

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 869 284**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 14/005** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016 PCT/US2016/065969**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17100671**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016 E 16873985 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2021 EP 3387137**

---

(54) Título: **Péptidos de diana para dirigir virus adenoasociados (AAV)**

(30) Prioridad:

**11.12.2015 US 201562266184 P**  
**14.11.2016 US 201662421891 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.10.2021**

(73) Titular/es:

**CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY (100.0%)**  
**Office of Technology Transfer, 1200 E. California Blvd., MC 6-32 Pasadena, CA 91125, US**

(72) Inventor/es:

**DEVERMAN, BENJAMIN, E.; GRADINARU, VIVIANA y CHAN, KEN, Y.**

(74) Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 869 284 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**

Péptidos de diana para dirigir virus adenoasociados (AAV)

5 ANTECEDENTES

Campo

10 [0001] La presente solicitud se refiere en general al campo de la administración de genes. Más particularmente, la solicitud se refiere a secuencias de péptidos capaces de dirigir virus adenoasociados (AAV) a tejidos u órganos diana, nuevos AAV recombinantes.

Descripción de la técnica relacionada

15 [0002] Los virus adenoasociados recombinantes (rAAV) son vectores usados para la transferencia génica *in vivo* para llevar a cabo terapias génicas y facilitar la transferencia génica crítica para una amplia variedad de estudios científicos básicos. Varias características hacen que los rAAV sean atractivos como vehículos de administración de genes: (i) proporcionan expresión transgénica a largo plazo, (ii) no están asociados con ninguna enfermedad humana conocida, (iii) provocan respuestas inmunitarias relativamente débiles, (iv) son capaces de transducir un una variedad de tipos de células 20 que se dividen y no se dividen y (v) el genoma del rAAV puede empaquetarse en una variedad de cápsides, o cubierta proteica del virus, que tienen diferentes características de transducción y tropismos tisulares. Las terapias génicas que utilizan vectores rAAV han tenido éxito en ensayos clínicos que incluyen el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber, la hemofilia asociada con la deficiencia de factor IX y la deficiencia de lipoproteína lipasa. Además, la terapia basada en el gen rAAV ha sido exitosa en modelos preclínicos en una variedad de enfermedades que incluyen síndrome 25 de Rett, ELA congénita, Parkinson, enfermedad de Huntington y atrofia muscular espinal. La terapia basada en rAAV también ha mostrado éxito en la liberación de anticuerpos neutralizantes para tratar enfermedades infecciosas como el VIH y la influenza. Los rAAV también son vectores populares para la administración *in vivo* de transgenes para estudios científicos no terapéuticos, como los optogénicos. Sin embargo, el uso exitoso de rAAV para el tratamiento de enfermedades y para la entrega de genes para estudios científicos para muchas aplicaciones se ha visto limitado por la 30 falta de serotipos de la cápside que pueden transducir de manera eficiente ciertos tipos de células difíciles y la falta de serotipos que pueden hacerlo de manera eficiente y apuntar selectivamente a un tipo de célula/órgano deseado después de la administración sistémica.

35 [0003] Los documentos WO 2009/012176, WO 2015/168666 y US 2015/079038 describen varios vectores de AAV y proteínas de la cápside.

SUMARIO

40 [0004] La invención proporciona un vector de AAV que comprende una secuencia de 11 aminoácidos contiguos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>, en donde

X<sub>1</sub> es D, A, E, Q, N, G o S;

X<sub>2</sub> es G, N, S, T, Q o V;

X<sub>3</sub> es T, S o N;

X<sub>4</sub> es L o V;

X<sub>5</sub> es A, S, Q, P, o T;

X<sub>6</sub> es V, T, Q, N, L o M;

X<sub>7</sub> es P;

X<sub>8</sub> es F, Y, V, L, C, o S;

X<sub>9</sub> es K, R o S;

X<sub>10</sub> es A o N; y

50 X<sub>11</sub> es Q o P, en donde el vector AAV no comprende la secuencia de aminoácidos AQTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1).

55 [0005] La invención también proporciona una proteína de la cápside de AAV que comprende el péptido de AAV de la invención.

[0006] En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos es parte de, o comprende un péptido dirigido. En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es D, X<sub>2</sub> es G, X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es L, X<sub>6</sub> es V o T, X<sub>8</sub> es F, cualquier combinación de los mismos.

60 En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es D, X<sub>2</sub> es G, X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es L, X<sub>6</sub> es V o T, o X<sub>8</sub> es F. En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es D, X<sub>2</sub> es G, X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es L, X<sub>6</sub> es V o T, y X<sub>8</sub> es F. En algunas realizaciones, X<sub>4</sub> es L, X<sub>5</sub> es A, X<sub>6</sub> es V, X<sub>7</sub> es P, X<sub>8</sub> es F, X<sub>9</sub> es K, X<sub>10</sub> es A y X<sub>11</sub> es Q. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> son DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> son AQ, X<sub>6</sub> es V, X<sub>7</sub> es P, X<sub>8</sub> es F, X<sub>9</sub> es K, X<sub>10</sub> es A y X<sub>11</sub> es Q. En algunas realizaciones, X<sub>3</sub> es T y X<sub>4</sub> es L. En algunas realizaciones, X<sub>5</sub> es A. En algunas 65 realizaciones, X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es Q, X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es L, X<sub>8</sub> es F, X<sub>9</sub> es K, X<sub>10</sub> es A y X<sub>11</sub> es Q. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub> son AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP o TPP. En algunas realizaciones, los

5 aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  son AQTLAV y  $X_{10}X_{11}$  es AQ. En algunas realizaciones, los aminoácidos  $X_7X_8X_9$  son PFK. En algunas realizaciones, los aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$  son AQTLAVPF. En algunas realizaciones, los aminoácidos  $X_9X_{10}X_{11}$  son KAQ, KAP o SNP. En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos continuos es parte de una proteína de la cápside del vector AAV. En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos se inserta entre AA586-589 de una secuencia de proteína de la cápside de AAV, por ejemplo SEQ ID NO: 45, del vector. En algunos casos, la secuencia de 11 aminoácidos continuos es una de las SEQ ID NO: 1-36.

10 [0007] También se describe en la presente invención un vector de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 4 aminoácidos contiguos de la secuencia de QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). La secuencia de aminoácidos puede ser, por ejemplo, parte de una proteína de la cápside del vector AAV. En algunos casos, la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) se inserta entre AA588-589 de una secuencia AAV del vector (SEQ ID NO: 45). En algunos casos, la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) se inserta entre AA586-592 de una secuencia AAV del vector (SEQ ID NO: 45). En algunos casos, la secuencia de aminoácidos comprende además al menos dos de los aminoácidos 587, 588, 589 o 590 de SEQ ID NO: 45.

15 [0008] En este documento se describe una composición farmacéutica que comprende uno o más de los vectores AAV descritos en este documento y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 [0009] También se describe en este documento un péptido, en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos expuesta según una de las SEQ ID NOs: 1-44, 48-53, 65-68, y 80-93. En algunas realizaciones, el péptido se conjuga con una nanopartícula, una segunda molécula, una proteína de la cápside viral o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el péptido es parte de un AAV. Por ejemplo, el péptido puede ser una proteína de la cápside del AAV.

25 [0010] Algunos ejemplos descritos en este documento describen secuencia ácido nucleico que codifica la totalidad de los péptidos, incluyendo los péptidos de direccionamiento y fragmentos de los mismos.

30 [0011] También se describe en el presente documento una proteína de la cápside que comprende uno más péptidos dirigidos descritos en este documento. Por ejemplo, la proteína de la cápside puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 4 aminoácidos contiguos de la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). En algunas realizaciones, la proteína de la cápside comprende una secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ , en donde

35 X<sub>1</sub> es D, A, E, Q, N, G o S;  
 X<sub>2</sub> es G, N, S, T, Q o V;  
 X<sub>3</sub> es T, S o N;  
 X<sub>4</sub> es L o V;  
 X<sub>5</sub> es A, S, Q, P, o T;  
 X<sub>6</sub> es V, T, Q, N, L o M;  
 40 X<sub>7</sub> es P;  
 X<sub>8</sub> es F, Y, V, L, C, o S;  
 X<sub>9</sub> es K, R o S;  
 X<sub>10</sub> es A o N; y  
 X<sub>11</sub> es Q o P, en donde la proteína de la cápside no comprende la secuencia de aminoácidos AQTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es D, X<sub>2</sub> es G, X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es L, X<sub>6</sub> es V o T, o X<sub>8</sub> es F. En algunas realizaciones, X<sub>4</sub> es L, X<sub>5</sub> es A, X<sub>6</sub> es V, X<sub>7</sub> es P, X<sub>8</sub> es F, X<sub>9</sub> es K, X<sub>10</sub> es A y X<sub>11</sub> es Q. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> son DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> son AQ, X<sub>6</sub> es V, X<sub>7</sub> es P, X<sub>8</sub> es F, X<sub>9</sub> es K, X<sub>10</sub> es A y X<sub>11</sub> es Q. En algunas realizaciones, X<sub>3</sub> es T y X<sub>4</sub> es L. En algunas realizaciones, X<sub>5</sub> es A. En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es Q, X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es L, X<sub>8</sub> es F, X<sub>9</sub> es K, X<sub>10</sub> es A y X<sub>11</sub> es Q. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub> son AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP o TTP. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> son AQTLAV y X<sub>10</sub>X<sub>11</sub> es AQ. En algunas realizaciones, X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub> es PFK. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub> son AQTLAVPF. En algunas realizaciones, los aminoácidos X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub> son KAQ, KAP o SNP. También se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de la cápside descritas en este documento y los fragmentos de las mismas.

45 [0012] También se describe un método para suministrar un ácido nucleico a un entorno de destino de un sujeto en necesidad. El método, en algunos casos, comprende: proporcionar una composición que comprende un VAA, en donde el VAA comprende una proteína de la cápside que comprende una secuencia de 11 aminoácidos contiguos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>, y en donde el AAV comprende un ácido nucleico que se administrará al entorno diana del sujeto, en donde

50 X<sub>1</sub> es D, A, E, Q, N, G o S;  
 X<sub>2</sub> es G, N, S, T, Q o V;  
 X<sub>3</sub> es T, S o N;  
 X<sub>4</sub> es L o V;

X<sub>5</sub> es A, S, Q, P, o T;  
X<sub>6</sub> es V, T, Q, N, L o M;  
X<sub>7</sub> es P;  
X<sub>8</sub> es F, Y, V, L, C, o S;  
X<sub>9</sub> es K, R o S;  
X<sub>10</sub> es A o N; y

5 X<sub>11</sub> es Q o P, en donde la proteína de la cápside no comprende la secuencia de aminoácidos AQTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1); y administrar la composición al sujeto. El método, en algunos casos, comprende: proporcionar una composición que comprende un AAV, en donde el AAV comprende una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 4 aminoácidos contiguos de la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37), y en donde el AAV comprende un ácido nucleico que se administrará al entorno diana del sujeto; y administrar la composición al sujeto. El entorno diana puede ser, por ejemplo, el corazón, el sistema nervioso o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el entorno diana es el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, el corazón o una combinación de los mismos. En algunas 10 realizaciones, el entorno diana son neuronas, astrocitos, cardiomiositos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica. En algunos casos, el ácido nucleico que se administrará al sistema nervioso comprende uno o más de: a) una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor trófico, un factor de crecimiento o una proteína soluble; b) un ADNc que restaura la función de las 15 proteínas en humanos o animales que albergan una mutación o mutaciones genéticas en ese gen; c) un ADNc que codifica una proteína que puede usarse para controlar o alterar la actividad o el estado de una célula; d) un ADNc que codifica una proteína o un ácido nucleico utilizado para evaluar el estado de una célula; e) un ADNc y/o ARN guía asociado para realizar ingeniería genómica; f) una secuencia para la edición del genoma mediante 20 recombinación homóloga; g) una secuencia de ADN que codifica un ARN terapéutico; h) un shARN o un sistema de suministro de miARN artificial; y i) una secuencia de ADN que influye en el corte y empalme de un gen 25 endógeno. El sujeto que lo necesita puede ser, por ejemplo, un sujeto que padece o corre el riesgo de desarrollar uno o más de dolor crónico, insuficiencia cardíaca, arritmias cardíacas, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson. (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular espinal tipos I y II (AME I y II), ataxia de Friedreich (FA), ataxia espinocerebelosa, 30 trastornos de almacenamiento lisosómico que involucran células dentro del SNC. El trastorno de almacenamiento lisosómico puede ser, por ejemplo, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Sandhoff, Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher (tipo I, II o III), enfermedad de Niemann-Pick (deficiencia de NPC1 o NPC2), síndrome de Hurler, enfermedad de Pompe o enfermedad de Batten. En algunos casos, el AAV se administra al sujeto mediante administración intravenosa o administración sistémica. El sistema nervioso puede ser, por ejemplo, el sistema nervioso central. En algunos casos, el ácido nucleico se administra a los ganglios de la raíz dorsal, órganos 35 viscerales o una combinación de los mismos del sujeto. En algunos casos, el ácido nucleico se administra a astrocitos, neuronas o una combinación de los mismos del sujeto. En algunos casos, el sujeto es un animal adulto.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 [0013]

FIG. 1 muestra un esquema de la estrategia de diversificación utilizada para generar la biblioteca AAV-PHP.B-XXX. La cápside de AAV que contenía el 7-mer de AAV-PHP.B se diversificó en 3 posiciones consecutivas de 45 aminoácidos indicadas por XXX comenzando en 2 aminoácidos (en lo sucesivo denominados "AA") desde la inserción del 7mer y continuando hasta +9 AA. Cada biblioteca XXX fue desplazada por 2AA. Se generaron un total de 5 bibliotecas XXX para abarcar los 11 AA. A continuación, los fragmentos de PCR de AAV-PHP.B-XXX se ensamblaron en el plásmido acceptor rAAV-Cap-in-cis como se describe en la publicación de patente estadounidense 2015/0079038. Y este genoma de rAAV se utilizó para generar la biblioteca de virus de AAV que 50 luego se inyectó a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  vg/ratón en ratones adultos GFAP-Cre, Vgat-IRES-Cre y Vglut-IRES-Cre, para la selección de las variantes que transducir astrocitos, neuronas GAGAérgicas y neuronas glutamatérgicas, respectivamente. Después de dos rondas de selección, se encontró que numerosas variantes estaban 55 enriquecidas en las secuencias recuperadas de una o más de las líneas Cre. Se eligió una de esas secuencias, AAV-PHP.N (DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4)) para caracterización como variante individual. Los tres aminoácidos de AAV-PHP.N que se variaron de AAV-PHP.B son DGT y la secuencia que se diferencia de AAV-PHP.B es DG.

FIG. 2 muestra AAV-PHP.N transduciendo neuronas del SNC de forma más eficiente que AAV-PHP.B. Las imágenes se tomaron 2 semanas después de la inyección intravenosa de una dosis baja ( $3.3 \times 10^{10}$  vg/ratón) de 60 AAV-CAG-mNeonGreen empaquetado en AAV-PHP.B (arriba) o AAV-PHP.N (abajo). Los puntos brillantes indican la expresión de la proteína mNeonGreen (y por tanto la transducción de AAV). Las imágenes muestran una mayor expresión de AAV-PHP.N en la corteza, el cerebro y la circunvolución gentate en comparación con la expresión de AAV-PHP.B. Así, en comparación con AAV-PHP.B, AAV-PHP.N proporciona una mayor transducción de células con la morfología de neuronas en varias regiones del cerebro. Las barras de escala son 200  $\mu$ m.

