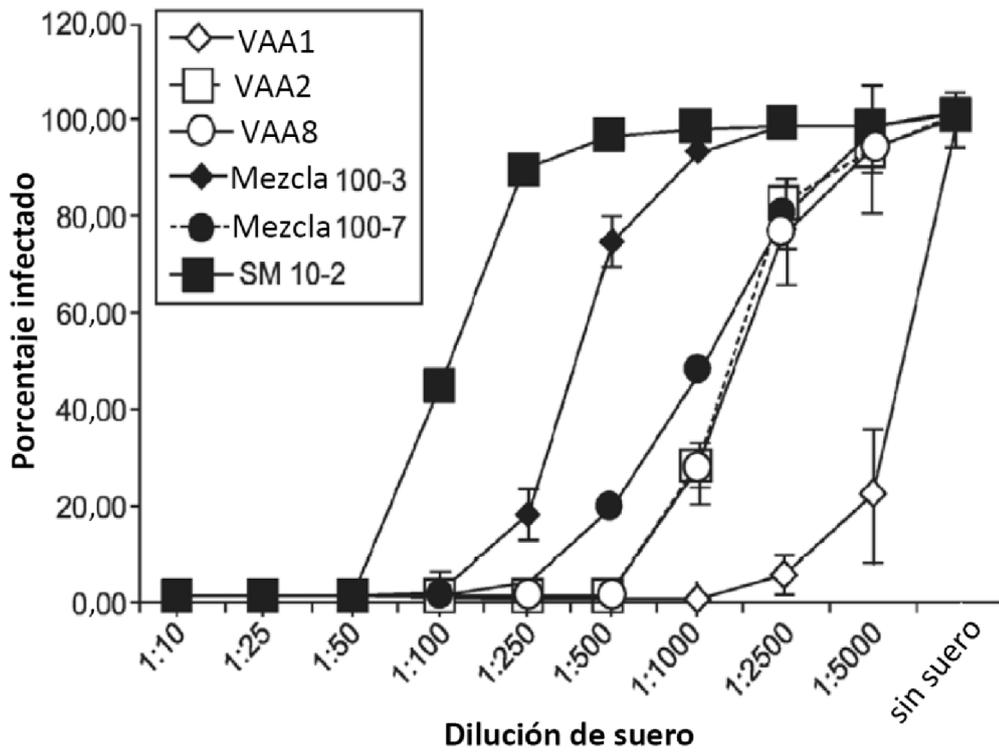


Figura 3A

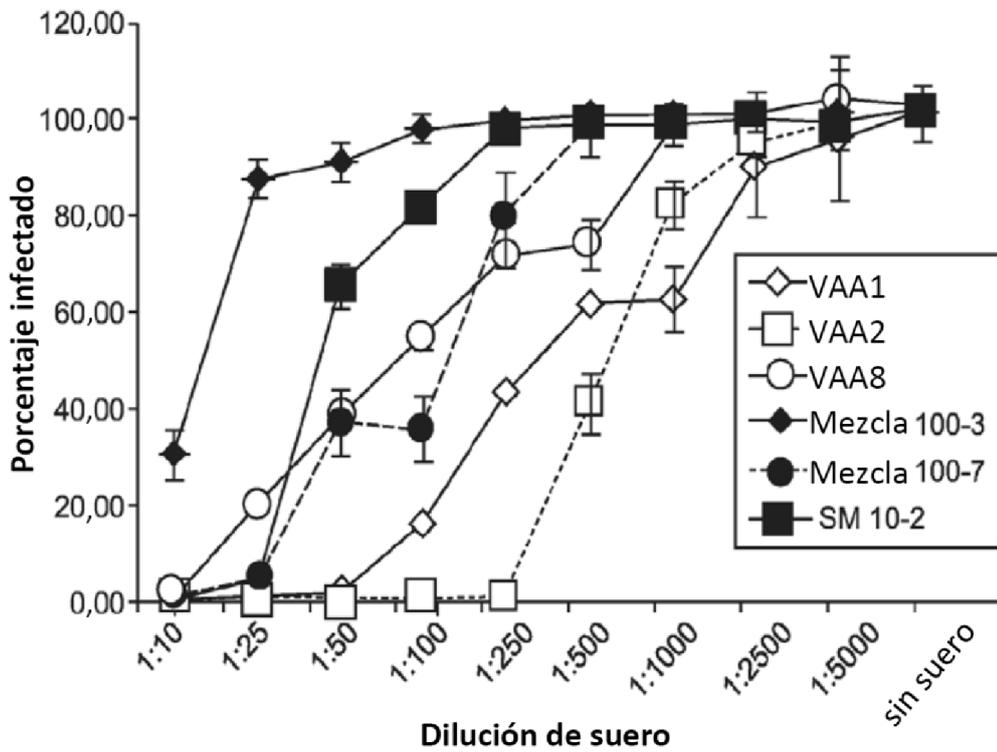


Figura 3B

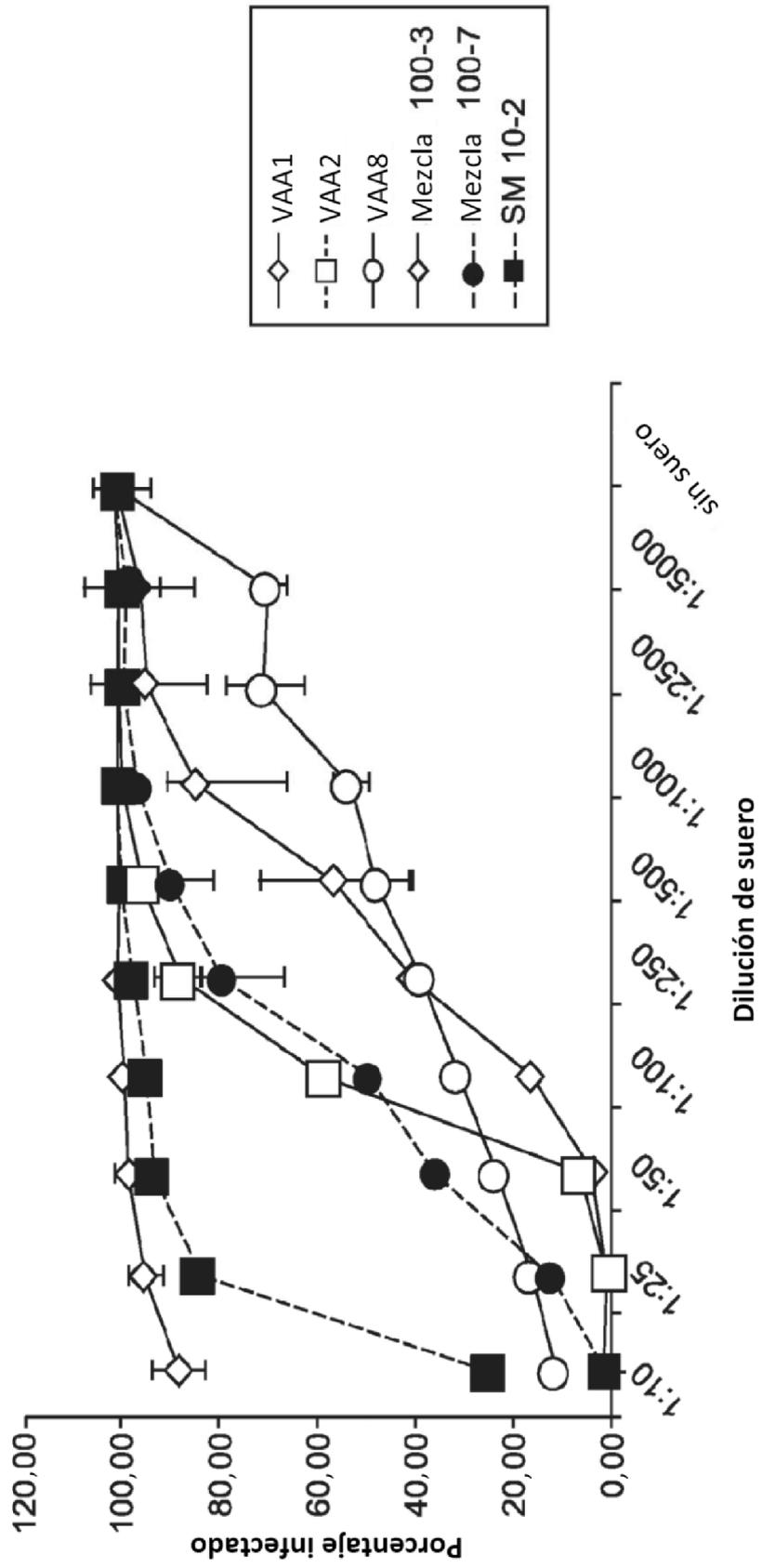


Figura 3C

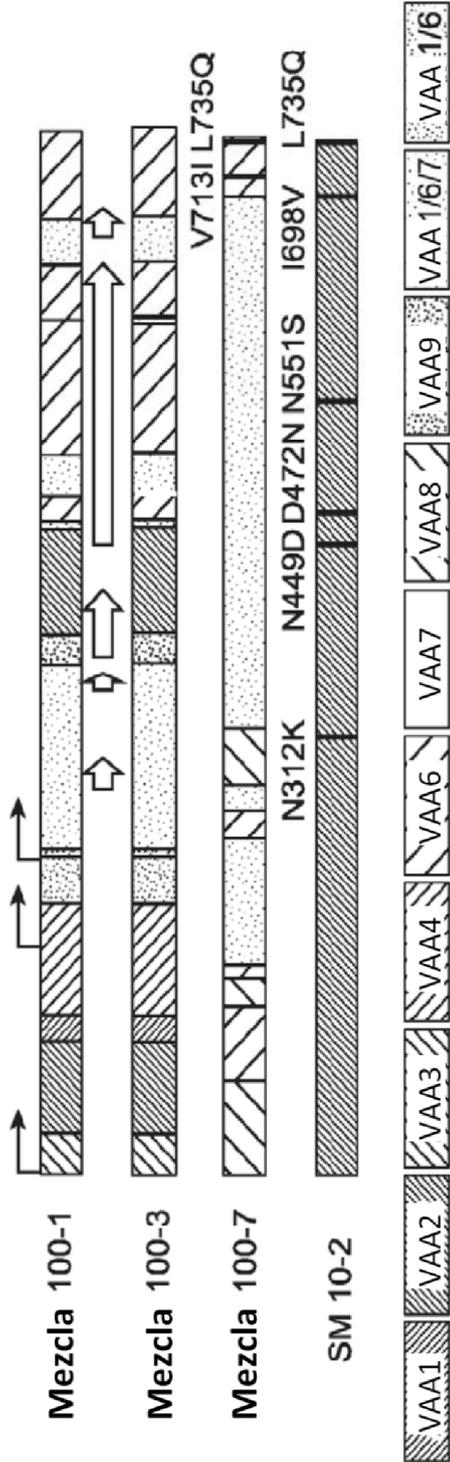


Figura 4A

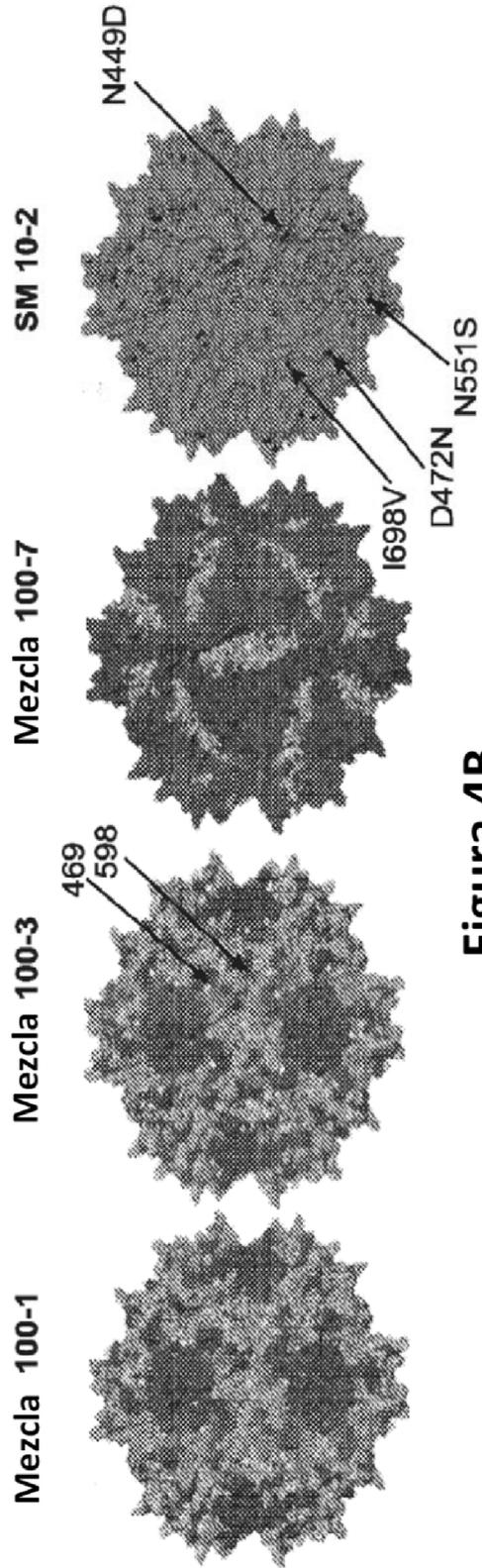


Figura 4B

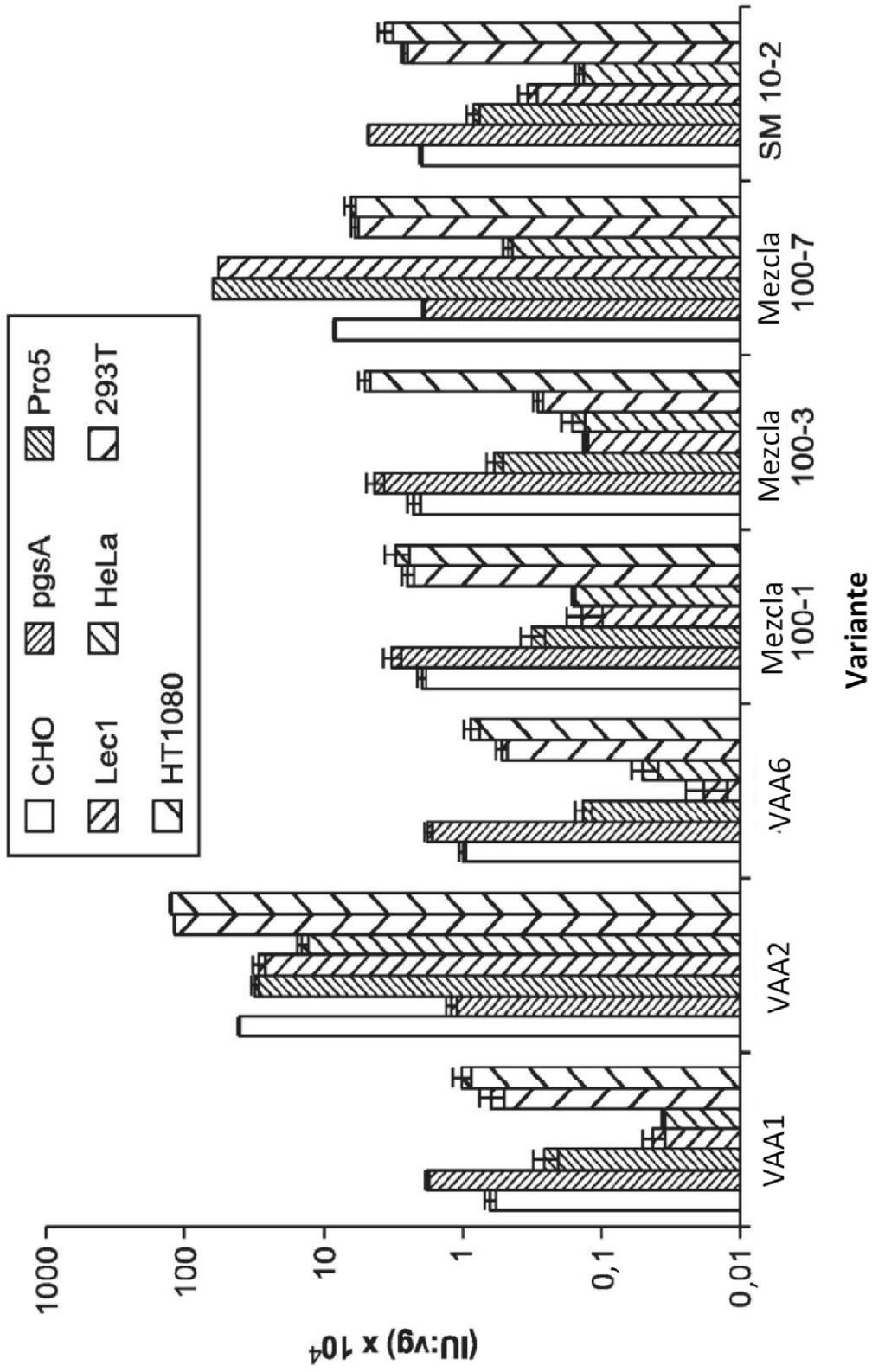


Figura 5

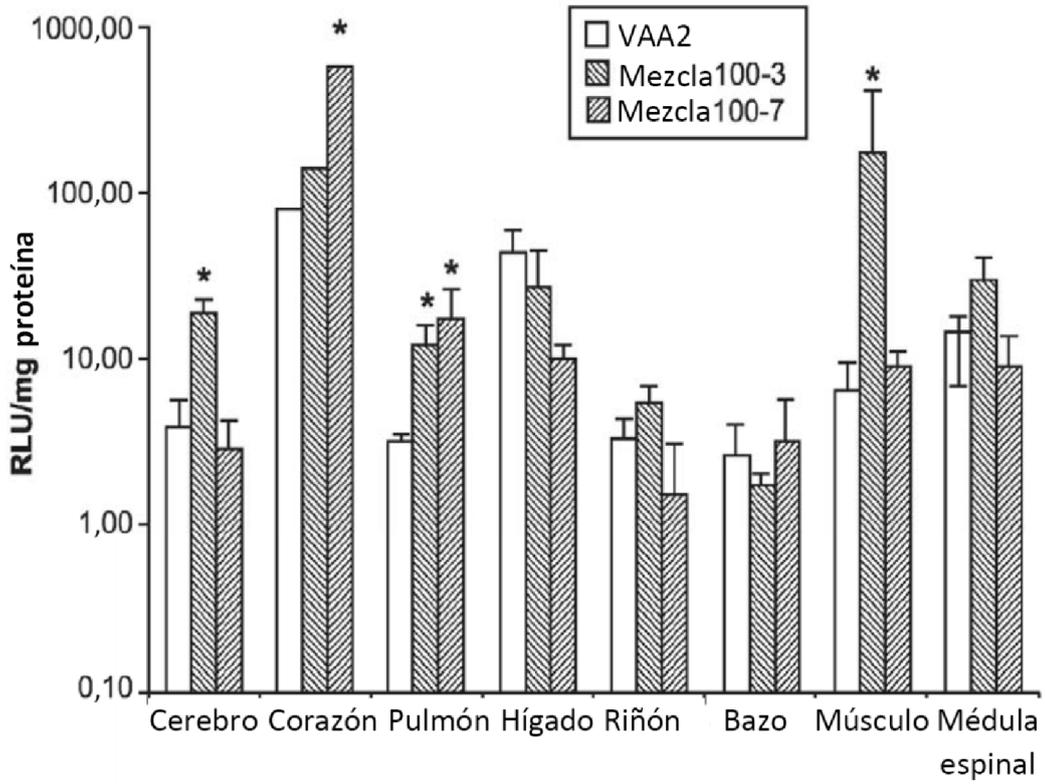


Figura 6A

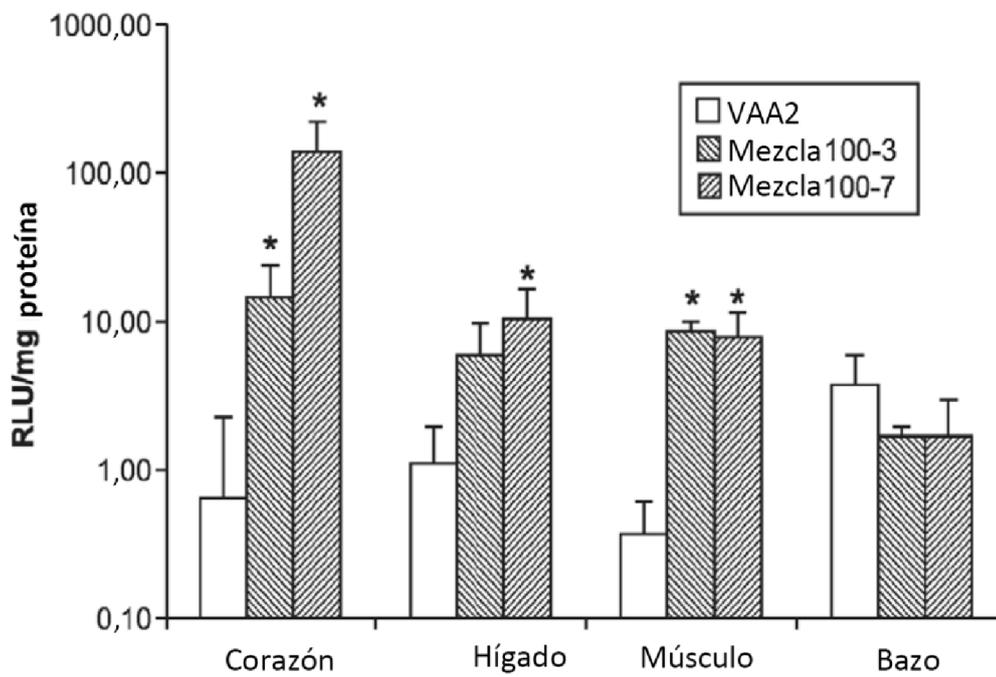


Figura 6B

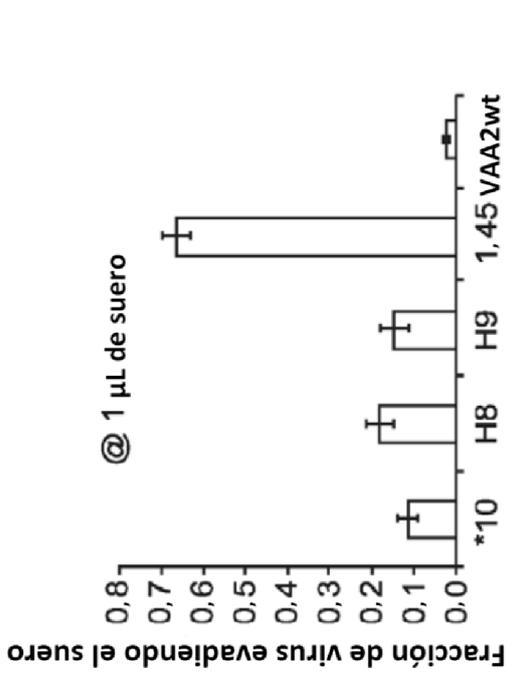


Figura 7A

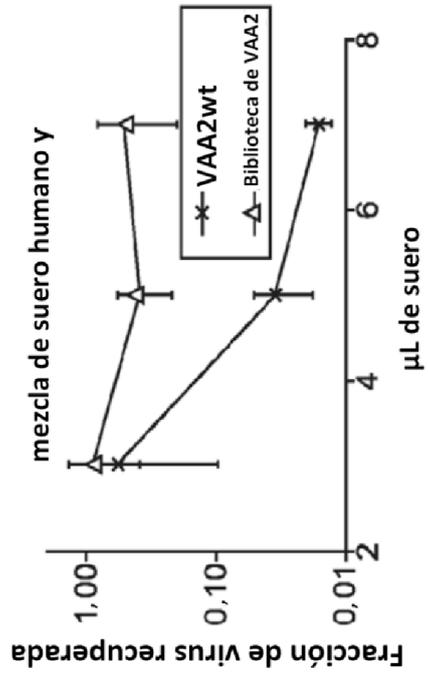


Figura 7C