65 FIGS. 3A-3D representan la transducción mejorada de AAV-PHP.S en el corazón del ratón y los nervios periféricos en comparación con AAV9. FIG. 3A muestra las fibras sensoriales que entran en la médula espinal

dorsal de ratones 3 semanas después de la inyección intravenosa de  $2 \times 10^{12}$  vg/ratón de ssAAV9: CAG-NLS-GFP o ssAAV-PHP.S:CAG-NLS-GFP (NLS, señal de localización nuclear) en ratones adultos. AAV-PHP.S proporciona una expresión de GFP más fuerte en las fibras sensoriales que AAV9, como lo demuestra la tinción más brillante de la muestra tratada con AAV-PHP.S en relación con la muestra tratada con AAV9. **FIG. 3B** muestra imágenes de fluorescencia nativa de la expresión de la proteína GFP, mostradas por señales brillantes, desde el corazón 3 semanas después de la administración intravenosa de  $1 \times 10^{12}$  genomas de vector (vg)/ratón de AAV9 recombinante monocatenario (ss): CAG-GFP-2A-Luc o ssAAV-PHP.S:CAG-GFP-2A-Luc. **FIG. 3C** muestra una imagen de proyección 3D que muestra fluorescencia nativa en un ganglio de la raíz dorsal de un ratón 4 semanas después de la inyección de una mezcla de  $1 \times 10^{12}$  vg de ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen y  $1 \times 10^{12}$  vg de ssAAV-PHP.S:CAG-mTurquesa. Ambos canales se muestran juntos en la imagen en escala de grises. **FIG. 3D** representa células transductoras de AAV-PHP.S dentro del sistema nervioso entérico después de una inyección intravenosa. Los puntos brillantes marcan las células transducidas por AAV-PHP.S. Las imágenes muestran una proyección de intensidad máxima del intestino de un ratón adulto evaluada 3 semanas después de la administración intravenosa de  $1 \times 10^{12}$  vg/ratón de ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen. Los puntos brillantes muestran la expresión mNeon-Green del vector AAV-PHP.S (consulte el panel izquierdo y el panel superior derecho). Las neuronas con el plexo mientérico están marcadas con un anticuerpo contra pgp9.5 y los núcleos marcados por DAPI se muestran en el panel inferior derecho.

**FIGS. 4A-4G** representan la recuperación dependiente de Cre de las secuencias de la cápside de AAV de las células diana transducidas. **FIG. 4A** muestra una descripción general del proceso de selección CREATE. La PCR se utiliza para introducir diversidad (banda vertical de espectro visual completo) en un fragmento del gen de la cápside. El fragmento se clona en el genoma de rAAV que alberga el gen de la cápside restante y se usa para generar una biblioteca de variantes de virus. La biblioteca se inyecta en animales transgénicos Cre y se usa PCR para recuperar selectivamente secuencias de cápside de células Cre<sup>+</sup>. **FIG. 4B** representa el genoma de rAAV de rAAV-Cap-in-cis-lox. Cre invierte la secuencia de poliadenilación (pA) flanqueada por los sitios lox71 y lox66. Se utilizan cebadores de PCR (medias flechas) para amplificar selectivamente secuencias recombinadas con Cre. **FIG. 4C** representa productos de PCR de la amplificación dependiente de la recombinación Cre (arriba) e independiente (abajo) de las secuencias de la biblioteca de cápside recuperadas de dos ratones Cre<sup>+</sup> o Cre<sup>-</sup>. Los esquemas (abajo) muestran las estrategias de amplificación por PCR (véanse las **FIGS. 8A-8B** para obtener detalles). **FIG. 4D** es una ilustración esquemática de los genes AAV dentro del plásmido auxiliar Rep-AAP AAV y las proteínas codificadas por el gen cap. Los codones de parada insertados en el gen cap eliminan la expresión de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. **FIG. 4E** representa genomas de vector de AAV resistentes a DNasa (vg) producidos con el genoma dividido AAV2/9 rep-AAP y rAAV-Cap-in-cislox (arriba) en comparación con el vg producido con AAV2/9 rep-cap helper estándar y rAAV-Genoma de UBC-mCherry (centro) o con el genoma AAV2/9 rep-AAP y rAAV-UBCmCherry (abajo). N = 3 ensayos independientes por grupo; medio ± d.e.; \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001; ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Tukey. **FIG. 4F** representa la clonación de la biblioteca de cápsides de 7-mer en el vector rAAV- ΔCap-in-cis. **FIG. 4G** representa el modelo de superficie AAV9. **FIGS. 4F-4G** muestra la ubicación del 7-mer insertado entre AA588-589.

**FIGS. 5A-5G** representan la administración de genes mediada por AAV-PHP.B a través del SNC después de la inyección intravenosa en ratones adultos. En las **FIGS. 5A-5F**, ssAAV9: CAG-GFP o ssAAV-PHP.B: CAG-GFP a la dosis de  $1 \times 10^{12}$  vg/ratón o  $1 \times 10^{11}$  vg/ratón se inyectó por vía intravenosa en ratones adultos. **FIG. 5A**, muestran imágenes de expresión de GFP (indicativas de la expresión de genomas de ssAAV suministrados por la cápside indicada) en ratones que recibieron AAV9 (izquierda) y ratones que recibieron AAV-PHP.B (centro y derecha), respectivamente, tres semanas después de la inyección. La expresión de GFP se muestra mediante señales brillantes. **FIG. 5B** muestra la expresión de GFP (indicada por señales brillantes) en la corteza o el cuerpo estriado en imágenes confocales de proyección de intensidad máxima (MIP) de 50 μm. **FIG. 5C** muestra la expresión de la proteína GFP (indicada por señales brillantes) en la médula espinal lumbar eliminada por PARS. **FIG. 5D** muestra la expresión de la proteína GFP (indicada por señales brillantes) en la retina (izquierda: MIP de 20 μm, sección transversal; derecha: MIP de montaje completo). **FIGS. 5E-5F** muestran la expresión de las proteínas GFP (indicadas por señales brillantes) en imágenes MIP 3D de tejido eliminado por PARS de la corteza y el cuerpo estriado transducidos con AAV-PHP.B y órganos indicados de ratones transducidos con AAV9 (arriba) y AAV-PHP.B (abajo). En la **FIG. 5F**, las flechas resaltan los nervios que expresan las proteínas de la cápside. Los asteriscos en la imagen del páncreas resaltan las células de los islotes que expresan GFP. Las marcas de graduación principales en las proyecciones 3D son 100 μm. **FIG. 5G** representa biodistribución AAV en las regiones indicadas y órganos del SNC 25 días después de la inyección intravenosa  $1 \times 10^{11}$  vg en ratones adultos. N = 3 para AAV-PHP.B y n = 4 para AAV9; media +/- d.e.; \*\* p <.01, \*\*\* p <.001, pruebas t no apareadas corregidas para comparaciones múltiples por el método de Holm-Sidak. Barras de escala: 1 mm (Figuras 5A y 5C (izquierda)); 50 μm (Figuras 5B, 5C (derecha), 5D y 5E). Las principales marcas de graduación en las proyecciones 3D en las **FIGS. 5C, 5E y 5F** son 100 μm.

**FIGS. 6A-6I** representan AAV-PHP.B transducido múltiples tipos de células del SNC de manera más eficiente que AAV9. **FIGS. 6A-6E** son imágenes que muestran que AAV-PHP.B transduce astrocitos, oligodendrocitos y neuronas: expresión de proteínas GFP 3 semanas después de la inyección intravenosa de  $1 \times 10^{11}$  (**FIG. 6A**) o  $1 \times 10^{12}$  (**FIGS. 6B-6E**) de ssAAV-PHP.B: CAG-GFP en ratones adultos. **FIG. 6A** muestra una imagen MIP de tinción en el hipocampo. Las señales brillantes indican la expresión de la construcción AAV-PHP.B y las señales oscuras indican la expresión de GFAP. **FIG. 6B** muestra inmunohistoquímica para detectar la expresión de AAV-PHP.B y el marcador CC1 en la corteza. Los recuadros numerados resaltan ejemplos de células dobles positivas. Se muestran las imágenes de un solo canal correspondientes (derecha). Los asteriscos resaltan las células sin

expresión de GFP detectable. **FIG. 6C** muestra inmunohistoquímica para detectar la transducción de AAV-PHP.B y el marcador NeuN en la región cerebral indicada. **FIG. 6D** muestra imágenes MIP de fluorescencia de GFP que muestran la transducción de AAV-PHP.B y TH IHC en el mesencéfalo. **FIG. 6D** representa la transducción de AAV-PHP.B y Calbindin (Calb) IHC en el cerebelo. **FIG. 6F-6H** representan la cuantificación del porcentaje de células positivas para la transducción de AAV-PHP.B en la región del cerebro indicada 3 semanas después de la inyección. **FIG. 6I** muestra las neuronas motoras espinales ChAT transductoras de AAV-PHP.B. Los puntos brillantes muestran la expresión AAV-PHP.B. Las señales más oscuras muestran IHC para ChAT. Las imágenes muestran secciones transversales de la médula espinal completa (izquierda) o una imagen MIP del cuerno ventral (derecha). El porcentaje de ChAT en secciones de médula espinal transversales enteras (izquierda) o imagen MIP del asta ventral (derecha). El porcentaje de neuronas ChAT que expresaron AAV-PHP.B en cada región de la médula espinal se da +/- el intervalo de confianza del 95%. Para la cuantificación, n = 5 por grupo; media +/- d.e.; Se encontró que todos los pares de medias de AAV9 vs AAV-PHP.B eran diferentes (\*\* p <0,001) pruebas t no emparejadas corregidas para comparación múltiple por el método de Holm-Sidak. Barras de escala: 20 µm (FIGS. 6A-6B y FIG. 6D), 50 µm (FIG. 6C y 6I (derecha)), 200 µm (FIG. 6E) y 1 mm (FIG. 6I (izquierda)).

**FIGS. 7A-7F** representan AAV-PHP, una transducción de astrocitos del SNC y reducción del tropismo de los órganos periféricos. **FIGS. 7A-7C** y **7E** muestran expresión de AAV-PHP.A 3 semanas después de la inyección intravenosa de  $3 \times 10^{11}$  vg de ssAAV9: CAG-GFP o ssAAV-PHP.A: CAG-GFP en ratones adultos. **FIGS. 7A-7B** representan imágenes representativas de IHC para ssAAV9: CAGGFP y AAV-PHP.A: CAG-GFP. **FIG. 7C** muestra IHC para las proteínas GFP en el hipocampo. Las señales oscuras muestran IHC para GFAP en el hipocampo. Los recuadros numerados destacan ejemplos de células que expresan tanto las proteínas GFP como GFAP. Las imágenes de un solo canal correspondientes se muestran a la derecha. En la **FIG. 7D**,  $2,5 \times 10^{11}$  vg de ssAAVPHP.A: Se inyectó CAG-NLS-GFP por vía intravenosa en ratones adultos. Los gráficos muestran la cuantificación del porcentaje de células Aldh111 y NeuN positivas para NLS-GFP. **FIG. 7E** muestra expresión AAV-PHP.A (señales brillantes) en el hígado (la autofluorescencia tisular se muestra con señales oscuras). **FIG. 7F** representa biodistribución AAV en la región del SNC y órganos periféricos 25 días después de la inyección intravenosa de  $1 \times 10^{11}$  vg en ratones adultos. En las **FIGS. 7E-7F**, N = 4 por grupo; media +/- de: \*\* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001, pruebas t no apareadas corregidas para comparaciones múltiples mediante el método Holm = Sidak. Barras de escala: 1 mm (**FIG. 7A**); 100 µm (**FIG. 7B**); y 50 µm (**FIG. 7C**).

**FIGS. 8A-8B** muestran ilustraciones esquemáticas de productos de PCR y el genoma de rAAV-Cap-in-cis. **FIG. 8A** es una ilustración esquemática de productos de PCR con 7 aminoácidos (denominados "7AA" en este documento) de secuencia aleatoria (representada por la barra vertical de espectro completo) insertada después del aminoácido 588. Los cebadores utilizados para generar la biblioteca se indican por su nombre y medias flechas. La plantilla de PCR se modificó para eliminar un sitio de restricción Earl de origen natural dentro del fragmento del gen de la cápside (xE) (consulte los ejemplos para obtener más detalles). **FIG. 8B** es una ilustración esquemática que muestra el genoma de rAAV-Cap-in-cis y los cebadores utilizados para cuantificar los genomas del vector y recuperar secuencias que han transducido células que expresan Cre. La recuperación basada en PCR se realiza en dos pasos. El paso 1 proporciona la recuperación de la secuencia específica de la célula diana mediante la amplificación selectiva de las secuencias Cap de los genomas que han sufrido una inversión dependiente de Cre de la secuencia de poliadenilación (pA) cadena abajo. Para el paso 1, 9CapF funciona como cebador directo y el cebador CDF funciona como cebador inverso en moldes recombinados por Cre. El paso 2 usa los cebadores XF y AR para generar el producto de PCR que se clona en el plásmido rAAV- ΔCap-in-cis (regeneración de la biblioteca) o para clonar en un plásmido AAV2/9 rep-cap trans (caracterización de variantes). La Tabla 1 proporciona ejemplos no limitantes de las secuencias de cebadores que pueden usarse en la PCR ilustrada en las **Figs. 8A-8B**.

**FIGS. 9A-9B** representan las características de la cápside y las eficiencias de producción de las tres variantes más enriquecidas (es decir, AAVPHP.B, AAV-PHP.B2 y AAV-PHP.B3) de cada selección. **FIG. 9A** es una imagen de secciones cerebrales sagitales representativas de ratones evaluados 2 semanas después de la inyección  $3,3 \times 10^{10}$  vg/ratón de ssAAV-CAG-mNeonGreen-farnesilado (mNeGreen-f) empaquetado en AAV-PHP.B o las variantes segunda o tercera más enriquecidas, AAV-PHP.B2 y AAVPHP-B3. Las señales brillantes muestran la expresión de las proteínas GFP. Los datos son representativos de 2 (AAV-PHP.B) y 3 (AAV-PHP.B2 y AAV-PHP.B3) ratones por grupo. **FIG. 9B** muestra la cantidad de vg resistente a ADNasa obtenida de las preparaciones de las variantes individuales recuperadas de las selecciones de GFAP-Cre. Los rendimientos se dan como el número de copias del genoma del vector purificado por placa de 150 mm de células productoras; media +/- \* p <0,05, ANOVA unidireccional y prueba de comparación múltiple de Tukey. El número de preparaciones independientes para cada cápside se muestra dentro de la barra.

**FIGS. 10A-10G** son imágenes que muestran que AAV-PHP.B transduce varios tipos de células interneuronas y células endoteliales, pero no transduce la microglía. En las **FIGS. 10A-10D** se inyectaron ratones adultos con  $1 \times 10^{12}$  vg de AAVPHP.B: CAG-GFP y se evaluó la expresión de la proteína GFP 3 semanas después. Las imágenes representativas muestran IHC para la expresión de AAV-PHP.B (**FIGS. 10A-10C**) o fluorescencia nativa de la expresión de la proteína GFP (**FIG. 10D**) junto con IHC para el antígeno indicado y la región del cerebro. En la **FIG. 10E**, se inyectaron a ratones adultos  $3,3 \times 10^{10}$  vg de ssAAVPHP.B: CAG-mNeGrn-f evaluado 2 semanas después de la inyección. La fluorescencia nativa de mNeGrn-f co-localiza con la expresión de algunas células endoteliales CD31. En las **FIGS. 10F-10G**, se inyectaron ratones adultos con  $2 \times 10^{12}$  vg de ssAAVPHP.B: CAG-NLS-GFP y se evaluaron 3 semanas después de la inyección. Las señales brillantes muestran la expresión de AAV-PHP.B y la señal oscura muestra la expresión de Iba1. Los asteriscos indican células que expresan el

antígeno indicado, pero no tienen expresión detectable de AAV-PHP.B. Parvalbúmina (PV), Calbindin (Calb) y Calretinin (CR). Barras de escala: 20  $\mu\text{m}$  (**FIGS. 10A-10D**); 50  $\mu\text{m}$  (**FIGS. 10E-10F**) y 500  $\mu\text{m}$  (**FIG. 10G**).

**FIG. 11** representa la expresión de AAV-PHP.B a largo plazo en el cerebro después de la transferencia génica con AAV-PHP.B. Se inyectó por vía intravenosa a ratones adultos la dosis indicada de ssAAV-CAG-GFP empaquetada en AAV9 o AAV-PHP.B y se evaluó la fluorescencia de eGFP nativa 377 días después. Las señales brillantes indican la expresión de eGFP. N = 1 por vector/dosis.

**FIGS. 12A-12D** son imágenes representativas de la fluorescencia nativa de la expresión de la proteína GFP y IHC para varios tipos de células neuronales y gliales después de la transducción por AAV-PHP.B: CAG-NLS-GFP. En las **FIGS. 12A-12D**, se inyectaron ratones adultos con  $2 \times 10^{12}$  vg de ssAAV-PHP.B: CAG-NLS-GFP y se evaluaron 3 semanas después de la inyección. Las imágenes muestran la fluorescencia nativa de la expresión de la proteína GFP junto con IHC para el antígeno indicado en la región del cerebro indicada. En todos los paneles, las flechas indican la colocalización de la expresión de GFP con IHC para el antígeno indicado. **FIGS. 12B-12C** son imágenes confocales de un solo plano; **FIGS. 12A y 12D** son MIP. Cuerpo calloso (cc), sustancia negra pars compacta (SNc), área etiquetamental ventral (VTA). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

**FIGS. 13A-C** muestran la transducción AAV-PHP.A y AAV-PHP.B de neuronas corticales y astrocitos derivados de iPSC humanas en cultivos asociados y cultivos corticales 3D intactos. **FIG. 13A** muestra que AAV-PHP.B proporciona una mayor transducción de neuronas y astrocitos humanos en cultivos de monocapa asociados. Las imágenes representativas muestran la expresión del ADNc de GFP entregado utilizando las cápsides AAV9, AAV-PHP.A y AAV-PHP.B cinco días después de la transducción viral (ssAAV-CAG-NLS-GFP empaquetado en AAV9, AAV-PHP.A o AAV-PHP.B;  $1 \times 10^9$  vg/pocillo) de esferoides corticales humanos derivados de iPSC disociadas fueron diferenciados *in vitro*. Las células que expresan las proteínas GFP se colocalizan con astrocitos inmunoteñidos para GFAP o neuronas inmunoteñidas para MAP2 como se indica mediante flechas blancas. **FIG. 13B** muestra la cuantificación del porcentaje de células GFAP + o MAP2 + infectadas por AAV9, AAV-PHP.A o AAV-PHP.B (n = 3 diferenciaciones en esferoides corticales de dos líneas iPSC humanas derivadas de dos sujetos; ANOVA bidireccional, prueba de comparación múltiple Tukey; media +/- d.e.). **FIG. 13C** muestra que AAV9, AAV-PHP.A y AAV-PHP.B transducen cultivos corticales 3D humanos intactos (esferoides corticales diferenciados de iPSC humanas). Imágenes de criosecciones de esferoides corticales derivadas de iPSC humanas (día 205 de diferenciación *in vitro*) transducidas con ssAAV-CAG-NLS-GFP empaquetadas en AAV9, AAV-PHP.A o AAV-PHP.B muestran fluorescencia nativa de la expresión de la proteína GFP junto con inmunotinción de GFAP y MAP2. Los recuadros muestran el co-etiquetado de la proteína GFP con astrocitos GFAP + (cian) o neuronas MAP2 +. Barras de escala: 40  $\mu\text{m}$  (**FIG. 13A**); y 100  $\mu\text{m}$  (**FIG. 13C**).

**FIGS. 14A-14D** representan las cápsides AAV-PHP.B y AAV-PHP.A que se localizan en la vasculatura cerebral después de la inyección intravenosa y transducen las células a lo largo de la vasculatura 24 horas después de la administración. Se inyectaron ratones adultos con  $1 \times 10^{11}$  vg de ssAAV-CAG-NLS-GFP empaquetado en AAV9, AAV-PHP.A o AAV-PHP.B como se indica. **FIGS. 14A-14B** son imágenes representativas de inmunotinción de la cápside (tinción brillante) usando el anticuerpo B1 anti-AAV VP3 que reconoce un epítopo interno compartido en el cerebro (**FIG. 14A**) o estriado (**FIG. 14B**) en los cerebros de ratones inyectados por vía intravenosa una hora antes de la fijación por perfusión cardíaca. La inmunotinción de la cápside fue detectable en los cerebros de ratones inyectados con AAV-PHP.A y AAV-PHP.B, pero rara vez se observó en los cerebros de ratones que recibieron la misma dosis de AAV9. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (tinción oscura). La autofluorescencia de lipofuscina se puede distinguir de la tinción de la cápside por su presencia en los canales verde y rojo. El recuadro de la **FIG. 14A** muestra una imagen MIP 3D del área resaltada en la imagen AAV-PHP.B. Las flechas resaltan la señal IHC de la cápside; los asteriscos indican lúmenes vasculares. Los datos son representativos de 2 (sin virus y AAV-PHP.A) o 3 (AAV9 y AAV-PHP.B) ratones por grupo. **FIG. 14C** es una imagen representativa de la expresión de GFP (tinción brillante) con DAPI (tinción blanca) y CD31 (tinción oscura) 24 horas después de la administración de AAV-PHP.B. Las flechas resaltan las células que expresan GFP. **FIG. 14D** muestra la cuantificación del número de células de expresión de GFP presentes a lo largo de la vasculatura en las regiones cerebrales indicadas. N = 3 por grupo; media +/- de: AAV-PHP.B vs AAV9 y AAV-PHP.A, \*\*\* p <0,001 para todas las regiones; AAV9 frente a AAVPHP.A, no significativo; ANOVA bidireccional, barras de escala: 200  $\mu\text{m}$  (**FIG. 14A**); 50  $\mu\text{m}$  (**Figuras 14B-14C**); Las marcas de graduación principales son de 50  $\mu\text{m}$  en el recuadro de gran aumento (**Figura 14A**).

**FIGS. 15A-15B** muestran la expresión informadora de las tres variantes principales recuperadas de ratones GFAP-Cre. **FIG. 15A** muestran imágenes de secciones cerebrales sagitales representativas de ratones evaluados 2 semanas después de la inyección de  $3,3 \times 10^{10}$  vg/ratón de ssAAV-CAG-mNeon-Green-farnesilado (mNeGm-f) empaquetado en AAV-PHP.B o las variantes segunda o tercera más Enriquecidas, AAV-PHP.B2 y AAV-PHP.B3. Las señales brillantes indican la expresión de mNeGm-f a partir del ADNc entregado por las tres variantes Enriquecidas, AAV-PHP.B (izquierda), AAV-PHP.B2 (centro) y AAV-PHP.B3 (derecha). **FIG. 15B** muestran imágenes en escala de grises de gran aumento (40x) de la expresión de NLS-GFP dentro de secciones cerebrales evaluadas 3 semanas después de la inyección de  $2 \times 10^{12}$  vg/ratón de ssAAV-CAG-NLS-GFP empaquetado en AAV-PHP.B, AAV-PHP.B2 o AAV-B3.

**FIG. 16** son imágenes que muestran la expresión del reportero de variantes AAV-PHP.B. Los puntos brillantes indican la expresión del reportero de las variantes AAV-PHP.B. Imágenes confocales de plano único de secciones de cerebro de ratones evaluadas 2 semanas después de la inyección IV  $1 \times 10^{11}$  vg (total)/ratón de AAV-PHP.B o la variante AAV-PHP.B indicada. Cada variante se utilizó para empaquetar una combinación de reporteros: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen y mKate 2.5. Tenga en cuenta que mKate2.5 parece agregarse en algunos tipos de células, sobre todo en neuronas y células endoteliales.

**FIG. 17** representa la expresión del reportero de variantes AAV-PHP.B. Los puntos brillantes indican la expresión del reportero de las variantes AAV-PHP.B. Imágenes confocales de plano único de secciones de cerebro de ratones evaluados 3 semanas después de la inyección de  $3 \times 10^{11}$  vg (total)/ratón de la variante de AAV-PHP.B indicada. Cada variante se utilizó para empaquetar una mezcla de indicadores: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen y mRuby 2.

**FIG. 18** son imágenes que muestran la expresión del reportero de variantes AAV-PHP.B. Los puntos brillantes indican la expresión del reportero de las variantes AAV-PHP.B. Imágenes confocales de plano único de secciones de cerebro de ratones evaluados 11 días después de IV inyección de  $1 \times 10^{11}$  vg (total)/ratón de la variante de AAV-PHP.B indicada. Cada variante se utilizó para empaquetar una combinación de reporteros: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen y mRuby2.

**FIGS. 19A-19C** muestran que la transducción del SNC por AAV-PHP.B-DGT es más eficiente que por AAV-PHP.B después de la administración intravenosa de adultos. **FIG. 19A** muestra imágenes de todo el cerebro (vista dorsal) de la expresión de ssAAV-CAG-NLS-GFP 3 semanas después de la administración intravenosa de  $1 \times 10^{11}$  vg/ratón de ssAAV-CAG-NLS-GFP empaquetado en la cápside indicada. La expresión de ssAAV-CAG-NLS-GFP se indica mediante una señal de escala de grises brillante. **FIG. 19B** representa gráficos que muestran el porcentaje de núcleos totales (DAPI +) en la corteza motora (izquierda) o el cuerpo estriado (derecha) que expresan GFP. **FIG. 19C** representa gráficos que muestran la expresión media de ssAAV-CAG-NLS-GFP por núcleos de GFP<sup>+</sup>. N = 4 animales por grupo.

**FIGS. 20A-20D** representan la transducción del nervio periférico por AAV-PHP.S en comparación con AAV9.

**FIG. 20A** son imágenes de cerebro completo (vista dorsal, vista izquierda y ventral, derecha) de expresión de AAV-PHP.S tres semanas después de la administración IV de  $1 \times 10^{12}$  vg/ratón de ssAAV-CAG-NLS-GFP empaquetado en la cápside indicada. La expresión de GFP se indica en escala de grises. Tenga en cuenta que, a pesar de usar GFP localizada en el núcleo, la expresión de GFP es lo suficientemente fuerte en los axones de las neuronas periféricas que ingresan a la médula espinal y el tallo cerebral para ser visibles en estas imágenes cerebrales completas. **FIG. 20B** es una imagen que muestra una sección transversal de la médula espinal después de la transducción con  $3 \times 10^{12}$  vg (total) de ssAAV-PHP.S:CAGXFPmix. **FIG. 20C** es una imagen de proyección 3D que muestra fluorescencia nativa en un ganglio de la raíz dorsal de un ratón 4 semanas después de la inyección de una mezcla de  $1 \times 10^{12}$  vg de ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen y  $1 \times 10^{12}$  de ssAAV-PHP.S:CAGmTurquoise. **FIG. 20D** es una imagen que muestra células transductoras de AAV-PHP.S dentro del sistema nervioso entérico después de una inyección intravenosa. La fluorescencia nativa mNeonGreen (señal brillante) marca las células transducidas por AAV-PHP.S. Las imágenes muestran una proyección de intensidad máxima del intestino de un ratón adulto evaluada 3 semanas después de la administración intravenosa de  $1 \times 10^{12}$  vg/ratón de ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen. Las neuronas se marcan con un anticuerpo contra pgp9.5 (tinción gris) y los núcleos marcados con DAPI se muestran mediante tinción oscura. Los canales individuales se muestran a la derecha. La imagen superior derecha muestra la expresión de mNeonGreen en el sistema nervioso entérico indicativa de transducción por AAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen.

**FIG. 21** representa la evolución del péptido 7-mer AAV-PHP.B y secuencias flanqueantes. El PHP.B 7-mer se insertó entre AA588-589 de la cápside AAV9. Las bibliotecas de saturación de cinco sitios (XXX1-XXX5) se generaron mediante PCR, se mezclaron en cantidades iguales y se utilizaron para generar ADN. A continuación, se utilizó el ADN para generar las bibliotecas de cápsides de AAV.

**FIGS. 22A-22B** muestran las secuencias de aminoácidos de la cápside AAV-PHP.N VP1 (**FIG. 22A**) y la cápside AAV-PHP.S VP1 (**FIG. 22B**). **FIG. 22A**: la inserción AAV-PHP.S 7-mer está subrayada y los dos aminoácidos que difieren de AAV-PHP.B 7-mer están resaltados. **FIG. 22B**: el AAV-PHP.S 7-mer está subrayado.

**FIGS. 23A-23E** muestran que dos cápsides de AAV, AAV-PHP.S y AAV-PHP.N, transfieren genes de manera eficiente a los sistemas nerviosos central y periférico, respectivamente. Se injectó intravenosamente a ratones adultos la dosis indicada de virus. **FIG. 23A** muestra imágenes de la expresión de GFP en todo el cerebro. **FIGS. 23B-23C** son imágenes de la expresión de GFP en la sección sagital del cerebro. **FIGS. 23D-23E** son imágenes de expresión de GFP en secciones transversales de la médula espinal. Las señales brillantes en las imágenes indican expresión de GFP.

**FIGS. 24A-24G** muestran que AAV-PHP.N transduce varias poblaciones de neuronas de manera más eficiente que AAV-PHP.B. **FIGS. 24A-24C** son imágenes que muestran fluorescencia de GFP nativa de la expresión de proteína GFP en secciones de cerebro de ratones adultos inyectados con AAV-PHP.B (arriba) o AAV-PHP.N (abajo) en la corteza (**FIG. 24A**), cuerpo estriado (**FIG. 24B**) y cerebelo (**FIG. 24C**). La expresión de GFP está indicada por la señal brillante. **FIG. 24D** muestra el porcentaje de células de núcleo (DAPI +) que expresaron GFP después de la inyección de AAV-PHP.B o AAV-PHP.N. **FIG. 24E** muestra el porcentaje de neuronas NeuN+ (corteza o estriado) o neuronas Calbindin + (Calb) Purkinje en el cerebro que expresan GFP. **FIG. 24F** muestra el porcentaje de células S100b + que expresan GFP. **FIG. 24G** muestra la intensidad de fluorescencia media de los núcleos de GFP<sup>+</sup> individuales en la región del cerebro indicada. Los datos se generaron tomando el valor medio de fluorescencia para cada núcleo. \* p <0,05, \*\* p <0,01, prueba T para estudiantes no pareados.