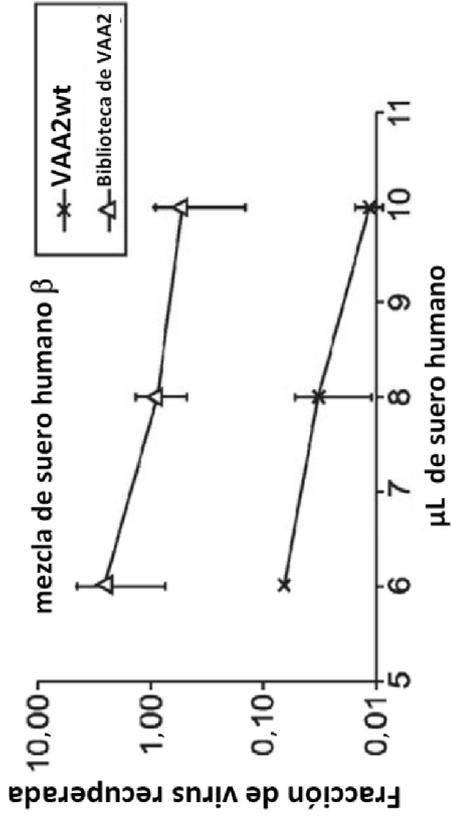


Figura 7B

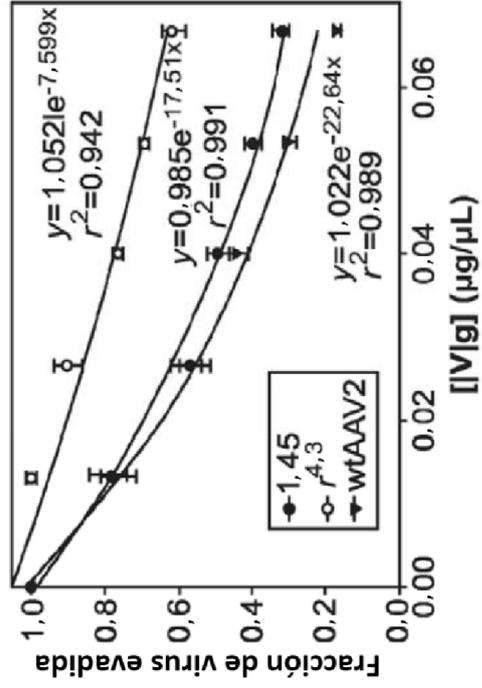


Figura 7D

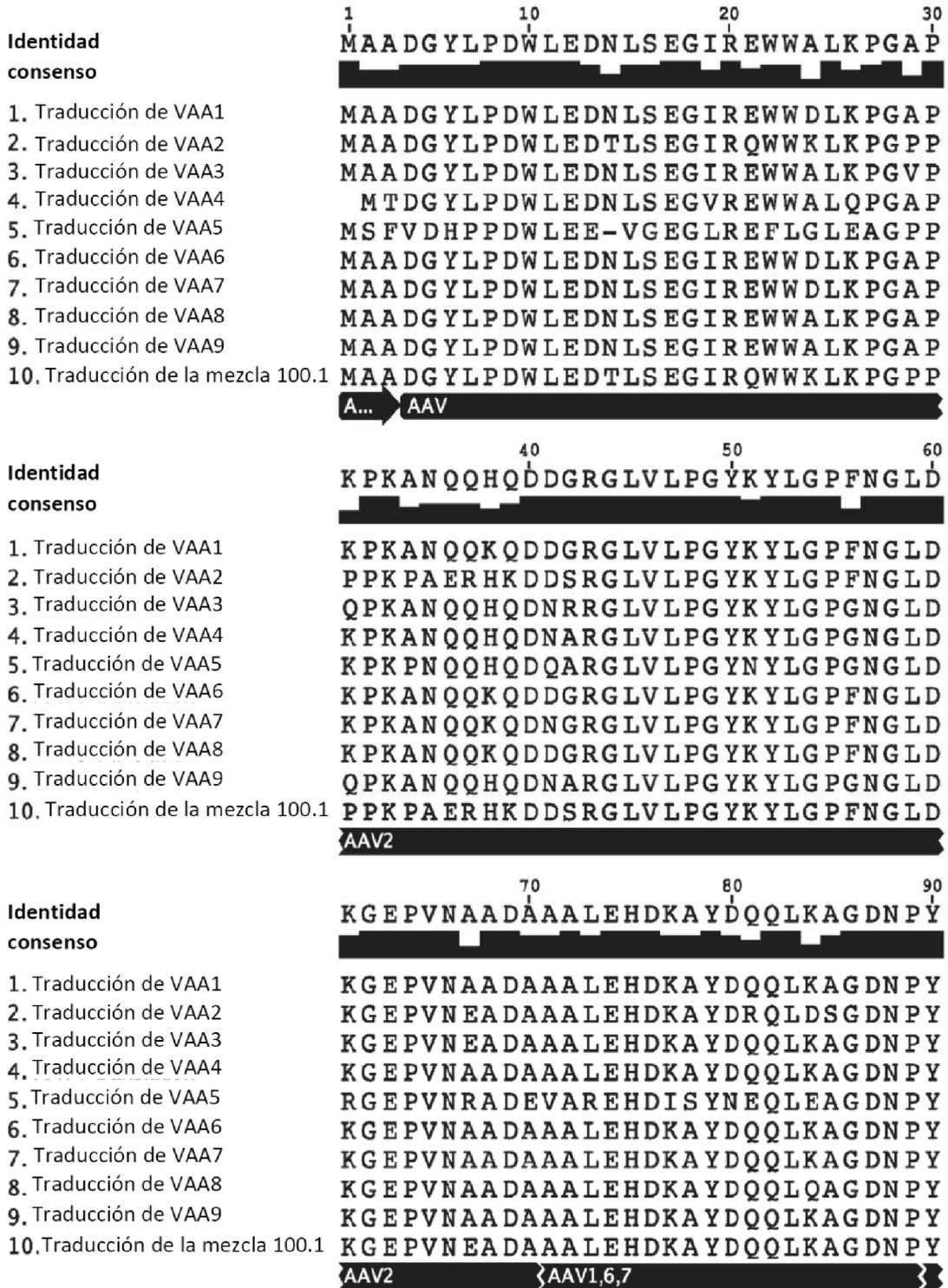


Figura 8A

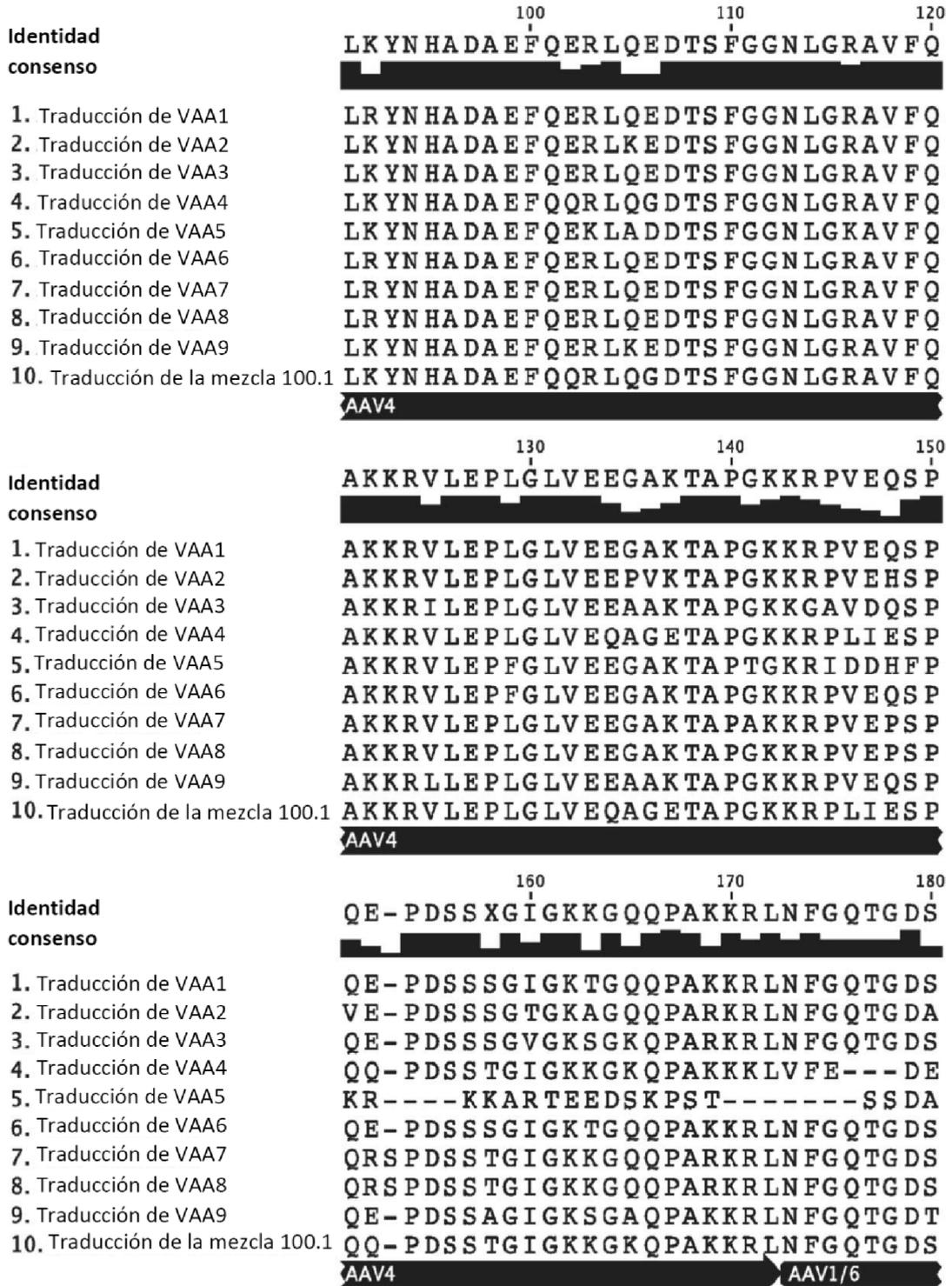


Figura 8B

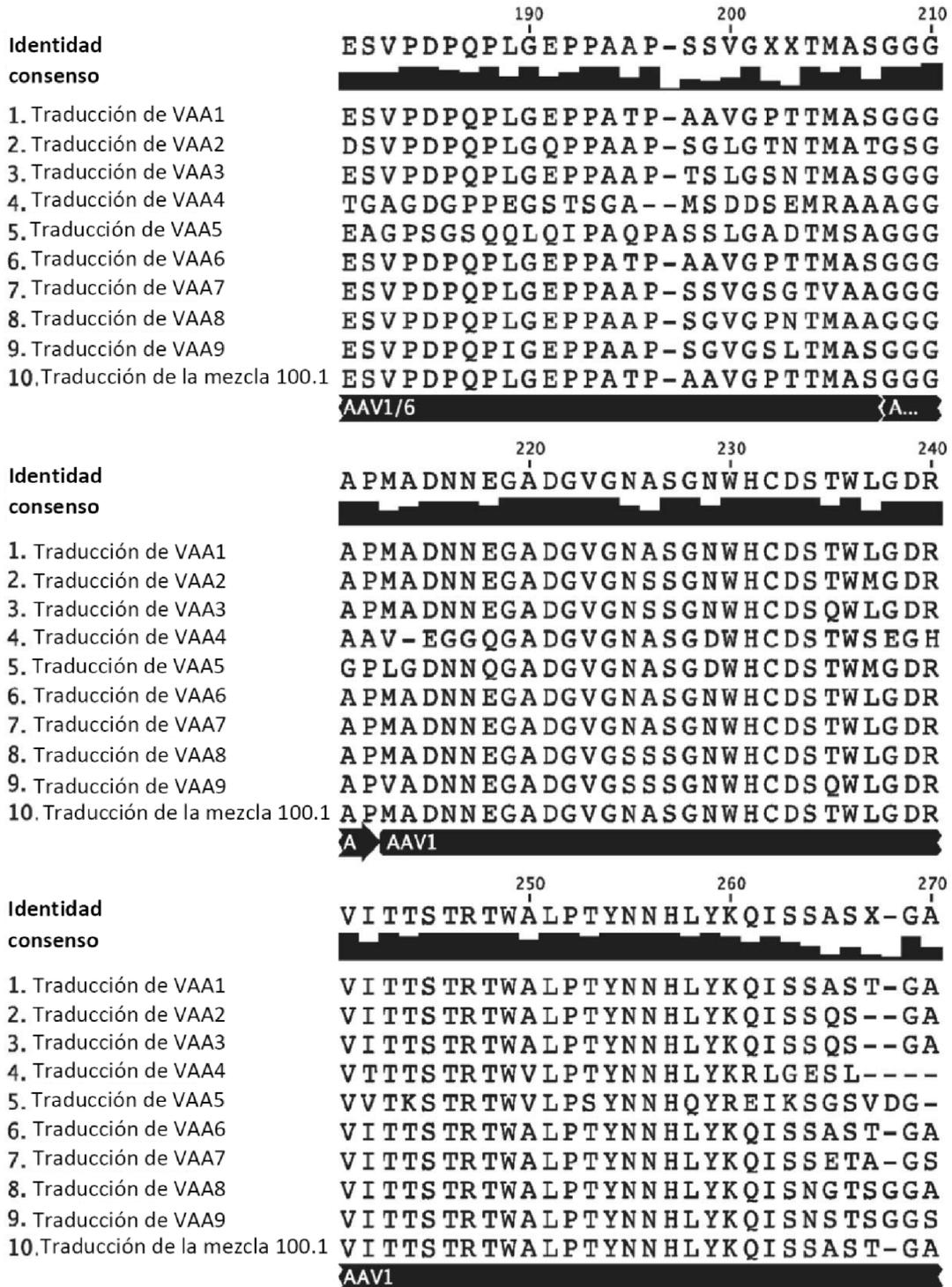


Figura 8C

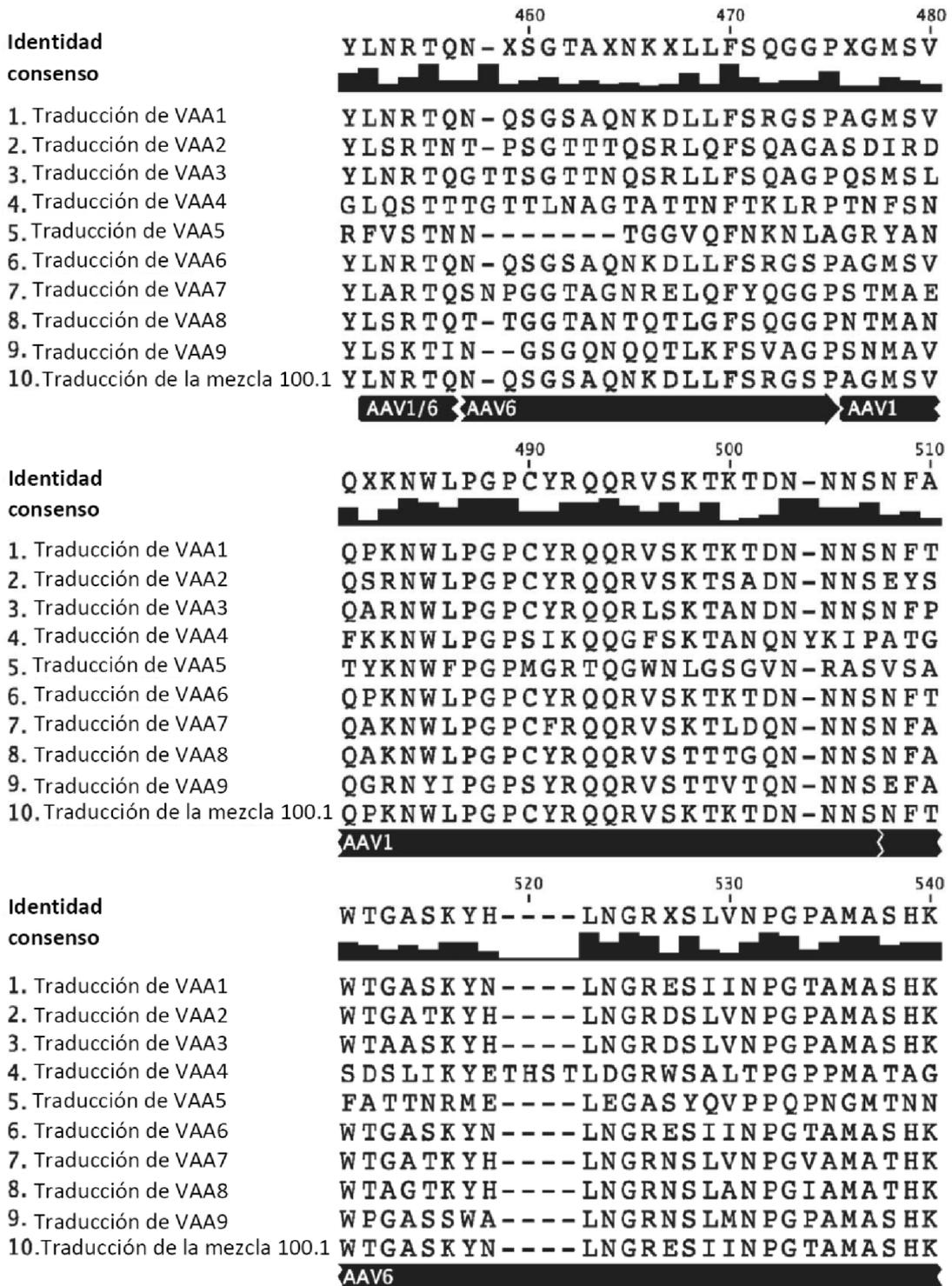


Figura 8F

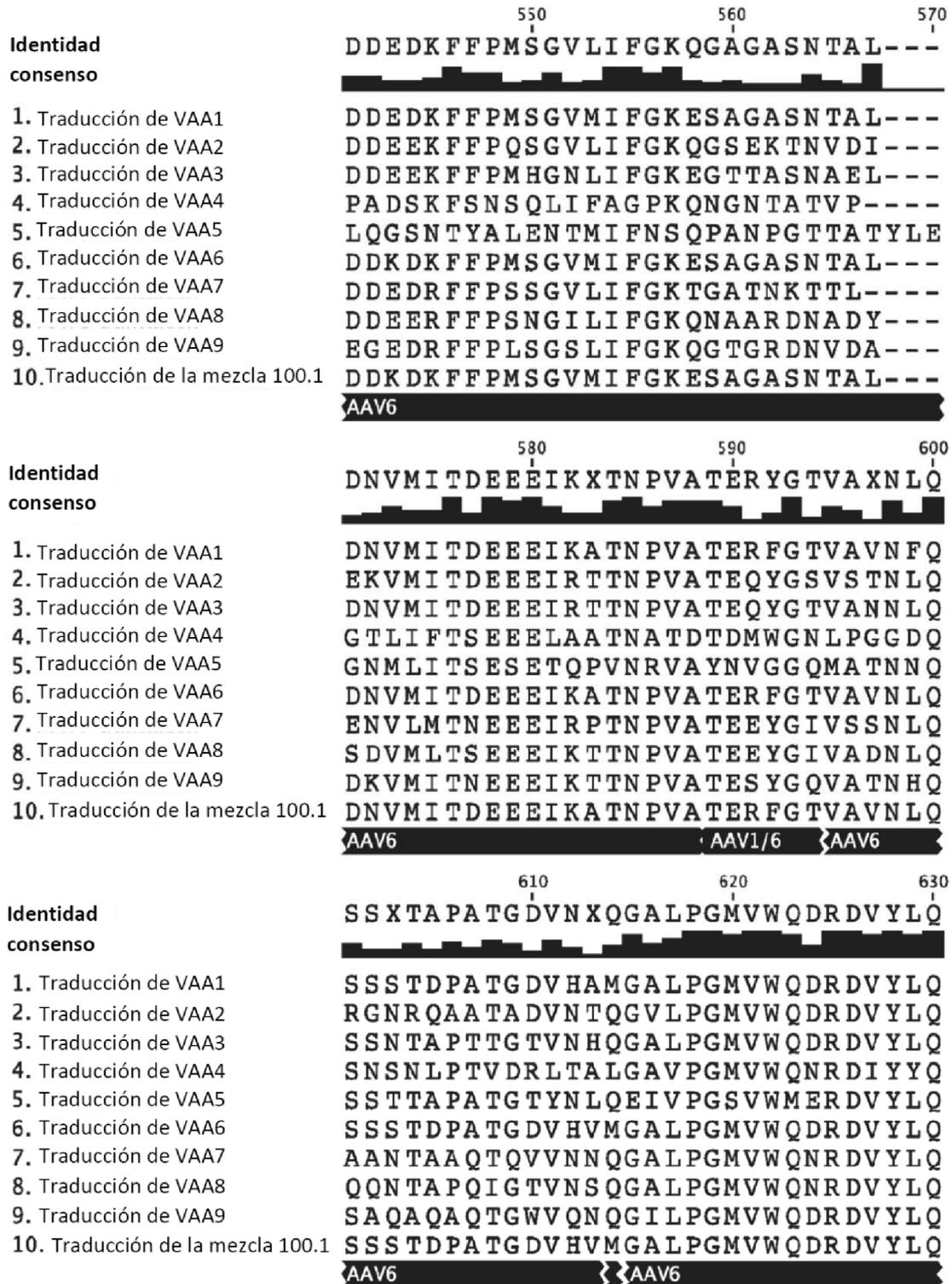


Figura 8G

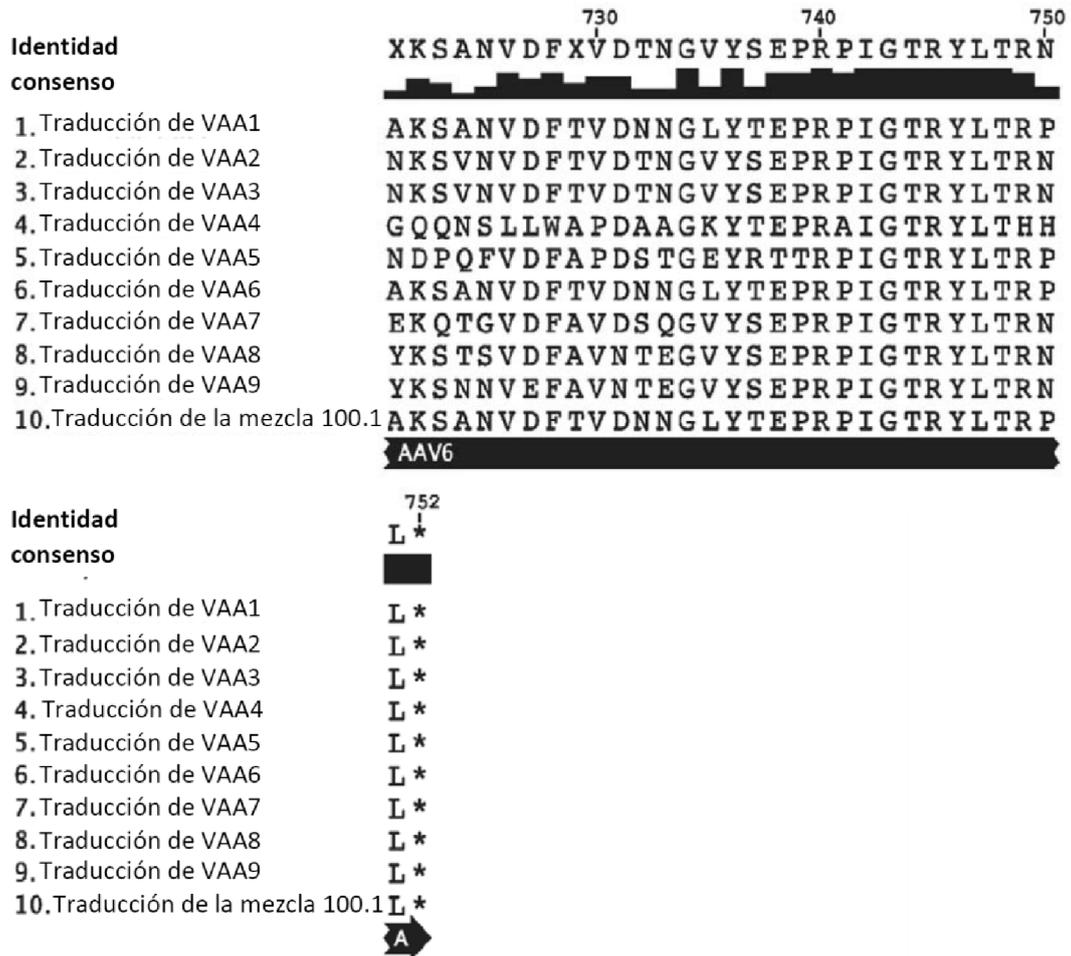


Figura 8l

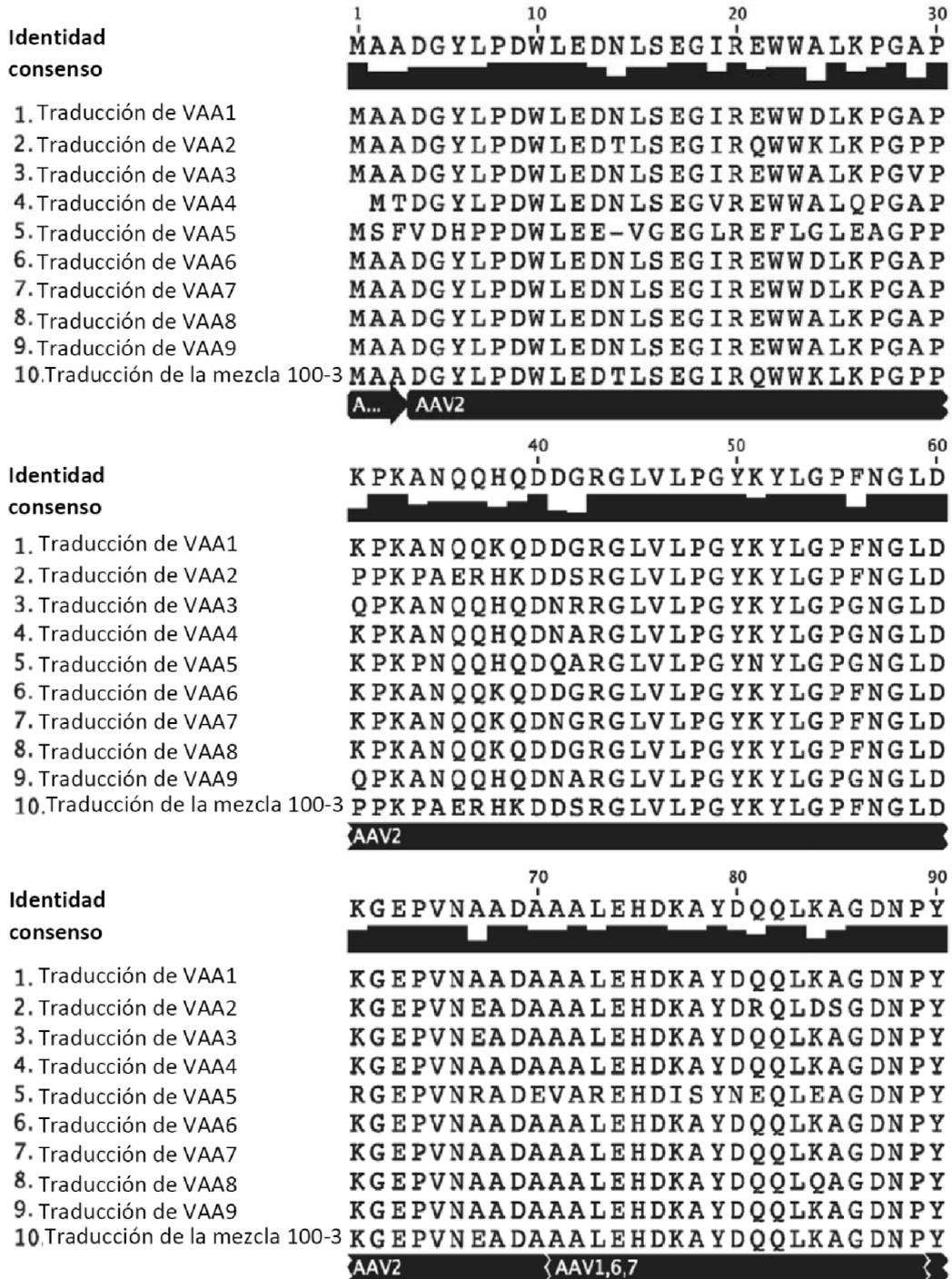


Figura 9A

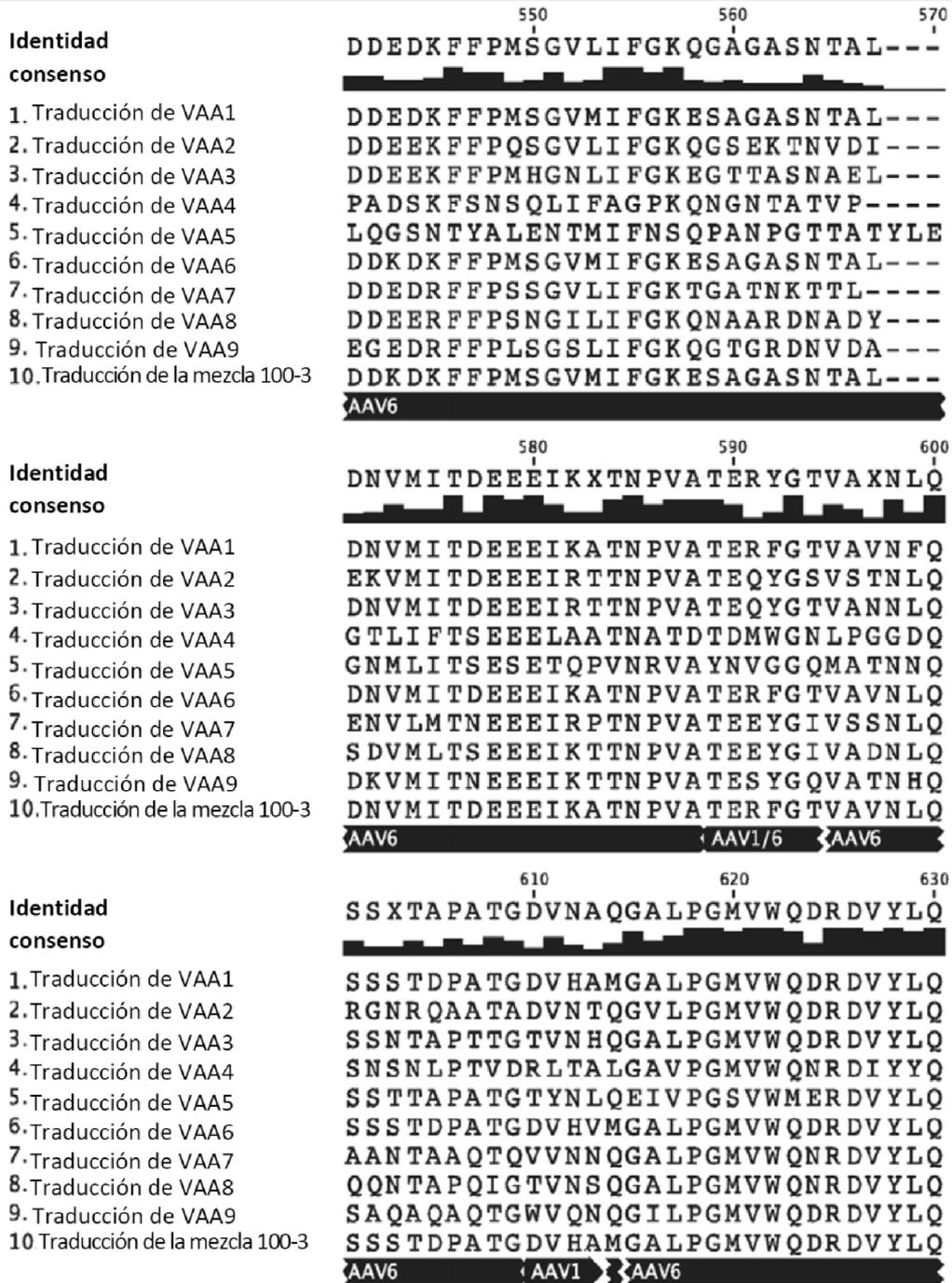


Figura 9G