**FIGS. 25A-25D** muestran que AAV-PHP.S transduce neuronas sensoriales periféricas de manera más eficiente que AAV9. **FIG. 25A** son imágenes que muestran fluorescencia de GFP nativa después de la transducción de  $1 \times 10^{12}$  vg de ssAAV-CAG-NLS-GFP empaquetados en AAV9 o AAV-PHP.S. La expresión de GFP está indicada por la señal brillante. **FIG. 25B** muestra el porcentaje de neuronas PGP9.5<sup>+</sup> DRG que expresan GFP nuclear.

**FIG. 25C** muestra la intensidad de fluorescencia mediana media de las células GFP<sup>+</sup> transducidas con el vector indicado. **FIG. 25D** muestra ganglios cardíacos que transducen AAV-PHP.S y músculo cardíaco. La

expresión AAV-PHP.S está indicada por la señal brillante. \*\* p <0,01, \*\*\*\* p <0,0001, prueba T para estudiantes no pareados.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

5

**[0014]** En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos adjuntos, que forman parte de la misma. En los dibujos, los símbolos similares identifican típicamente componentes similares, a menos que el contexto indique lo contrario. Las realizaciones ilustrativas descritas en la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones no pretenden ser limitantes. Se entenderá fácilmente que los aspectos de la presente divulgación, como se describe en general en el presente documento y se ilustra en las figuras, se pueden organizar, sustituir, combinar, separar y diseñar en una amplia variedad de configuraciones diferentes, todas las cuales se contemplan explícitamente en este documento y forman parte de esta divulgación.

**[0015]** La presente solicitud describe AAV capaces de administrar ácidos nucleicos a un entorno diana, por ejemplo, una célula, una población de células, un tejido, un órgano o una combinación de los mismos, en un sujeto transducido con los AAV. Por ejemplo, los AAV se pueden utilizar para suministrar ácidos nucleicos al sistema nervioso, por ejemplo, sistema nervioso central (SNC) y/o sistema nervioso periférico (SNP) de un sujeto. En algunos casos, los AAV se pueden usar para administrar ácidos nucleicos al corazón de un sujeto. También se describen en el presente documento péptidos capaces de dirigir los AAV a un entorno diana (p. ej., el sistema nervioso, el corazón o la combinación de los mismos) en un sujeto, proteínas de la cápside de AAV que comprenden los péptidos, composiciones (p. ej., composiciones farmacéuticas) que comprenden vectores de AAV que tienen proteínas de la cápside que comprenden los péptidos, y las secuencias de ácido nucleico que codifican los péptidos y las proteínas de la cápside de AAV. Además, también se describen métodos para preparar y usar los vectores AAV. En algunos casos, los vectores AAV se utilizan para prevenir y/o tratar una o más enfermedades y trastornos, por ejemplo, enfermedades y trastornos relacionados con el sistema nervioso y/o el corazón.

#### Definiciones

**[0016]** A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece la presente descripción. Ver, p. ej. Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2<sup>a</sup> ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994); Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Para los propósitos de la presente divulgación, los siguientes términos se definen a continuación.

**[0017]** El término "vector", como se usa en el presente documento, puede referirse a un vehículo para transportar o transferir un ácido nucleico. Los ejemplos no limitantes de vectores incluyen plásmidos y virus (p. ej., virus AAV).

**[0018]** El término "constructo", como se usa aquí, se refiere a un ácido nucleico recombinante que se ha generado para el propósito de la expresión de una secuencia(s) específica(s) de nucleótidos, o que es para ser utilizada(s) en la construcción de otra secuencias recombinante de nucleótidos.

**[0019]** Tal como se utiliza aquí, el término "plásmido" se refiere a un ácido nucleico que puede ser utilizado para replicar secuencias de ADN recombinantes dentro de un organismo huésped. La secuencia puede ser un ADN bicatenario.

**[0020]** Como se usa en el presente documento, los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" son intercambiables y se refieren a cualquier ácido nucleico, ya sea compuesto de enlaces fosfodiéster o enlaces tales como fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, modificado carbonato, carboximetiléster, acetamido, carbamato, enlaces tioéter, fosforamidato con puente, fosforamidato de metíleno con puente, fosforamidato con puente, fosforamidato con puente, fosfonato de metíleno con puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato o sultona con puente, y combinaciones de dichos enlaces. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" también incluyen específicamente ácidos nucleicos compuestos de bases distintas de las cinco bases biológicas (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo).

**[0021]** Como se usa en el presente documento, aminoácido "X<sub>n</sub>" o "Bn" de una secuencia peptídica de dos o más aminoácidos contiguos se refiere a un aminoácido en n<sup>a</sup> posición (n es un número entero positivo) de la secuencia peptídica. Por ejemplo, en una secuencia peptídica de 11 aminoácidos contiguos X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>, X<sub>1</sub> es el aminoácido en la posición 1 (es decir, la 1<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>2</sub> es el aminoácido en la posición 2 (es decir, la 2<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>3</sub> es el aminoácido en la posición 3 (es decir, la 3<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>4</sub> es el aminoácido en la posición 4 (es decir, la 4<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>5</sub> es el aminoácido en la posición 5 (es decir, la 5<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>6</sub> es el aminoácido en la posición 6 (es decir, la 6<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>7</sub> es el aminoácido en la posición 7 (es decir, el 7<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>8</sub> es el aminoácido en la posición 8 (es decir, la 8<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>9</sub> es el aminoácido en la posición 9 (es decir, la 9<sup>a</sup> posición) de la secuencia del péptido, X<sub>10</sub> es el aminoácido en la posición 10 (es decir, la 10<sup>a</sup> posición) de la secuencia de péptidos, y X<sub>11</sub> es el aminoácido en posición 11 (es decir, la 11<sup>a</sup> posición) de la secuencia peptídica. Por ejemplo, si hay A en la posición 9, G en la posición 10 y Q en la posición 11 en la secuencia de péptidos, se describe que los aminoácidos X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub> son AGQ. Como otro ejemplo, en una secuencia peptídica de

QAB3B4TSL, significa que B3 es el aminoácido en la posición 3 de la secuencia peptídica y B4 es el aminoácido en la posición 4 de la secuencia peptídica.

**[0022]** El término "secuencia de reconocimiento de recombinasa" o "sitio de reconocimiento de recombinasa" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es reconocible por una recombinasa y puede servir como sustrato para un evento de recombinación catalizada por dicha recombinasa. La secuencia puede ser, por ejemplo, ADN bicatenario.

**[0023]** El término "genoma del virus" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está flanqueada por secuencias de ácido nucleico que actúa por *cis* que median el embalaje del ácido nucleico en una cápside viral. Para AAV y parvovirus, por ejemplo, se sabe que las "repeticiones terminales invertidas" (RTI) que se encuentran en el extremo 5' y 3' del genoma viral tienen esta función y que los RTI pueden mediar el empaquetamiento de heterólogos, por por ejemplo, genomas de virus no wt, en una cápside viral.

**[0024]** El término "elemento" se refiere a una parte separada o distinta de algo, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico con una función separada dentro de una secuencia de ácido nucleico más largo. El término "elemento regulador" y "elemento de control de la expresión" se usan indistintamente en este documento y se refieren a moléculas de ácido nucleico que pueden influir en la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Estos términos se utilizan ampliamente para y cubren todos los elementos que promueven o regulan la transcripción, incluyendo promotores, elementos básicos requeridos para la interacción básica de la ARN polimerasa y factores de transcripción, elementos corriente arriba, potenciadores y elementos de respuesta (véase, p. ej., Lewin, "Genes V" (Oxford University Press, Oxford) páginas 847-873). Los elementos reguladores ejemplares en procariotas incluyen promotores, secuencias operadoras y sitios de unión a ribosomas. Los elementos reguladores que se utilizan en células eucariotas pueden incluir, sin limitación, secuencias de control de la transcripción y traducción, como promotores, potenciadores, señales de empalme, señales de poliadenilación, terminadores, señales de degradación de proteínas, elemento de entrada de ribosoma interno (IRES), secuencias 2A y similares, que proporcionan y/o regulan la expresión de una secuencia codificante y/o la producción de un polipéptido codificado en una célula huésped.

**[0025]** Tal como se utiliza aquí, el término "variante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que tiene una secuencia sustancialmente similar a un polinucleótido o polipéptido de referencia. En el caso de un polinucleótido, una variante puede tener delecciones, sustituciones, adiciones de uno o más nucleótidos en el extremo 5', extremo 3' y/o uno o más sitios internos en comparación con el polinucleótido de referencia. Las similitudes y/o diferencias en las secuencias entre una variante y el polinucleótido de referencia pueden detectarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación. Los polinucleótidos variantes también incluyen polinucleótidos derivados sintéticamente, tales como los generados, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio. Generalmente, una variante de un polinucleótido, que incluye, pero no se limita a un ADN, puede tener al menos aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más de identidad de secuencia al polinucleótido de referencia determinado mediante programas de alineación de secuencias conocidos por los expertos en la materia. En el caso de un polipéptido, una variante puede tener delecciones, sustituciones, adiciones de uno o más aminoácidos en comparación con el polipéptido de referencia. Las similitudes y/o diferencias en las secuencias entre una variante y el polipéptido de referencia pueden detectarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, transferencia Western. Generalmente, una variante de un polipéptido puede tener al menos aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más de identidad de secuencia con el polipéptido de referencia según se determina mediante programas de alineación de secuencias conocidos por los expertos en la materia.

**[0026]** El término "AAV" o "virus adenoasociado" se refiere a un dependoparvovirus dentro del género *Parvoviridae* de virus. Por ejemplo, el VAA puede ser un VAA derivado de un virus de tipo salvaje natural, un VAA derivado de un genoma de rAAV empaquetado en una cápside derivada de proteínas de la cápside codificadas por un gen cap de origen natural y/o un genoma de rAAV empaquetado en una cápside derivada de proteínas de la cápside codificadas por un gen de la cápside no natural, por ejemplo, AAV-PHP.N y AAV-PHP.S. Como se describe en el presente documento, los términos "AAV-PHP.eB", "AAV-PHP.N" y "AAV-PHP.BDGT" se usan indistintamente para referirse a una variante de AAV que tiene una proteína de la cápside no natural que comprende una secuencia de aminoácidos 11-mer DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4, que se denomina en el presente documento como secuencia "PHP.eB", "PHP.N" "PHP.B-DGT", respectivamente).

**[0027]** El término "rAAV" se refiere a un "AAV recombinante". En algunas realizaciones, un AAV recombinante tiene un genoma de AAV en donde parte o todos los genes rep y cap han sido reemplazados por secuencias heterólogas.

**[0028]** El término "plásmido auxiliar rep-cap" se refiere a un plásmido que proporciona las funciones de los genes rep y cap virales. Este plásmido puede ser útil para la producción de AAV a partir de genomas de rAAV que carecen de rep funcional y/o las secuencias del gen de la cápside.

- [0029] El término "vector" se define como un vehículo para transportar o transferir un ácido nucleico. Los ejemplos no limitantes de vectores incluyen plásmidos y virus.
- 5 [0030] El término "gen cap" se refiere a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas de la cápside que forman, o contribuyen a la formación de la cápside o cubierta de proteína del virus. En el caso de AAV, la proteína de la cápside puede ser VP1, VP2 o VP3. Para otros parvovirus, pueden diferir los nombres y números de las proteínas de la cápside.
- 10 [0031] El término "gen rep" se refiere a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas no estructurales (rep78, rep68, rep52 y rep40) requeridas para la replicación y producción de virus.
- [0032] Una "biblioteca" puede ser en forma de una multiplicidad de ácidos nucleicos lineales, plásmidos, partículas virales o vectores virales. Una biblioteca incluirá al menos dos ácidos nucleicos lineales.
- 15 [0033] Cuando las secuencias de ácidos nucleicos insertados son generados al azar, N = A, C, G, o T; K = G o T; M = A o C.
- 20 [0034] A menos que se especifique lo contrario, el extremo a mano izquierda de cualquier secuencia de polinucleótidos de una sola hebra discute en el presente documento es el extremo 5'; la dirección de la izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarios se denomina dirección 5'.
- [0035] El término "de origen natural" como se usa aquí se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza o una forma de los materiales que se encuentran en la naturaleza.
- 25 [0036] Las técnicas estándar se pueden utilizar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo de tejidos y transformación (p. ej., electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en este documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se pueden realizar generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Ver, p. ej., Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)). A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en este documento son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica y tratamiento de pacientes.
- 30 [0037] Como se usa en el presente documento, un "sujeto" se refiere a un animal que es el objeto de tratamiento, observación o experimento. "Animal" incluye vertebrados e invertebrados de sangre fría y caliente tales como peces, mariscos, reptiles y, en particular, mamíferos. Mamífero, como se usa en este documento, se refiere a un individuo que pertenece a la clase Mammalia e incluye, pero no se limita a humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, deportes y animales de compañía. Los ejemplos no limitantes de mamíferos incluyen ratones; ratas; conejos; conejillos de indias; perros; gatos; oveja; cabras vacas caballos; primates, como monos, chimpancés y simios y, en particular, humanos. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. Sin embargo, en algunas realizaciones, el mamífero no es un ser humano.
- 35 [0038] Como se usa en este documento, el término "tratamiento" se refiere a una intervención hecha en respuesta a una enfermedad, trastorno o condición fisiológica que se manifiesta por un paciente, particularmente un paciente que sufre de una o más enfermedades de serotonina-relacionada. El objetivo del tratamiento puede incluir, pero no se limita a uno o más de alivio o prevención de síntomas, ralentizar o detener la progresión o empeoramiento de una enfermedad, trastorno o afección y la remisión de la enfermedad, trastorno o afección. El término "tratar" y "tratamiento" incluye, por ejemplo, tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones en las que se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno u otro factor de riesgo. El tratamiento no requiere la curación completa de un trastorno y abarca realizaciones en las que se reducen los síntomas o los factores de riesgo subyacentes. En algunas realizaciones, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya están afectados por una enfermedad o trastorno o condición fisiológica no deseada, así como aquellos en los que la enfermedad o trastorno o condición fisiológica no deseada debe prevenirse. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tratamiento puede mejorar o reducir el nivel de serotonina en el sujeto, para reducir, aliviar o erradicar el síntoma o síntomas de la enfermedad o enfermedades. Como se usa en este documento, el término "prevención" se refiere a cualquier actividad que reduce la carga del individuo que luego expresa esos síntomas de enfermedad relacionados con la serotonina. Esto puede tener lugar a niveles de prevención primaria, secundaria y/o terciaria, en los que: a) la prevención primaria evita el desarrollo de síntomas/trastorno/afección; b) las actividades de prevención secundaria están dirigidas a las primeras etapas del tratamiento de la afección/trastorno/síntoma, aumentando así las oportunidades de intervenciones para prevenir la progresión de la afección/trastorno/síntoma y la aparición de síntomas; y c) la prevención terciaria reduce el impacto negativo de una condición/trastorno/síntoma ya establecido, por ejemplo, restaurando la función y/o reduciendo cualquier condición/trastorno/síntoma o complicaciones relacionadas. El

término "prevenir" no requiere la eliminación del 100% de la posibilidad de un evento. Más bien, denota que la probabilidad de que ocurra el evento se ha reducido en presencia del compuesto o método.

**[0039]** Tal como se utiliza aquí, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para efectuar resultados biológicos y/o clínicos beneficiosos o deseables.

**[0040]** Los vehículos "farmacéuticamente aceptables" son aquellos que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se exponen a los mismos en las dosis y concentraciones empleadas. Los vehículos "farmacéuticamente aceptables" pueden ser, entre otros, excipientes orgánicos o inorgánicos, sólidos o líquidos que sean adecuados para el modo de aplicación seleccionado, tal como aplicación oral o inyección, y administrados en forma de una preparación farmacéutica convencional, tal como sólidos como tabletas, gránulos, polvos, cápsulas y líquidos como solución, emulsión, suspensión y similares. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución tamponada acuosa de pH, como tampón fosfato o tampón citrato. El vehículo fisiológicamente aceptable también puede comprender uno o más de los siguientes: 10 antioxidantes que incluyen ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, inmunoglobulinas; polímeros hidrofilos como polivinilpirrolidona, aminoácidos, carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes como EDTA, alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol, contraiones formadores de sal como sodio y tensioactivos no iónicos como Tween™, polietilenglicol (PEG) y Pluronics™. También se pueden añadir a los vehículos auxiliares, estabilizadores, 15 emulsionantes, lubricantes, aglutinantes, controladores de ajuste de pH, agentes isotónicos y otros aditivos convencionales.

#### Secuencias de diana

**[0041]** Se describe en la presente se dirige a péptidos capaces de dirigir AAV (p. ej., la dirección de la AAV con el propósito de entregar uno o más ácidos nucleicos) a entornos de destino en un sujeto. El entorno diana puede ser, por ejemplo, una célula, una población celular, uno o más tejidos, uno o más órganos o una combinación de los mismos en el sujeto. En algunas realizaciones, el entorno diana es el sistema nervioso central (SNC). En algunas realizaciones, el entorno diana es el sistema nervioso periférico (SNP). En algunas realizaciones, el entorno diana es el corazón. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es capaz de dirigir AAV al SNC del sujeto, o principalmente al mismo (denominado en el presente documento "péptido de direccionamiento del SNC"). En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es capaz de dirigir AAV hacia, o principalmente hacia el SNP del sujeto (referido en el presente documento como "péptido de direccionamiento de SNP"). En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es capaz de dirigir AAV hacia, o principalmente hacia el corazón del sujeto (denominado en el presente documento "péptido de direccionamiento del corazón"). En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es un péptido de direccionamiento del SNC. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es un péptido de direccionamiento de SNP. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es un péptido de direccionamiento al corazón. Por ejemplo, el péptido dirigido al SNC puede, en algunas realizaciones, dirigir AAV para que suministre ácidos nucleicos a neuronas, glía, células endoteliales, astrocitos, células cerebelosas de Purkinje, o una combinación de los mismos, del SNC. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es capaz de dirigir AAV para que entregue ácido nucleico al SNC, el corazón (p. ej., cardiomocitos en el corazón), nervios periféricos, o una combinación de los mismos, en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un adulto, por ejemplo, un sujeto que tiene tres años o más.

**[0042]** El péptido de direccionamiento (p. ej., el péptido de direccionamiento de CNS, el péptido de direccionamiento de SNP, y el péptido de direccionamiento del corazón) puede variar en longitud. Por ejemplo, el péptido de direccionamiento puede ser, o ser al menos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, quince, dieciocho, veinte, veinticinco, treinta o un rango entre dos de estos valores, aminoácidos de longitud. En algunos casos, el péptido de direccionamiento tiene, o tiene aproximadamente, siete aminoácidos de longitud. En algunos casos, el péptido de direccionamiento tiene, o tiene aproximadamente, once aminoácidos de longitud. En algunos casos, el péptido de direccionamiento tiene, o tiene aproximadamente, una longitud de siete a once aminoácidos.

**[0043]** En algunos casos, el péptido de direccionamiento comprende o consiste en una secuencia de 11 aminoácidos contiguos de  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ , en donde

$X_1$  es D, A, E, Q, N, G o S;

$X_2$  es G, N, S, T, Q o V;

$X_3$  es T, S o N;

$X_4$  es L o V;

$X_5$  es A, S, Q, P, o T;

$X_6$  es V, T, Q, N, L o M;

$X_7$  es P;

$X_8$  es F, Y, V, L, C, o S;

$X_9$  es K, R o S; y

cada uno de  $X_{10}$  y  $X_{11}$  es independientemente cualquier aminoácido.

**[0044]** En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento no es, o no comprende, la secuencia de aminoácidos AQTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). En algunos casos del péptido de direccionamiento,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  pueden ser

independientemente cualquier aminoácido, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos estándar. Como se usa aquí, los aminoácidos estándar incluyen alanina (abreviada como "Ala" o "A"), arginina (abreviada como "Arg" o "R"), asparagina (abreviada como "Asn" o "N"), ácido aspártico (abreviado como "Asp" o "D"), cisteína (abreviada como "Cys" o "C"), ácido glutámico (abreviado como "Glu" o "E"), glutamina (abreviado como "Gln" o "Q"), Glicina (abreviada como "Gly" o "G"), histidina (abreviada como "His" o "H"), isoleucina (abreviada como "Ile" o "I"), leucina (abreviada como "Leu" o "L"), Lisina (abreviada como "Lys" o "K"), Metionina (abreviada como "Met" o "M"), Fenilalanina (abreviada como "Phe" o "F"), Prolina (abreviada como "Pro" o "P"), serina (abreviada como "Ser" o "S"), treonina (abreviada como "Thr" o "T"), triptófano ("abreviado como "Trp" o "W"), tirosina (abreviada como "Tyr" o "Y"), Valina (abreviada como "Val" o "V"). En algunas realizaciones,  $X_{10}$  es A o N. En algunas realizaciones,  $X_{11}$  es Q o P.  $X_{10}$  y  $X_{11}$  pueden ser el mismo o diferente aminoácido.

5 En algunas realizaciones,  $X_1$  es D. En algunas realizaciones,  $X_2$  es G. En algunas realizaciones,  $X_3$  es T. En algunas realizaciones,  $X_4$  es L. En algunas realizaciones,  $X_6$  es V o T. En algunas realizaciones,  $X_8$  es F. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 80). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3$  es DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2$  es AQ y los aminoácidos  $X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  son VPFKAQ (SEQ ID NO: 81). En algunas realizaciones,  $X_3$  es T y  $X_4$  es L. En algunas realizaciones,  $X_8$  es A. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2$  es AQ, la secuencia de aminoácidos  $X_3X_4$  es TL, y la secuencia de aminoácidos  $X_8X_9X_{10}X_{11}$  es FKAQ (SEQ ID NO: 82). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_5X_6X_7$  es AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP o TTP. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  es AQTLAV (SEQ ID NO: 83) y la secuencia de aminoácidos  $X_{10}X_{11}$  es AQ. En algunas realizaciones, los aminoácidos  $X_7X_8X_9$  son PFK. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$  es AQTLAVPF (SEQ ID NO: 84). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_9X_{10}X_{11}$  es KAQ, KAP o SNP. En algunos casos, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es DGTLATPFKXX (X puede ser cualquier aminoácido, SEQ ID NO: 68). En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es GGTLATPFKAQ (SEQ ID NO: 10). Varias combinaciones de las realizaciones descritas en este documento están incluidas en el alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, cuando  $X_{10}$  es A,  $X_{11}$  puede ser Q o P; y cuando  $X_1$  es D,  $X_2$  puede ser uno cualquiera de G, N, S, T, y V. Como otro ejemplo, cuando  $X_3$  es T y  $X_4$  es L,  $X_5$  puede ser A.

10 En algunas realizaciones,  $X_1$  es D. En algunas realizaciones,  $X_2$  es G. En algunas realizaciones,  $X_3$  es T. En algunas realizaciones,  $X_4$  es L. En algunas realizaciones,  $X_6$  es V o T. En algunas realizaciones,  $X_8$  es F. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3$  es DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART.

15 En algunas realizaciones,  $X_1X_2X_3$  es AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART.

20 En algunas realizaciones,  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$  es AQTLAVPF (SEQ ID NO: 84). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_9X_{10}X_{11}$  es KAQ, KAP o SNP. En algunos casos, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es DGTLATPFKXX (X puede ser cualquier aminoácido, SEQ ID NO: 68). En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es GGTLATPFKAQ (SEQ ID NO: 10). Varias combinaciones de las realizaciones descritas en este documento están incluidas en el alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, cuando  $X_{10}$  es A,  $X_{11}$  puede ser Q o P; y cuando  $X_1$  es D,  $X_2$  puede ser uno cualquiera de G, N, S, T, y V. Como otro ejemplo, cuando  $X_3$  es T y  $X_4$  es L,  $X_5$  puede ser A.

25 En algunas realizaciones,  $X_1X_2X_3$  es AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART.

**[0045]** En algunas las realizaciones,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  son L, A, V, P, F, K, A y Q, respectivamente; y  $X_3$  es T, S o N. En algunas realizaciones, es ventajoso que  $X_3$  sea T. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3$  es AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART.

**[0046]** En algunas realizaciones,  $X_1$  es A y  $X_2$  es Q;  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  son V, P, F, K, A, Q, respectivamente; y  $X_3$  es T y  $X_4$  es L. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_3X_4X_5$  es TLA.

**[0047]** En algunas realizaciones,  $X_1$  es A,  $X_2$  es Q,  $X_3$  es T,  $X_4$  es L,  $X_8$  es F,  $X_9$  es K,  $X_{10}$  es A, y  $X_{11}$  es Q, y la secuencia de aminoácidos  $X_5X_6X_7$  es AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP o TTP.

**[0048]** En algunas realizaciones,  $X_1$  es A,  $X_2$  es Q,  $X_3$  es T,  $X_4$  es L,  $X_5$  es A,  $X_6$  es V,  $X_7$  es P, y  $X_8$  es F, y la secuencia de aminoácidos  $X_9X_{10}X_{11}$  es KAQ, KAP o SNP.

**[0049]** Un péptido de direccionamiento puede comprender también, o consiste en, al menos 4 aminoácidos contiguos de uno cualquiera de los péptidos de direccionamiento descritos en este documento, por ejemplo, el péptido de direccionamiento de la SEQ ID NOs: 1-44, 48-53 y 65-68. En algunos casos, el péptido de direccionamiento comprende, o consiste en, 4, 5 o 6 de aminoácidos contiguos de una de las SEQ ID NO: 37-44 y 65-68. En algunos casos, el péptido de direccionamiento comprende, o consiste en, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de aminoácidos contiguos de una de las SEQ ID NO: 1-36.

**[0050]** El péptido de direccionamiento puede comprender también, o consiste en, al menos 4 aminoácidos contiguos de la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). En algunos casos, el péptido de direccionamiento comprende, o consiste en, 4, 5 o 6 de aminoácidos contiguos de la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). Por ejemplo, el péptido de direccionamiento puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada de QAVR (SEQ ID NO: 85), AVRT (SEQ ID NO: 86), VRTS (SEQ ID NO: 87), RTSL (SEQ ID NO: 88), QAVRT (SEQ ID NO: 89), AVRTS (SEQ ID NO: 90), VRTSL (SEQ ID NO: 91), QAVRTS (SEQ ID NO: 92) y AVRTSL (SEQ ID NO: 93). En algunos casos, el péptido de direccionamiento también puede comprender, o consistir en, una secuencia de aminoácidos que tiene uno o dos desajustes con SEQ ID NO: 37. Por ejemplo, el péptido de direccionamiento puede comprender, o consistir en, la secuencia de aminoácidos de QAB<sub>3</sub>B<sub>4</sub> TSL, donde B<sub>3</sub> y B<sub>4</sub> pueden ser independientemente cualquiera de los aminoácidos estándar. En algunos casos, B<sub>3</sub> no es V, B<sub>4</sub> no es R o ambos. Como otro ejemplo, el péptido de direccionamiento puede comprender, o consistir en, la secuencia de aminoácidos de QAVRB<sub>5</sub>SL, en donde B<sub>5</sub> puede ser cualquiera de los aminoácidos estándar. En algunos casos, B<sub>5</sub> no es T.

**[0051]** El péptido de direccionamiento descrito en este documento puede ser un péptido independiente, o pueden conjugarse con o parte de una nanopartícula, una segunda molécula, una proteína de la cápside viral, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento se inserta entre los aminoácidos 588 y 589 de la secuencia de la cápside de AAV9 (SEQ ID NO: 45).

60  
65

5 [0052] En algunos casos, el péptido de direccionamiento comprende o consta de cuatro o más aminoácidos contiguos de una de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53 y 65-68. En algunos casos, el péptido de direccionamiento del SNC comprende o consta de 4, 5 o 6 aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53 y 65-68. En algunos casos, se pueden alterar 2 o menos aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53 y 65-68. En algunos casos, la alteración es una alteración conservadora (dentro de cualquiera de las secuencias de direccionamiento proporcionadas en este documento).  
10 En algún caso, la alteración es una delección o inserción de uno o dos aminoácidos (dentro de cualquiera de las secuencias de dirección proporcionadas en este documento). En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento puede tener al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o una identidad de secuencia superior a una de las secuencias de dirección proporcionadas en este documento. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento puede ser diferente de una de las secuencias de dirección descritas en este documento en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más aminoácidos.

15 [0053] En algunos casos, el péptido de direccionamiento comprende, consiste, o consiste esencialmente en una cualquiera o más de las secuencias anteriores. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento se inserta en un péptido más largo, como se describe en el presente documento. La **Tabla 1** proporciona ejemplos no limitantes de péptidos dirigidos.

20 **Tabla 1.** Ejemplos ejemplares de péptidos de direccionamiento descritos en el presente documento (X puede ser cualquiera de los aminoácidos estándar)

<b>Péptidos dirigidos</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
AQTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 1
AQSVKPKFLAQ	SEQ ID NO: 2
DGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 4
ESTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 5
GGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 6
AQTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 7
ATTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 8
DGTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 9
GGTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 10
SGSLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 11
AQTLAQPFKAQ	SEQ ID NO: 12
AQTLQQPFKAQ	SEQ ID NO: 13
AQTLSNPFKAQ	SEQ ID NO: 14
AQTLAVPFSNP	SEQ ID NO: 15
QGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 16
NQTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 17
EGSLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 18
SGNLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 19
EGTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 20
DSTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 21
AVTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 22
AQTLSTPFKAQ	SEQ ID NO: 23
AQTLPPQPFKAQ	SEQ ID NO: 24
AQTLSQPFKAQ	SEQ ID NO: 25
AQTLQLPFKAQ	SEQ ID NO: 26
AQTLTMPFKAQ	SEQ ID NO: 27
AQTLTTPFKAQ	SEQ ID NO: 28
AQYTLSQGWQAQ	SEQ ID NO: 29
AQMNNATKNVAQ	SEQ ID NO: 30
AQVSGGHHSAQ	SEQ ID NO: 31
AQTLPPQPFKAQ	SEQ ID NO: 32
AQTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 33
AQTLTMPFKAQ	SEQ ID NO: 34
AQTLTAPFKAQ	SEQ ID NO: 35
AQTLSKPFKAQ	SEQ ID NO: 36
QAVRTSL	SEQ ID NO: 37
YTLSQGW	SEQ ID NO: 38
LAKERLS	SEQ ID NO: 39
TLAVPFK	SEQ ID NO: 40
SVSKPFL	SEQ ID NO: 41

(Continuación)

<b>Péptidos dirigidos</b>	<b>SEQ ID NO.</b>
FTLTPPK	SEQ ID NO: 42
MNSTKNV	SEQ ID NO: 43
VSGGHHS	SEQ ID NO: 44
SAQTLAVPFKAQAAQ	SEQ ID NO: 48
SXXXLAVPFKAQAAQ	SEQ ID NO: 49
SAQXXXVPFKAAQAAQ	SEQ ID NO: 50
SAQTLXXXFKAAQAAQ	SEQ ID NO: 51
SAQTLAVXXXAAQAAQ	SEQ ID NO: 52
SAQTLAVPFXXXAQ	SEQ ID NO: 53

15

**[0054]** También se describen en el presente documento ácidos nucleicos que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican uno o más de los péptidos de direccionamiento descritos aquí.