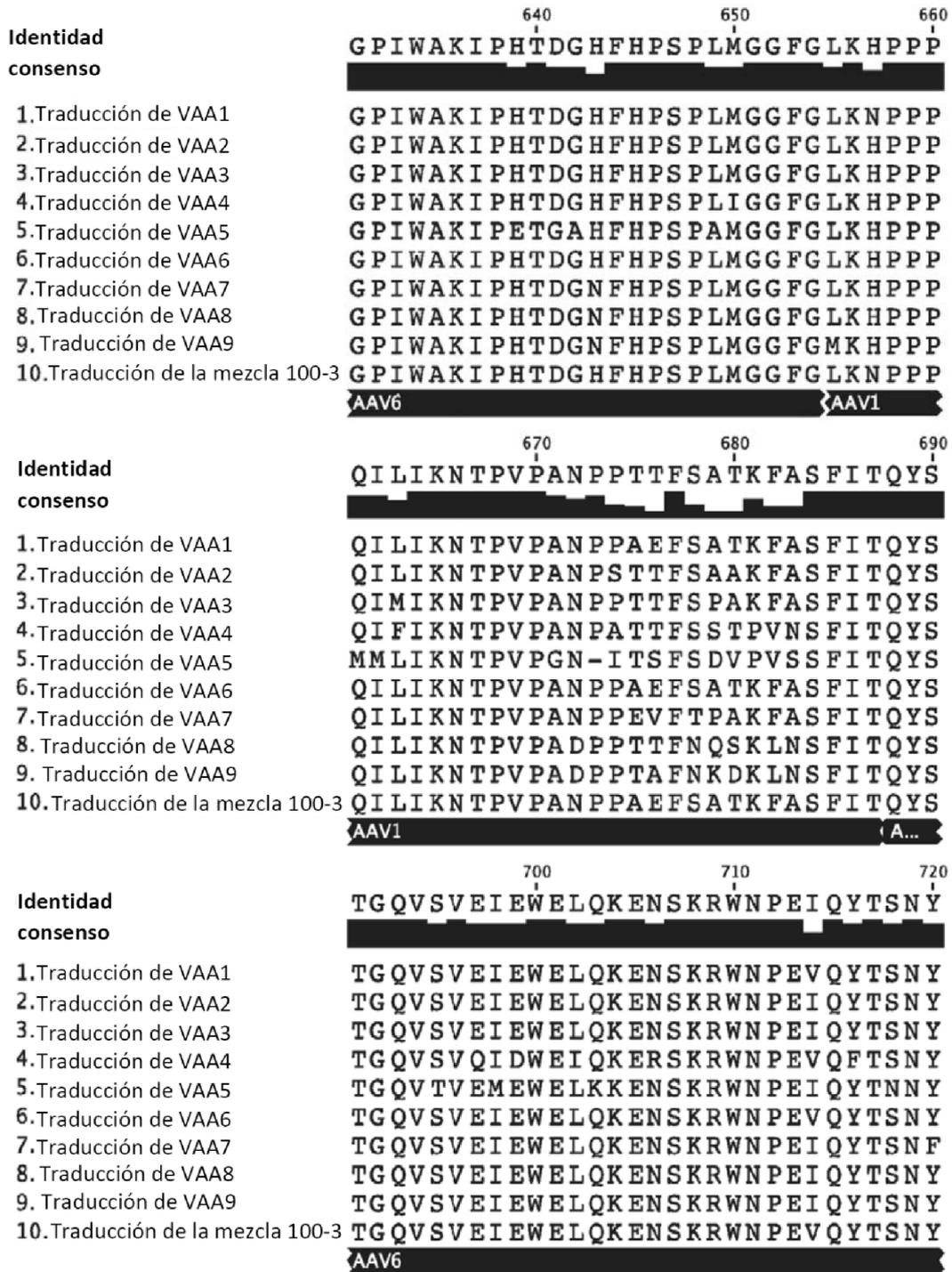


Figura 9H

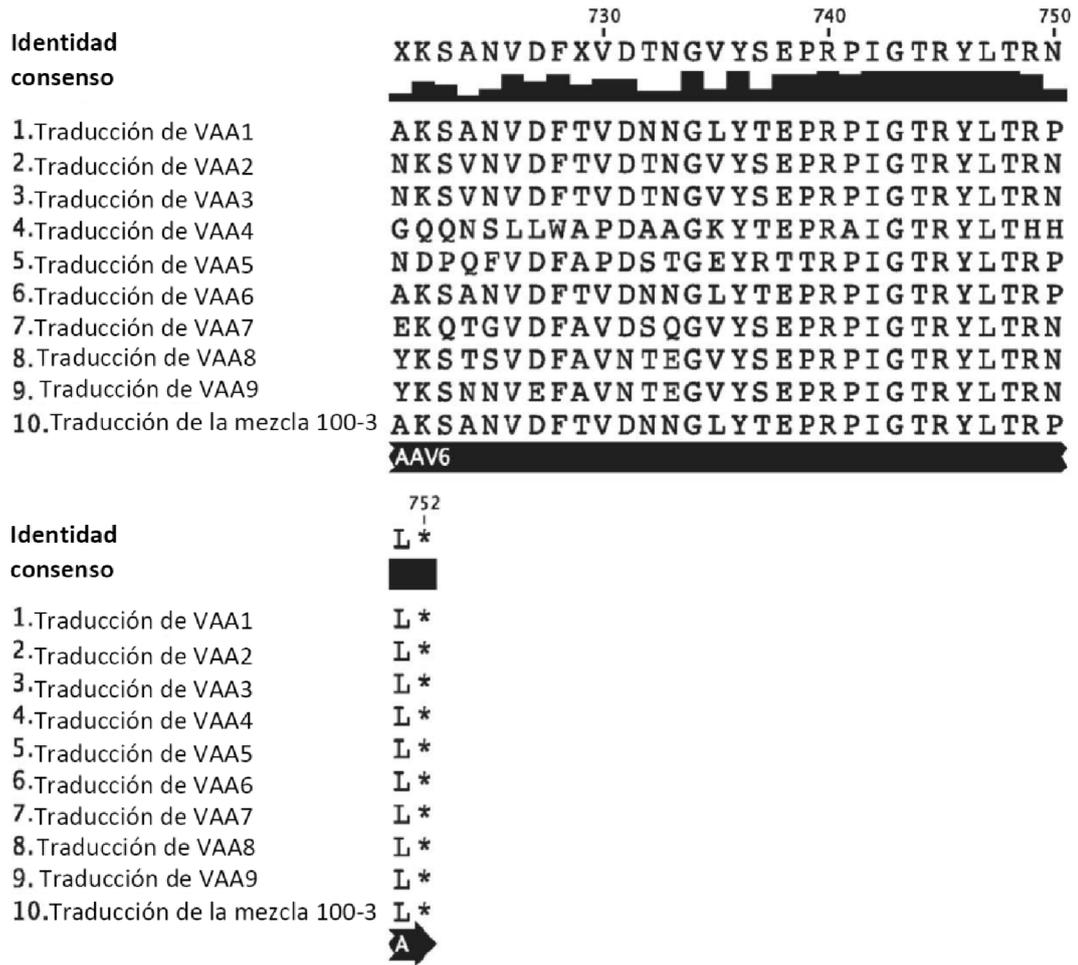


Figura 9I

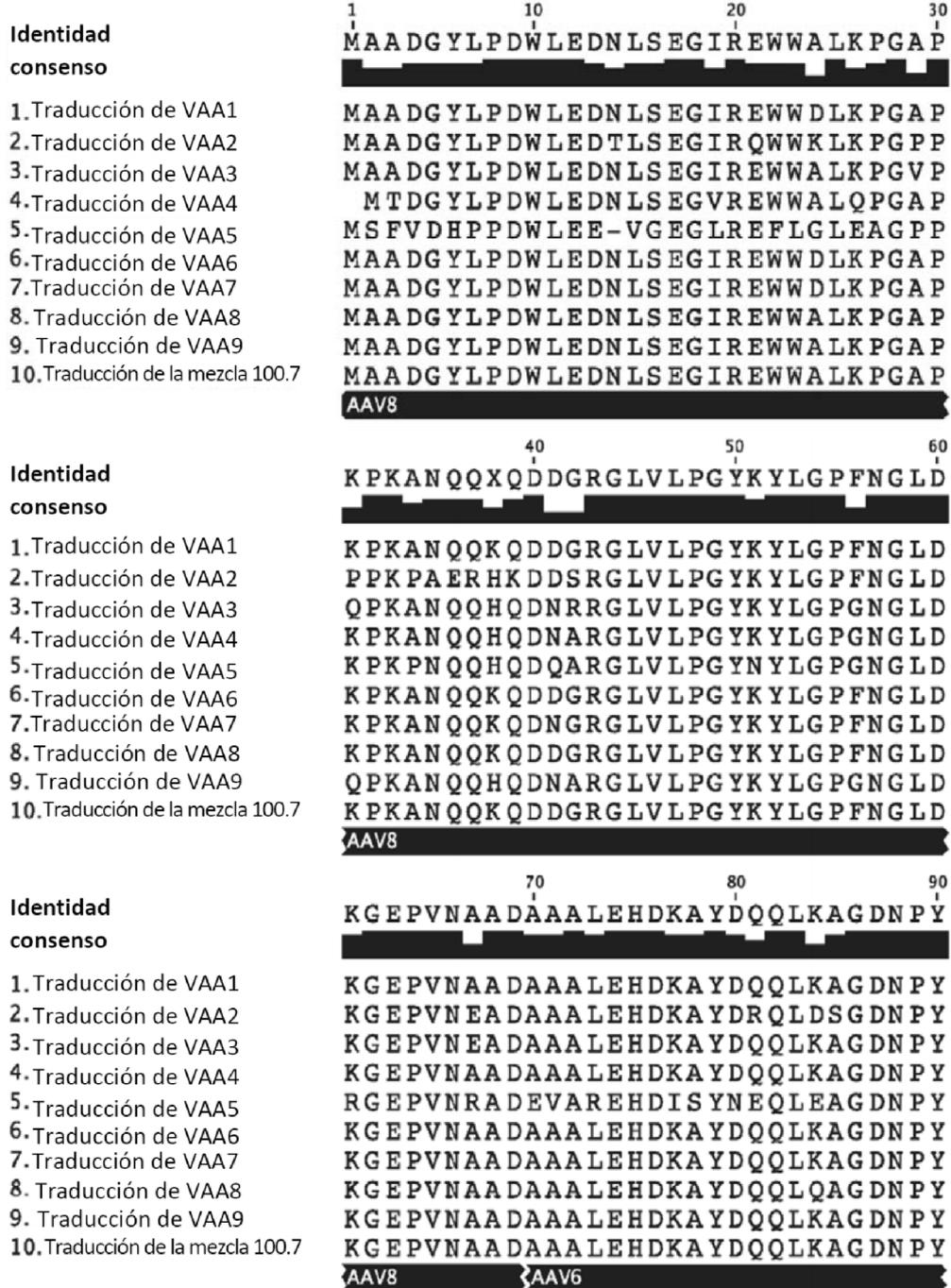


Figura 10A

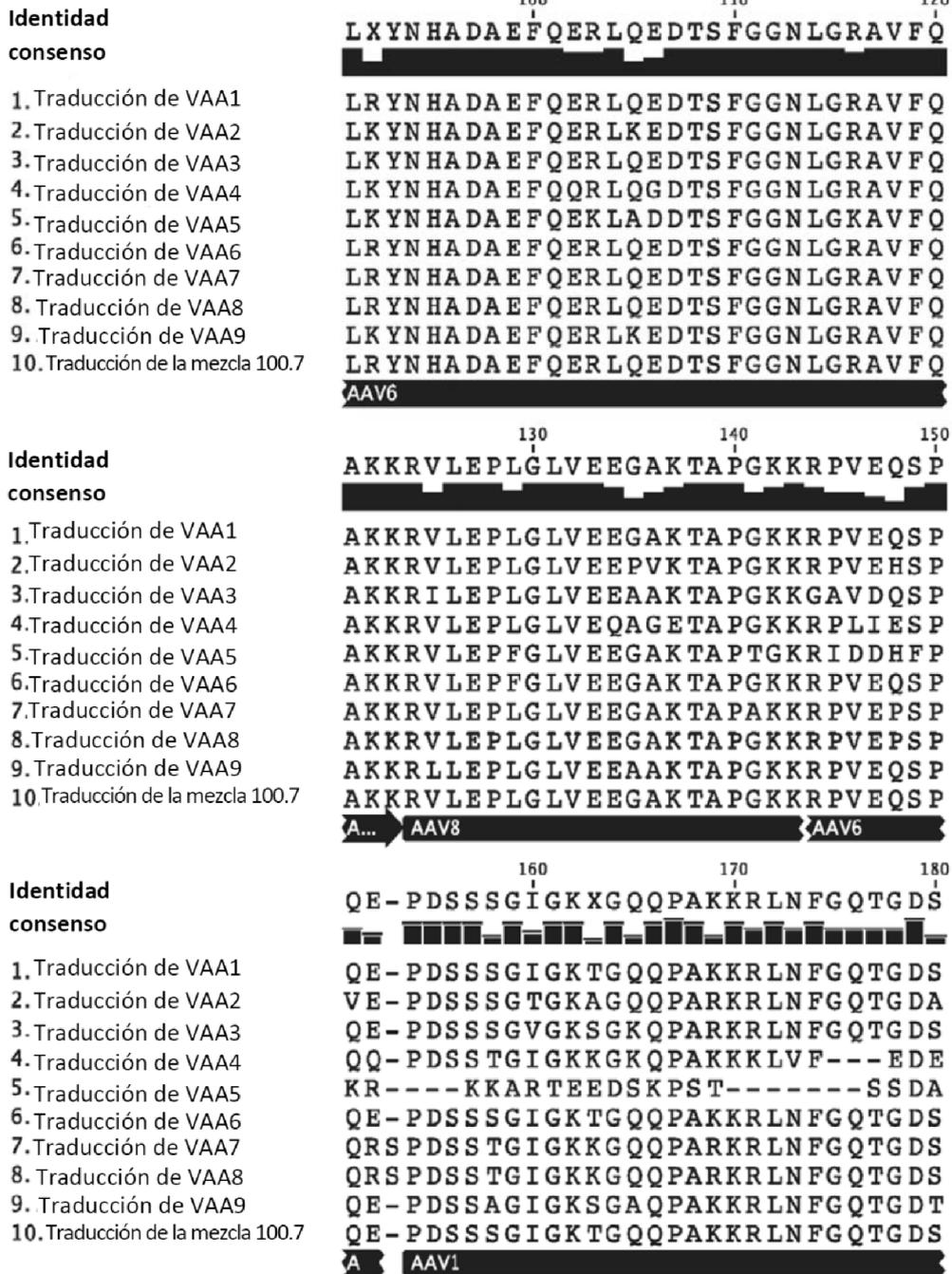


Figura 10B

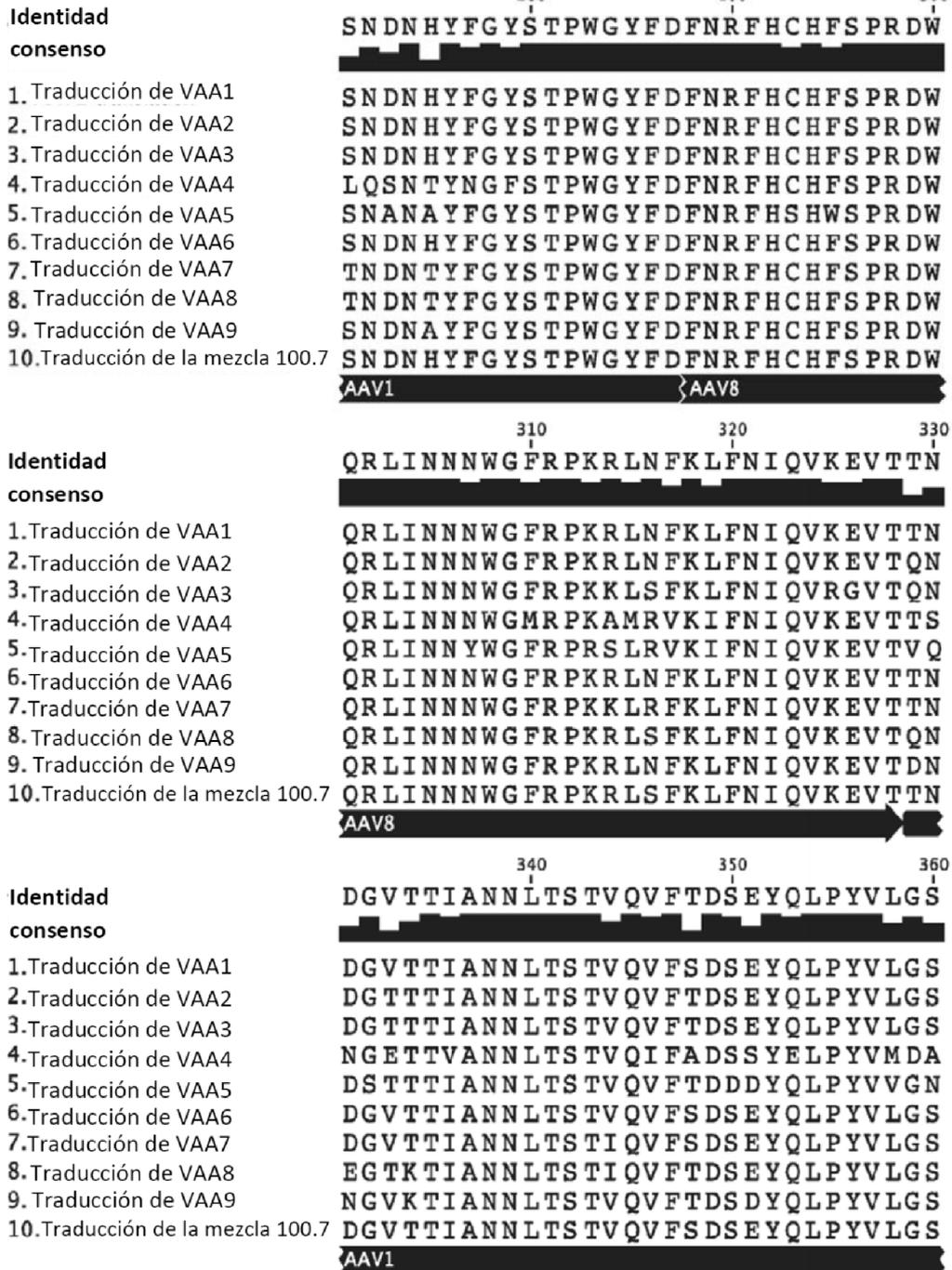


Figura 10D

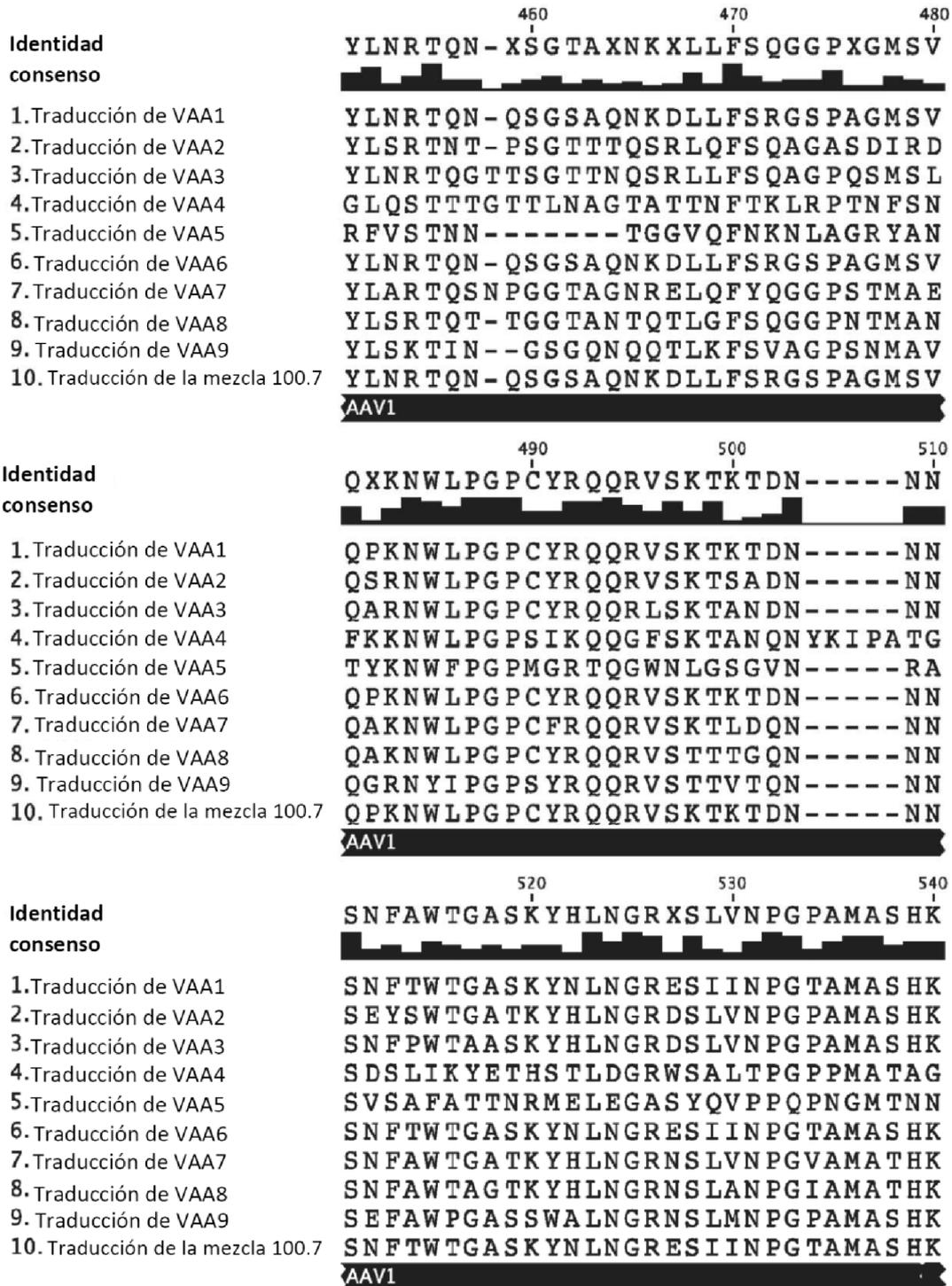


Figura 10F

**Identidad
consenso**

1. Traducción de VAA1
2. Traducción de VAA2
3. Traducción de VAA3
4. Traducción de VAA4
5. Traducción de VAA5
6. Traducción de VAA6
7. Traducción de VAA7
8. Traducción de VAA8
9. Traducción de VAA9