20

**[0055]** En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es parte de un AAV, por ejemplo, parte de una proteína de cápside de AAV (SEQ ID NO: 45). En el presente documento se proporcionan proteínas de la cápside de AAV que comprenden uno o más de los péptidos de direccionamiento descritos en el presente documento. Por ejemplo, la proteína de la cápside de AAV puede comprender una porción de péptido dirigida que comprende al menos 4 aminoácidos contiguos de la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). En algunos casos, la proteína de la cápside de AAV comprende una porción de péptido de direccionamiento que comprende, o consta de, 4, 5 o 6 de aminoácidos contiguos de la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37).

25

**[0056]** También se describe en el presente documento son proteínas de la cápside de AAV que comprenden una parte de péptido de direccionamiento que comprende una secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ , en donde

30

$X_1$  es D, A, E, Q, N, G o S;

$X_2$  es G, N, S, T, Q o V;

$X_3$  es T, S o N;

$X_4$  es L o V;

35

$X_5$  es A, S, Q, P, o T;

$X_6$  es V, T, Q, N, L o M;

$X_7$  es P;

$X_8$  es F, Y, V, L, C, o S;

40

$X_9$  es K, R o S; y

cada uno de  $X_{10}$  y  $X_{11}$  es independientemente cualquier aminoácido.

**[0057]** En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento no es, o no comprende, la secuencia de aminoácidos AQTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la proteína de la cápside de AAV no comprende la secuencia de aminoácidos AQTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). Como se describe en el presente documento,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  pueden ser independientemente cualquier aminoácido, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos estándar. En algunas realizaciones,  $X_{10}$  es A o N. En algunas realizaciones,  $X_{11}$  es Q o P. En algunas realizaciones,  $X_1$  es D. En algunas realizaciones,  $X_2$  es G. En algunas realizaciones,  $X_3$  es T. En algunas realizaciones,  $X_4$  es L. En algunas realizaciones,  $X_6$  es V o T. En algunas realizaciones,  $X_8$  es F. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 80). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3$  es DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART. En algunas realizaciones,  $X_1$  es A,  $X_2$  es Q y la secuencia de aminoácidos  $X_6X_7X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es VPFKAAQ (SEQ ID NO: 81). En algunas realizaciones,  $X_3$  es T y  $X_4$  es L. En algunas realizaciones,  $X_5$  es A. En algunas realizaciones,  $X_1$  es A,  $X_2$  es Q,  $X_3$  es T,  $X_4$  es L y la secuencia de aminoácidos  $X_8X_9X_{10}X_{11}$  es FKAQ (SEQ ID NO: 82). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_5X_6X_7$  es AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP o TTP. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  es AQTLAV (SEQ ID NO: 83),  $X_{10}$  es A y  $X_{11}$  es Q. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_7X_8X_9$  es PFK. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$  es AQTLAVPF (SEQ ID NO: 84). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_9X_{10}X_{11}$  es KAQ, KAP o SNP. En algunos casos, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es DGTLATPFKXX ( $X$  puede ser cualquier aminoácido, SEQ ID NO: 68). En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es GGTLATPFKAQ (SEQ ID NO: 10). Varias combinaciones de las realizaciones descritas en este documento están incluidas en el alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, cuando  $X_{10}$  es A,  $X_{11}$  puede ser Q o P; y cuando  $X_1$  es D,  $X_2$  puede ser cualquiera de G, N, S, T, y V. Como otro ejemplo, cuando  $X_3$  es T y  $X_4$  es L,  $X_8$  puede haber A.

65

**[0058]** En algunas realizaciones,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  son L, A, V, P, F, K, A y Q, respectivamente; y  $X_3$  es T, S o N. En algunas realizaciones, es ventajoso que  $X_3$  sea T. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3$  es AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART.

- [0059]** En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es A y X<sub>2</sub> es Q; X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub>, X<sub>8</sub>, X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub> y X<sub>11</sub> son V, P, F, K, A, Q, respectivamente, y X<sub>3</sub> es T y X<sub>4</sub> es L. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub> es TLA.
- 5      **[0060]** En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es Q, X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es L, X<sub>8</sub> es F, X<sub>9</sub> es K, X<sub>10</sub> es A, y X<sub>11</sub> es Q, y la secuencia de aminoácidos X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub> es AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP o TPP.
- 10     **[0061]** En algunas realizaciones, X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es Q, X<sub>3</sub> es T, X<sub>4</sub> es L, X<sub>5</sub> es A, X<sub>6</sub> es V, X<sub>7</sub> es P, y X<sub>8</sub> es F, y la secuencia de aminoácidos X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub> es KAQ, KAP o SNP.
- 15     **[0062]** La porción de péptido de direccionamiento de la proteína de la cápside puede comprender, o consistir en, la secuencia de cualquiera de los péptidos de direccionamiento descritos en este documento, o al menos 4 aminoácidos contiguos de cualquiera de los péptidos de direccionamiento descritos en este documento. En algunos casos, la proteína de la cápside de AAV comprende una porción de péptido de direccionamiento que comprende, o consta de, al menos 4 aminoácidos contiguos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53 y 65-68. En algunos casos, la proteína de la cápside de AAV comprende una porción de péptido de direccionamiento que comprende, o consta de, 4, 5 o 6 de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 37-44 y 65-68. En algunos casos, la proteína de la cápside de AAV comprende una porción de péptido de direccionamiento que comprende, o consta de, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1-36.
- 20     **[0063]** En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es parte de una secuencia de cápside AAV9 de SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento puede estar enlazado para cualquier molécula que debe dirigirse según se deseé. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento se puede unir o conjugar, sin limitación, a una proteína recombinante, un anticuerpo, una célula, un diagnóstico, un terapéutico, una nanomolécula o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside comprende, o consiste en, la secuencia de SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47.
- 25     **[0064]** En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento se puede insertar en cualquier sección deseada de una proteína. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento se puede insertar en una proteína de la cápside. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento se inserta en una superficie de la proteína deseada. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento se inserta en la secuencia primaria de la proteína. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento está unido a la proteína. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento está unido covalentemente a la proteína. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento se inserta en un bucle no estructurado de la proteína deseada. En algunas realizaciones, el bucle no estructurado puede identificarse mediante un modelo estructural de la proteína.
- 30     **[0065]** Los ácidos nucleicos también descritos en este documento comprenden secuencias de nucleótidos que codifican una o más de las proteínas de cápside AAV descritas en este documento.
- 35     **40 Virus adenoasociados (AAV) y AAV recombinantes**
- 40     **[0066]** El virus adenoasociado (AAV) es un parvovirus deficiente en la replicación, siendo el genoma de ADN monocatenario de aproximadamente 4,7 kb de longitud que incluye 145 nucleótidos de repetición terminal invertida (RTI). Los RTI desempeñan un papel en la integración del ADN de AAV en el genoma de la célula huésped. Cuando AAV infecta una célula hospedadora, el genoma viral se integra en el cromosoma del hospedador dando como resultado una infección latente de la célula. En un sistema natural, un virus auxiliar (p. ej., adenovirus o virus del herpes) proporciona genes que permiten la producción del virus AAV en la célula infectada. En el caso del adenovirus, los genes E1A, E1B, E2A, E4 y VA proporcionan funciones auxiliares. Tras la infección con un virus auxiliar, el provirus de AAV se rescata y amplifica, y se producen tanto AAV como adenovirus. En los casos de vectores de AAV recombinantes que no tienen genes Rep y/o Cap, el AAV puede ser no integrador.
- 45     **[0067]** Se proporcionan vectores AAV que comprenden las regiones de codificación de una o más proteínas de interés. El vector AAV puede incluir una repetición terminal invertida (RTI) en 5' de AAV, una RTI de AAV 3', un promotor y un sitio de restricción cadena abajo del promotor para permitir la inserción de un polinucleótido que codifica una o más proteínas de interés, en donde el promotor y el sitio de restricción se localizan corriente abajo del 5' AAV RTI y corriente arriba del 3' AAV RTI. En algunas realizaciones, el vector AAV incluye un elemento regulador postranscripcional corriente abajo del sitio de restricción y corriente arriba del RTI 3' AAV. En algunas realizaciones, los vectores de AAV descritos en este documento pueden usarse como vectores de transferencia de AAV que llevan un transgén que codifica una proteína de interés para producir virus de AAV recombinantes que pueden expresar la proteína de interés en una célula huésped.
- 50     **[0068]** Los genomas de rAAV se proporcionan en el presente documento. El genoma puede comprender, por ejemplo, al menos una repetición terminal invertida configurada para permitir el empaquetamiento en un vector y un gen cap. En algunas realizaciones, puede incluir además una secuencia dentro de un gen rep requerida para la expresión y corte y empalme del gen cap. En algunas realizaciones, el genoma puede incluir además una secuencia capaz de expresar VP3. En algunas realizaciones, la única proteína que se expresa es VP3 (la más pequeña de las proteínas estructurales de la cápside que constituye la mayor parte de la cápside ensamblada; la cápside ensamblada está compuesta por 60 unidades

de proteínas VP, 50 de las cuales son VP3). En algunas realizaciones, la expresión de VP3 sola es adecuada para permitir que el método de cribado sea adecuado.

**[0069]** La generación del vector viral se puede lograr usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada bien conocida en la técnica, incluyendo, sin limitación, las técnicas estándar de digestión, ligación, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN con endonucleasas de restricción, por ejemplo como descrito en Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)).

**[0070]** El vector viral puede incorporar secuencias del genoma de cualquier organismo conocido. Las secuencias se pueden incorporar en su forma nativa o se pueden modificar de cualquier forma para obtener una actividad deseada. Por ejemplo, las secuencias pueden comprender inserciones, delecciones o sustituciones.

**[0071]** En algunas realizaciones, los vectores virales pueden incluir secuencias adicionales que hacen que los vectores adecuados para la replicación e integración en eucariotas. En otras realizaciones, los vectores virales descritos en este documento pueden incluir un elemento lanzadera que hace que los vectores sean adecuados para la replicación e integración tanto en procariotas como en eucariotas. En algunas realizaciones, los vectores virales pueden incluir secuencias de iniciación de la transcripción y traducción adicionales, tales como promotores y potenciadores; y terminadores de transcripción y traducción adicionales, tales como señales de poliadenilación. En la publicación de patente estadounidense 2012/0232133 se han descrito en detalle varios elementos reguladores que pueden incluirse en un vector AAV.

**[0072]** En el presente documento se describen vectores de AAV que comprenden péptidos de direccionamiento capaces de dirigir los AAV a entornos objetivo (p. ej., SNC, SNP y corazón) en un sujeto. En algunas realizaciones, el péptido de direccionamiento es parte de la proteína de la cápside del vector AAV. El vector AAV puede, en algunos casos, comprender una proteína que comprende al menos 4 aminoácidos contiguos de la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). En algunos casos, la cápside del AAV puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 4 aminoácidos contiguos de la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es parte de una proteína de la cápside del vector AAV. En algunos casos, la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) se inserta entre AA588-589 de una secuencia AAV del vector (SEQ ID NO: 45). En algunos casos, la secuencia QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) se inserta entre AA586-592 de una secuencia de AAV del vector (SEQ ID NO: 45). En algunos casos, la QAVRTSL secuencia (SEQ ID NO: 37) comprende además al menos dos de los aminoácidos 587, 588, 589, y 590 de la SEQ ID NO: 45.

**[0073]** En algunos casos, el vector de AAV, por ejemplo la proteína de la cápside del vector AAV, comprende una secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ , en donde

$X_1$  es D, A, E, Q, N, G o S;

$X_2$  es G, N, S, T, Q o V;

$X_3$  es T, S o N;

$X_4$  es L o V;

$X_5$  es A, S, Q, P, o T;

$X_6$  es V, T, Q, N, L o M;

$X_7$  es P;

$X_8$  es F, Y, V, L, C, o S;

$X_9$  es K, R o S; y

cada uno de  $X_{10}$  y  $X_{11}$  es independientemente cualquier aminoácido.

**[0074]** En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos no es, o no comprende, la secuencia de aminoácidos AQTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la proteína de la cápside no comprende la secuencia de aminoácidos AQTAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1). Como se describe en el presente documento,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  pueden ser independientemente cualquier aminoácido, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos estándar. En algunas realizaciones,  $X_{10}$  es A o N. En algunas realizaciones,  $X_{11}$  es Q o P. En algunas realizaciones,  $X_1$  es D. En algunas realizaciones,  $X_2$  es G. En algunas realizaciones,  $X_3$  es T. En algunas realizaciones,  $X_4$  es L. En algunas realizaciones,  $X_6$  es V o T. En algunas realizaciones,  $X_8$  es F. En algunas realizaciones, los aminoácidos  $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  son LAVPFKAQ (SEQ ID NO: 80). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3$  es DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART. En algunas realizaciones,  $X_1$  es A,  $X_2$  es Q y la secuencia de aminoácidos  $X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es VPFKAQ. En algunas realizaciones,  $X_3$  es T y  $X_4$  es L. En algunas realizaciones,  $X_5$  es A. En algunas realizaciones,  $X_1$  es A,  $X_2$  es Q,  $X_3$  es T,  $X_4$  es L y la secuencia de aminoácidos  $X_8X_9X_{10}X_{11}$  es FKAQ. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_5X_6X_7$  es AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP o TPP. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$  es AQTAV (SEQ ID NO: 83),  $X_{10}$  es A y  $X_{11}$  es Q. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_7X_8X_9$  es PFK. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$  es AQTAVPF (SEQ ID NO: 84). En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_9X_{10}X_{11}$  es KAQ, KAP o SNP. En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es DGTLATPFKXX (X puede ser cualquier aminoácido, SEQ ID NO: 68). En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  es GGTLATPFKAQ (SEQ ID NO: 10). Varias combinaciones de las realizaciones descritas en este documento están incluidas en el alcance de la presente

divulgación. Por ejemplo, cuando  $X_{10}$  es A,  $X_{11}$  puede ser Q o P; y cuando  $X_1$  es D,  $X_2$  puede ser uno cualquiera de G, N, S, T, y V. Como otro ejemplo, cuando  $X_3$  es T y  $X_4$  es L,  $X_8$  puede ser A.

**[0075]** En algunas realizaciones,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  son L, A, V, P, F, K, A y Q, respectivamente; y  $X_3$  es T, S o N. En algunas realizaciones, es ventajoso que  $X_3$  sea T. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2X_3$  es AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT o ART.

**[0076]** En algunas realizaciones,  $X_1$  es A y  $X_2$  es Q;  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$  y  $X_{11}$  son V, P, F, K, A, Q, respectivamente; y  $X_3$  es T y  $X_4$  es L. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos  $X_3X_4X_5$  es TLA.

**[0077]** En algunas realizaciones,  $X_1$  es A,  $X_2$  es Q,  $X_3$  es T,  $X_4$  es L,  $X_8$  es F,  $X_9$  es K,  $X_{10}$  es A, y  $X_{11}$  es Q, y la secuencia de aminoácidos  $X_5X_6X_7$  es AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP o TPP.

**[0078]**  $X_1$  es A,  $X_2$  es Q,  $X_3$  es T,  $X_4$  es L,  $X_5$  es A,  $X_6$  es V,  $X_7$  es P, y  $X_8$  es F, y la secuencia de aminoácidos  $X_9X_{10}X_{11}$  es KAQ, KAP o SNP.

**[0079]** En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es parte de una proteína de la cápside del vector AAV. En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos se inserta entre AA586 y 589 de una secuencia de la proteína de la cápside de AAV SEQ ID NO: 45 del vector. En algunas realizaciones, la secuencia de 11 aminoácidos continuos comprende además al menos dos de los aminoácidos 587, 588, 589 o 590 de SEQ ID NO: 45. En algunos casos, la secuencia de 11 aminoácidos contiguos es una de SEQ ID NO: 1-36. En algunos casos, el vector AAV comprende al menos 4 aminoácidos contiguos de una de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53 y 65-68.

**[0080]** Como se describe en el presente documento, los rAAVs se pueden identificar a partir de bibliotecas de cápsides compuestas de variantes realizadas por inserción de 7 aminoácidos (AA) de la secuencia aleatorizada entre AA588 y AA589 de una proteína de cápside de AAV. La proteína de la cápside de AAV puede, en algunas realizaciones, tener varias sustituciones en comparación con la proteína de la cápside de AAV de tipo salvaje, que incluyen, entre otras, sustitución de K449R, sustitución de A587D, sustitución de Q588G, sustitución de A587G, sustitución de Q588G, sustitución de V592T, sustitución de K595S, sustitución de A595N, sustitución de Q597P y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside de AAV tiene una secuencia idéntica a la cápside de AAV9 de tipo salvaje pero con una sustitución K449R. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside AAV9 comprende las sustituciones de aminoácidos A587D y Q588G. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside AAV9 comprende las sustituciones de aminoácidos A587G y Q588G. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside AAV9 comprende la sustitución de aminoácidos V592T. En algunas realizaciones, la proteína de la cápside AAV9 comprende las sustituciones de aminoácidos K595S, A595N y Q597P.

**[0081]** En algunas realizaciones, uno o más péptidos de direccionamiento pueden emplearse en un solo sistema (p. ej., en un solo vector de AAV, una sola proteína de la cápside de AAV, o un solo rAAV). Por ejemplo, se pueden emplear una o más secuencias de direccionamiento y también modificar otros sitios para reducir el reconocimiento de los AAV por los anticuerpos preexistentes presentes en un sujeto, como un ser humano. En algunas realizaciones, el vector de AAV puede incluir una cápside, que influye en el tropismo/direccionamiento, la velocidad de expresión y la posible respuesta inmune. El vector también puede incluir el rAAV, cuyo genoma lleva los aspectos transgénicos/terapéuticos (p. ej., secuencias) junto con secuencias reguladoras. En algunas realizaciones, el vector puede incluir la secuencia de direccionamiento dentro/sobre un sustrato que es o transporta la molécula deseada (molécula terapéutica, molécula de diagnóstico, etc.).

**[0082]** Los péptidos de direccionamiento descritos en este documento, en algunas realizaciones, pueden aumentar la eficacia de transducción de rAAV a un entorno de destino (p. ej., el SNC, el SNP, el corazón, o una combinación de los mismos) en el sujeto en comparación con un AAV que no contiene los péptidos dirigidos. Por ejemplo, la inclusión de uno o más de los péptidos de direccionamiento descritos en este documento en un rAAV puede resultar en un aumento en la eficiencia de transducción en, o al menos, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces, 5,5 veces, 6 veces, 6,5 veces, 7 veces, 7,5 veces, 8 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o un intervalo entre dos de estos valores, en comparación con un VAA que no comprende el péptido de dirección. En algunas realizaciones, el aumento es de al menos 2 veces. En algunas realizaciones, el aumento es un aumento de 40 a 90 veces. En algunas realizaciones, la eficacia de transducción aumenta para la transducción de rAAV al SNC. En algunas realizaciones, la eficacia de la transducción aumenta para la transducción de rAAV al SNP. En algunas realizaciones, la eficacia de la transducción aumenta para la transducción de rAAV al corazón. En algunas realizaciones, la eficacia de transducción aumenta para la transducción de rAAV a cardiomiositos, neuronas sensoriales, ganglios de la raíz dorsal, órganos viscerales o cualquier combinación de los mismos.

**[0083]** En algunas realizaciones, se proporciona una biblioteca de la cápside que comprende genomas de AAV que contienen tanto la secuencia plena rep como cap que han sido modificados con el fin de no impedir la replicación del virus bajo condiciones en las que podría normalmente replicarse (co-infección de una célula de mamífero junto con un virus auxiliar como el adenovirus). Un genoma de tipo pseudo salvaje ("wt") puede ser uno que tiene un gen cap diseñado dentro de un genoma de AAV "wt".

5 [0084] En algunas realizaciones, la biblioteca de la cápside se hace dentro de un genoma de AAV "tipo pseudo-salvaje" que contiene el gen de replicación viral (rep) y gen de la cápside (cap) flanqueado por repeticiones terminales invertidas (RTI). En algunas realizaciones, la biblioteca de cápside no se elabora dentro de un genoma de AAV de "tipo pseudo-salvaje" que contiene el gen de replicación viral (rep) y el gen de la cápside (cap) flanqueado por repeticiones terminales invertidas (RTI).

10 [0085] En algunas realizaciones, el genoma de rAAV contiene el gen cap y sólo aquellas secuencias dentro del gen rep se requiere para la expresión y corte y empalme de los productos de gen cap. En algunas realizaciones, se proporciona una secuencia de reconocimiento de recombinasa del gen de la cápside con repeticiones terminales invertidas que flanquean estas secuencias.

15 [0086] En algunas realizaciones, el sistema podría ser utilizado para desarrollar cápsides que presentan una mayor orientación de específicas células/órganos, seleccionar para cápsides que evaden la inmunidad, seleccionar para genomas que son más en la recombinación homóloga, seleccionar para los elementos del genoma que aumentan la eficiencia de conversión del genoma de AAV monocatenario en un genoma de ADN bicitenario dentro de una célula y/o seleccionar elementos del genoma que aumentan la conversión del genoma AAV a una forma circularizada persistente dentro de la célula.

#### Usos de los vectores AAV y rAAV

20 [0087] Los vectores AAV descritos en este documento pueden ser transducidos de manera efectiva a un entorno de destino (p. ej., el SNC, los SNP, el corazón, cualquier combinación de los mismos, y otro sistema deseado de un sujeto, por ejemplo, para suministrar ácidos nucleicos. En algunos casos, se describe un método para administrar una secuencia de ácido nucleico al sistema nervioso. El método puede incluir proporcionar una proteína que comprenda una o más de las secuencias de dirección proporcionadas en el presente documento. La proteína puede formar parte de una cápside de un AAV. El AAV puede comprender una secuencia de ácido nucleico que se administrará a un sistema nervioso. A continuación, se puede administrar AAV al sujeto.

30 [0088] En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico a ser entregada a un entorno de destino (p. ej., sistema nervioso) comprende una o más secuencias que podrían ser de algún uso o beneficio para el sistema nervioso y/o el tejido local de la administración o tejido circundante o medio ambiente. En algunas realizaciones, puede ser un ácido nucleico que codifica una proteína de interés, que incluye, entre otros, un factor trófico, un factor de crecimiento u otros factores solubles que podrían liberarse de las células transducidas y afectar la supervivencia o función de esa célula y/o células circundantes. En algunas realizaciones, puede ser un ADNc que restaura la función de la proteína en humanos o animales que albergan una mutación o mutaciones genéticas en ese gen. En algunas realizaciones, puede ser un ADNc que codifica una proteína que puede usarse para controlar o alterar la actividad o el estado de una célula. En algunas realizaciones, puede ser un ADNc que codifica una proteína o un ácido nucleico usado para evaluar el estado de una célula. En algunas realizaciones, puede ser un ADNc y/o ARN asociado para realizar ingeniería genómica. En algunas realizaciones, puede ser una secuencia para la edición del genoma mediante recombinación homóloga. En algunas realizaciones, puede ser una secuencia ADN que codifica un ARN terapéutico. En algunas realizaciones, puede ser un shARN o un sistema de suministro de miARN artificial. En algunas realizaciones, puede ser una secuencia de ADN que influya en el corte y empalme de un gen endógeno.

45 [0089] Como se usa en el presente documento, una "proteína de interés" puede ser cualquier proteína, incluyendo proteínas de origen natural y de origen no natural. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica una o más proteínas de interés puede estar presente en uno de los vectores AAV descritos en este documento, en donde el polinucleótido está operativamente unido con un promotor. En algunos casos, el promotor puede impulsar la expresión de la(s) proteína(s) de interés en una célula huésped (p. ej., una neurona humana). En algunas realizaciones, la proteína de interés es un anticuerpo anti-tau, un anticuerpo anti-AB, una isoforma de ApoE.

50 [0090] Los ejemplos de proteína de interés incluyen, pero no se limitan a luciferasas; proteínas fluorescentes (p. ej., GFP); hormonas de crecimiento (GH) y variantes de las mismas; factores de crecimiento de tipo insulina (IGF) y variantes de los mismos; factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF) y variantes de los mismos; eritropoyetina (EPO) y variantes de la misma; insulina, como proinsulina, preproinsulina, insulina, análogos de insulina y similares; anticuerpos y variantes de los mismos, tales como anticuerpos híbridos, anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monoclonales; fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo (fragmentos Fab), fragmentos variables monocatenarios de un anticuerpo (fragmentos scFV); distrofina y variantes de la misma; factores de coagulación y variantes de los mismos; regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y variantes del mismo; e interferones y variantes de los mismos.

60 [0091] En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína terapéutica o variante de la misma. Los ejemplos no limitantes de proteínas terapéuticas incluyen factores sanguíneos, tales como β-globina, hemoglobina, activador del plasminógeno tisular y factores de coagulación; factores estimulantes de colonias (LCR); interleucinas, tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, etc.; factores de crecimiento, como factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, como FGF básico y FGF ácido), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), proteína morfogenética ósea

(BMP), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de diferenciación del crecimiento-9 (GDF-9), factor de crecimiento derivado del hepatoma (HDGF), miostatina (GDF-8), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y similares; receptores solubles, tales como receptores de TNF- $\alpha$  solubles, receptores de VEGF solubles, receptores de interleucina solubles (p. ej., receptores de IL-1 solubles y receptores de IL-1 de tipo II solubles), receptores de células T y/ó solubles, fragmentos de unión a ligando de un receptor soluble y similares; enzimas, tales como  $\alpha$ -glucosidasa, imiglucarasa,  $\beta$ -glucocerebrosidasa y alglucerasa; activadores de enzimas, tales como activador de plasminógeno tisular; quimiocinas, tales como IP-10, monoquina inducida por interferón-gamma (Mig), Groa/IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, PF-4 y similares; agentes angiogénicos, como factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF, p. ej., VEGF121, VEGF165, VEGF-C, VEGF-2), factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento derivado de glioma, angiogenina, angiogenina-2; y similares; agentes anti-angiogénicos, tales como un receptor de VEGF soluble; vacuna proteica; péptidos neuroactivos, como factor de crecimiento nervioso (NGF), bradicinina, colecistoquinina, gastina, secretina, oxitocina, hormona liberadora de gonadotropina, beta-endorfina, encefalina, sustancia P, somatostatina, prolactina, galanina, hormona liberadora de hormona del crecimiento, bombesina, dinorfina, warfarina, neurotensina, motilina, tirotropina, neuropéptido Y, hormona luteinizante, calcitonina, insulina, glucagones, vasopresina, angiotensina II, hormona liberadora de tirotropina, péptido intestinal vasoactivo, un péptido del sueño y similares; agentes trombolíticos; Péptido Natriurético Atrial; relaxina; proteína ácida fibrilar glial; hormona estimulante del folículo (FSH); antitripsina humana alfa-1; factor inhibidor de la leucemia (LIF); factores de crecimiento transformadores (TGF); factores tisulares, hormona luteinizante; factores de activación de macrófagos; factor de necrosis tumoral (TNF); factor quimiotáctico de neutrófilos (NCF); factor de crecimiento nervioso; inhibidores tisulares de metaloproteínasas; péptido intestinal vasoactivo; angiogenina; angiotropina; fibrina; hirudina; antagonistas del receptor de IL-1; y similares. Algunos otros ejemplos no limitantes de proteína de interés incluyen factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); neurotrofinas 3 y 4/5 (NT-3 y 4/5); factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF); descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC); proteínas de coagulación relacionadas con la hemofilia, tales como factor VIII, factor IX, factor X; distrofina o nini-distrofina; lipasa ácida lisosomal; fenilalanina hidroxilasa (PAH); enzimas relacionadas con enfermedades de almacenamiento de glucógeno, como glucosa-6-fosfatasa, maltasa ácida, enzima desramificante de glucógeno, fosforilasa de glucógeno muscular, fosforilasa de glucógeno hepática, fosfofructoquinasa muscular, cinasa de fosforilasa (p. ej., PHKA2), transportador de glucosa (p. ej., GLUT2), aldolasa A,  $\beta$ -enolasa y sintasa de glucógeno; enzimas lisosomales (p. ej., beta-N-acetilhexosaminidasa A); y cualquier variante de los mismos.

**[0092]** En algunas realizaciones, la proteína de interés es un fragmento activo de una proteína, tal como cualquiera de las proteínas anteriormente mencionadas. En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína de fusión que comprende algunas o todas dos o más proteínas. En algunas realizaciones, una proteína de fusión puede comprender la totalidad o una parte de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente.

**[0093]** En algunas realizaciones, el vector viral comprende un polinucleótido que comprende regiones codificantes para dos o más proteínas de interés. Las dos o más proteínas de interés pueden ser iguales o diferentes entre sí. En algunas realizaciones, las dos o más proteínas de interés son polipéptidos relacionados, por ejemplo, cadena(s) ligera(s) y cadena(s) pesada(s) del mismo anticuerpo.

**[0094]** En algunas realizaciones, la proteína de interés es una proteína de múltiples subunidades. Por ejemplo, la proteína de interés puede comprender dos o más subunidades, o dos o más cadenas polipeptídicas independientes. En algunas realizaciones, la proteína de interés puede ser un anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos de varios isotipos (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM); anticuerpos monoclonales producidos por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, incluyendo un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal; anticuerpos humanizados; anticuerpos químicos; anticuerpos monocatenarios; fragmentos de anticuerpos tales como Fv, F(ab')2, Fab', Fab, Fabc, scFv y similares; siempre que el anticuerpo sea capaz de unirse al antígeno. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, la proteína de interés no es una inmunoadhesina.