10. Traducción de la mezcla 100.7

550 560 570
DDEDKFFPMSGVLI FGKQGAGASNTAL---

DDEDKFFPMSGVMI FGKESAGASNTAL---
DDEEKFFPQSGVLI FGKQGSEKTNVDI---
DDEEKFFPMHGNLI FGKEGTTASNAEL---
PADSKFSNSQLI FAGPKQNGNTATVP----
LQGSNTYALENTMI FNSQPANPGTTATYLE
DDKDKFFPMSGVMI FGKESAGASNTAL---
DDEDRFFPSSGVLI FGKTGATNKTTL----
DDEERFFPSNGILI FGKQNAARDNADY---
EGEDRFFPLSGSLI FGKQGTGRDNVDA---
DDEDKFFPMSGVMI FGKESAGASNTAL---

AAV1 AAV1

**Identidad
consenso**

1. Traducción de VAA1
2. Traducción de VAA2
3. Traducción de VAA3
4. Traducción de VAA4
5. Traducción de VAA5
6. Traducción de VAA6
7. Traducción de VAA7
8. Traducción de VAA8
9. Traducción de VAA9
10. Traducción de la mezcla 100.7

580 590 600
DNVMI TDEEEI KXTNPVATER YGTVAXNLQ

DNVMI TDEEEI KATNPVATER FGTVA VNFQ
EKVMI TDEEEI R TTNPVATE QYGSVSTNLQ
DNVMI TDEEEI R TTNPVATE QYGTVANNLQ
GTLIFTSEEE LAATNATD TDMWGNLPGGDQ
GNMLITSESE TQPVNRVA YNVGGQMATNNQ
DNVMI TDEEEI KATNPVATER FGTVA VNLQ
ENVLMTNEEEI RPTNPVATEE YGIVSSNLQ
SDVMLTSEEEI KTTNPVATEE YGIVADNLQ
DKVMI TNEEEI KTTNPVATES YGQVATNHQ
DNVMI TDEEEI KATNPVATER FGTVA VNFQ

AAV1

**Identidad
consenso**

1. Traducción de VAA1
2. Traducción de VAA2
3. Traducción de VAA3
4. Traducción de VAA4
5. Traducción de VAA5
6. Traducción de VAA6
7. Traducción de VAA7
8. Traducción de VAA8
9. Traducción de VAA9
10. Traducción de la mezcla 100.7

610 620 630
SSXTAPATG DVNAQ GALPGMVWQDRDVYLQ

SSSTDPATG DVHAMGALPGMVWQDRDVYLQ
RGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQ
SSNTAPTGT VNHQ GALPGMVWQDRDVYLQ
SNSNLPTVDR L TALGAVPGMVWQNRDIYYQ
SSTTAPATG TYNLQEI VPGSVWMERDVYLQ
SSSTDPATG DVHVMGALPGMVWQDRDVYLQ
AANTAAQTQVVNNQ GALPGMVWQNRDVYLQ
QQNTAPQIGTVNSQ GALPGMVWQNRDVYLQ
SAQAQAQTGWVQNGI LPGMVWQDRDVYLQ
SSSTDPATG DVHAMGALPGMVWQDRDVYLQ

AAV1

Figura 10G

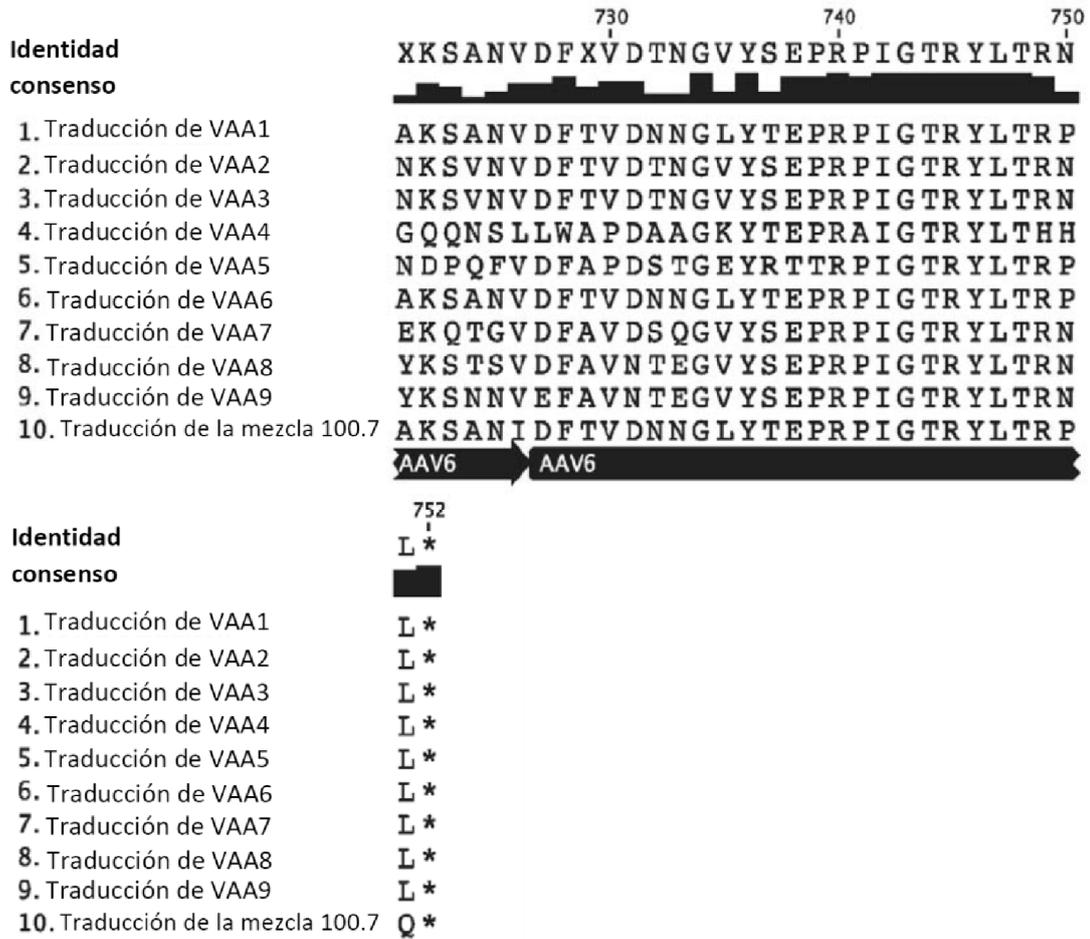


Figura 10I

Serotipo		Animal	Dilución de suero neutralizante						
			VAA1	VAA2	VAA8	Mezcla 100-3	Mezcla 100-7	SM 10-2	
VAA1	1	1:1000	ninguno	1:250	1:250	1:1000	ninguno	ninguno	
	2	1:1000	1:25	1:250	1:250	1:1000	ninguno	ninguno	
	3	1:1000	ninguno	1:250	1:250	1:1000	ninguno	ninguno	
VAA2	1	1:50	1:500	1:100	ninguno	ninguno	1:250	1:500	
	2	1:50	1:500	1:100	ninguno	ninguno	1:25	1:500	
	3	1:1000	1:1000	1:100	ninguno	ninguno	1:100	1:500	
VAA8	1	1:100	ninguno	1:250	ninguno	ninguno	1:100	ninguno	
	2	1:250	ninguno	1:100	ninguno	ninguno	1:100	ninguno	
	3	1:250	ninguno	1:250	ninguno	ninguno	1:250	ninguno	
Mezcla 100-3	1	1:1000	ninguno	1:500	1:100	1:1000	ninguno	ninguno	
	2	1:1000	ninguno	1:500	1:100	1:1000	ninguno	ninguno	
	3	1:1000	ninguno	1:100	1:250	1:1000	ninguno	ninguno	
Mezcla 100-7	1	1:1000	ninguno	1:100	1:100	1:500	1:1000	ninguno	
	2	1:1000	ninguno	1:100	1:250	1:1000	1:1000	ninguno	
	3	1:1000	ninguno	1:50	1:100	1:1000	1:1000	ninguno	

Figura 11