**[0095]** En algunas realizaciones, las moléculas de direccionamiento resultantes se pueden emplear en los métodos y/o terapias relacionadas a aplicaciones de transferencia de genes *in vivo* a las poblaciones de células de larga vida. En algunas realizaciones, estos pueden aplicarse a cualquier terapia génica basada en rAAV, incluyendo, por ejemplo: atrofia muscular espinal (AMS), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, ataxia de Friedreich, enfermedad de Pompe, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Battens, trastornos por almacenamiento lisosómico, glioblastoma multiforme, síndrome de Rett, amaurosis congénita de Leber, dolor crónico, accidente cerebrovascular, lesión de la médula espinal, lesión cerebral traumática y trastornos por almacenamiento lisosómico. Además, los rAAV también se pueden emplear para la entrega *in vivo* de transgenes para estudios científicos no terapéuticos como optogenética, sobreexpresión de genes, eliminación de genes con shARN o miARN, modulación de miARN endógenos usando esponjas o señuelos de miARN, entrega de recombinasa para eliminación de genes condicional, expresión condicional (dependiente de recombinasa) o edición de genes con CRISPR, TALEN y nucleasas con dedos de zinc.

**[0096]** En el presente documento se describen métodos para tratar y/o prevenir la enfermedad de Huntington usando los métodos y composiciones descritos en el presente documento. El método para tratar y/o prevenir la enfermedad de

- Huntington puede incluir identificar al (a los) sujeto(s), proporcionar un vector para el suministro de un polinucleótido al sistema nervioso del sujeto como se proporciona en el presente documento, administrar el vector en una dosis eficaz al sujeto tratando de ese modo y/o prevenir la enfermedad de Huntington en el sujeto. En algunos casos, los métodos para tratar a un sujeto con enfermedad de Huntington implican composiciones en las que el vector administra la composición de polinucleótidos que comprende una proteína de dedo de zinc (ZFP) diseñada para reprimir la transcripción del gen de Huntingtin (HTT). En algunos casos, la ZFP reprime selectivamente la transcripción del alelo del gen HTT responsable de causar la enfermedad de Huntington en el sujeto uniéndose a la región de repetición CAG del gen HTT de una manera dependiente de la longitud de la repetición CAG. En algunos casos, el ZNFTR reprime selectivamente la transcripción de ambos alelos del gen HTT.
- [0097]** En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administra al sujeto comprende un ARN de horquilla corta (ARNhc) o microARN (miARN) que reduce expresión Huntingtin mediante la inducción de la degradación selectiva de, o inhibición de la traducción a partir de las moléculas de ARN transrito a partir la enfermedad que causa el alelo HTT al unirse a la repetición CAG. En algunos casos, un método para tratar pacientes con enfermedad de Huntington comprende incorporar un casete de expresión de microARN específico de Huntingtin dentro de un genoma de rAVV. A continuación, esto podría empaquetarse en una de las variantes de secuencia descritas para su administración a través de la vasculatura.
- [0098]** En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administra al sujeto comprende un ARN de horquilla corta (ARNhc) o microARN (miARN) que reduce la expresión de Huntingtin mediante la inducción de la degradación de, o inhibir la traducción de moléculas de ARN transrito a partir de uno o ambos alelos del gen HTT. En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administrará al sujeto comprende un ARN en horquilla corta (ARNhc) o microARN (miARN) que reduce la expresión de Huntingtin induciendo la degradación selectiva de, o inhibiendo la traducción de, moléculas de ARN transcritas de la enfermedad que causa el alelo HTT a través del reconocimiento selectivo de uno o más polimorfismos de nucleótidos presentes dentro del alelo causante de la enfermedad. Los polimorfismos de nucleótidos pueden ser usados por un experto en la técnica para diferenciar entre el alelo normal y el que causa la enfermedad.
- [0099]** En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administra al sujeto comprende un polinucleótido que codifica un ARN o proteína que altera el corte y empalme o la producción del ARN HTT. En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administrará al sujeto comprende un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos y/o ARN para la edición del genoma usando una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN), sistema de nucleasa de dedos de zinc o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas - gen cas9 (CRISPR/Cap9) diseñado por un experto en la técnica para inducir una muesca en el ADN o una ruptura del ADN de doble hebra dentro o adyacente al gen HTT para provocar una alteración en la secuencia del gen HTT. En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administrará al sujeto comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que se une a un polipéptido del gen HTT, altera la conformación de un polipéptido del gen HTT o altera el ensamblaje de un polipéptido del gen HTT en agregados o altera la vida media de un polipéptido del gen HTT. En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administrará al sujeto comprende un polinucleótido que codifica un ARN o polipéptido que causa o previene una modificación postranscripcional de un polipéptido del gen HTT. En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administrará al sujeto comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de una proteína chaperona conocida por los expertos en la técnica por influir en la conformación y/o estabilidad de un polipéptido del gen HTT.
- [0100]** En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administra al sujeto comprende elementos reguladores conocidos para un experto en la técnica para influir en la expresión del ARN y/o productos de la proteína codificada por el polinucleótido dentro de las células deseadas del sujeto.
- [0101]** En algunas realizaciones, el elemento terapéutico que se administra al sujeto comprende un elemento terapéutico aplicable para cualquier enfermedad o trastorno de elección. En algunas realizaciones, esto puede incluir composiciones para tratar y/o prevenir la enfermedad de Alzheimer usando los métodos y composiciones descritos en este documento, por ejemplo, ApoE2 o ApoE3 para la enfermedad de Alzheimer; SMN para el tratamiento de la AME; administración de frataxina para el tratamiento de la ataxia de Friedreich; y/o shARN o miARN para el tratamiento de ELA.
- [0102]** En algunas realizaciones las variantes de la presente memoria se pueden utilizar como un medio eficaz de transferencia de genes al músculo cardíaco. Hacerlo puede ser útil para estudiar y tratar muchas enfermedades y lesiones diferentes, incluida la ataxia de Friedreich, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, hipertrofia cardíaca, dolor crónico y lesión de nervios periféricos. En algunas realizaciones, las variantes de la presente pueden usarse para transducir nervios periféricos cuando se administran a través de la vasculatura.
- [0103]** En algunas realizaciones, el elemento terapéutico para la entrega es una proteína (codifica una proteína) o una estrategia basada en ARN para reducir la agregación de sinucleína para el tratamiento de Parkinson. Por ejemplo, administrar un polinucleótido que codifica una variante de sinucleína que es resistente a la agregación y, por tanto, interrumpe la agregación de la sinucleína endógena.
- [0104]** En algunas realizaciones, un transgén que codifica un factor trófico para el tratamiento de AD, PD, ELA, AMS, o

HD puede ser el elemento terapéutico en cuestión. En algunas realizaciones, se puede emplear un factor trófico y puede incluir, por ejemplo, BDNF, GDNF, NGF, LIF y/o CNTF.

5 [0105] Las dosis de un vector viral pueden depender principalmente de factores tales como la afección que se está tratando, la edad, el peso y la salud del paciente y, por lo tanto, pueden variar entre los pacientes. Por ejemplo, una dosis humana terapéuticamente eficaz del vector viral está generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 100 ml de solución que contiene concentraciones de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{16}$  genomas del vector viral. Una dosis humana preferida puede ser de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^{16}$  genomas de AAV. La dosis se ajustará para equilibrar el beneficio terapéutico frente a cualquier efecto secundario y dichas dosis pueden variar dependiendo de la aplicación terapéutica para la que se emplee el vector recombinante. Los niveles de expresión del transgén pueden monitorizarse para determinar la frecuencia de dosificación resultante del vector.

10 15 [0106] En algunas realizaciones, el vector puede comprender también elementos de control reguladores conocidos para un experto en la técnica de influir en la expresión del ARN y/o productos de la proteína codificada por el polinucleótido dentro de las células deseadas de la materia.

20 25 [0107] En algunas realizaciones, funcionalmente, la expresión del polinucleótido es al menos en parte controlable por los elementos reguladores operativamente enlazados de manera que el elemento o elementos modulan la transcripción del polinucleótido, el transporte, el procesamiento y la estabilidad del ARN codificado por el polinucleótido y, según corresponda, traducción de la transcripción. Un ejemplo específico de un elemento de control de la expresión es un promotor, que normalmente se localiza en 5' de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de un elemento de control de expresión es un potenciador, que puede estar ubicado en 5' o 3' de la secuencia transcrita, o dentro de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de elemento regulador es una secuencia de reconocimiento de un microARN. Otro ejemplo de un elemento regulador es un intrón y las secuencias donadoras de empalme y acceptor de empalme que regulan el empalme de dicho intrón. Otro ejemplo de un elemento regulador es una señal de terminación de la transcripción y/o secuencias de poliadenilación.

30 35 [0108] Elementos de control de expresión y promotores incluyen aquellos activos en un determinado tejido o tipo de célula, se hace referencia en el presente documento como "elementos/promotores de control de la expresión específica a tejido". Los elementos de control de la expresión específicos de tejido son típicamente activos en células o tejidos específicos (p. ej., en el hígado, cerebro, sistema nervioso central, médula espinal, ojo, retina o pulmón). Los elementos de control de la expresión son típicamente activos en estas células, tejidos u órganos porque son reconocidos por proteínas activadoras de la transcripción u otros reguladores de la transcripción, que son exclusivos de un tipo específico de célula, tejido u órgano.

40 45 [0109] Elementos de control de la expresión también incluyen promotores ubicuos o promiscuos/potenciadores que son capaces de dirigir la expresión de un polinucleótido en muchos tipos celulares diferentes. Dichos elementos incluyen, pero no se limitan a las secuencias promotoras/potenciadoras tempranas inmediatas del citomegalovirus (CMV), las secuencias promotoras/potenciadoras del virus del sarcoma de Rous (RSV) y los otros promotores/potenciadores virales activos en una variedad de tipos de células de mamíferos; secuencias promotoras/potenciadoras de genes de mamíferos expresados de manera ubicua o promiscua que incluyen, pero no se limitan a beta actina, ubiquitina o EF1 alfa; o elementos sintéticos que no están presentes en la naturaleza.

50 55 [0110] Elementos de control de la expresión también pueden conferir la expresión en una manera que es regulable, es decir, una señal o estímulos aumenta o disminuye la expresión del polinucleótido unido operativamente. Un elemento regulable que aumenta la expresión del polinucleótido unido operativamente en respuesta a una señal o estímulos también se denomina "elemento inducible" (es decir, es inducido por una señal). Los ejemplos particulares incluyen, pero no se limitan a un promotor inducible por hormonas (p. ej., esteroides). Un elemento regulable que disminuye la expresión del polinucleótido unido operativamente en respuesta a una señal o estímulos se denomina "elemento reprimible" (es decir, la señal disminuye la expresión de tal manera que cuando la señal se elimina o está ausente, la expresión aumenta). Normalmente, la cantidad de aumento o disminución conferida por tales elementos es proporcional a la cantidad de señal o estímulo presentes; cuanto mayor sea la cantidad de señal o estímulo, mayor será el aumento o la disminución de la expresión.

60 65 [0111] En algunas realizaciones, el rAAV que tiene una proteína de la cápside que comprende uno o más péptidos dirigidos tal como se define en las reivindicaciones puede utilizarse para transducir con eficacia sistemas nerviosos. Esto hace que el rAAV sea útil para la administración de terapias para tratar, por ejemplo, la enfermedad de Huntington (EH), la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal, los tipos I y II, la ataxia de Friedreich, la ataxia espinocerebelosa y cualquiera de los depósitos lisosomales. trastornos que involucran células con SNC, que incluyen, entre otros, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Sandhoff, Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher (tipo I, II o III), enfermedad de Niemann-Pick (deficiencia de NPC1 o NPC2), síndrome de Hurler, Enfermedad de Pompe, y/o enfermedad de Batten.

[0112] En algunas realizaciones, el rAAV que tiene una proteína de la cápside que comprende uno o más péptidos dirigidos tal como se define en las reivindicaciones se puede utilizar para transducir eficazmente músculos cardíacos, los nervios periféricos, o cualquier combinación de los mismos. Esto hace que el rAAV sea útil para la administración de

agentes terapéuticos para tratar, por ejemplo, ataxia de Friedreich, insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, hipertrofia cardíaca, dolor crónico y/o lesión de nervios periféricos.

5 [0113] En algunas realizaciones, el rAAV que tiene una proteína de la cápside que comprende uno o más péptidos dirigidos tal como se define en las reivindicaciones pueden usarse para suministrar genes a determinados tipos de células en el entorno de destino de un sujeto. Por ejemplo, el rAAV puede usarse para administrar genes a neuronas y glía en el sistema nervioso (incluyendo SNP, SNC o ambos) de un sujeto (p. ej., un mamífero). El péptido de direccionamiento puede ser, por ejemplo, AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46). Las composiciones y métodos descritos por Herien se pueden usar, por ejemplo, (i) para reducir la expresión de Huntingtin mutante en pacientes con Enfermedad de Huntington, por ejemplo, incorporando un casete de expresión de microARN específico de Huntingtin dentro de un genoma de rAAV y empaquetando el genoma de rAAV en una variante de rAAV (p. ej., AAV-PHP.N) para el suministro a través, por ejemplo, de la vasculatura, (ii) entregar una copia funcional del gen Frataxin a pacientes con ataxia de Friedreich, (iii) restaurar la expresión de una enzima crítica para la función lisosomal normal en pacientes que carecen de expresión de la enzima debido a una mutación genética (p. ej., pacientes con enfermedad de Niemann-Pick, mucopolisacardiosis III y/o enfermedad de Gaucher), (iv) usando el rAAV (p. ej., AAV-PHP.N) para generar modelos animales de enfermedad, o una combinación de los mismos.

#### Composiciones y métodos de administración farmacéutica

20 [0114] También se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los virus de rAAV descritos en el presente documento y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones también pueden comprender ingredientes adicionales tales como diluyentes, estabilizadores, excipientes y adyuvantes. Como se usa en este documento, los vehículos, excipientes, diluyentes, adyuvantes o estabilizadores "farmacéuticamente aceptables" son los que no son tóxicos para la célula o el sujeto expuesto a ellos (preferiblemente inertes) en las dosis y concentraciones empleadas o que tienen un nivel aceptable de toxicidad según se determine por los practicantes expertos.

25 [0115] Los vehículos, diluyentes y adyuvantes pueden incluir tampones tales como fosfato, citrato, u otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (p. ej., menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal como el sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween™, Pluronics™ o polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución tamponada de pH acuoso.

30 [0116] Los títulos del rAAV a administrar variarán dependiendo, por ejemplo, del rAAV particular, el modo de administración, el objetivo del tratamiento, el individuo y los tipos de células a los que se dirige, y pueden determinarse mediante métodos estándar en la técnica.

35 [0117] Como será fácilmente evidente para un experto en la técnica, la utilidad *in vivo* de dosificación del virus recombinante para ser administrado y el modo particular de administración variará dependiendo de la edad, el peso, la gravedad de la afección, y especies animales tratadas, el virus recombinante particular que expresa la proteína de interés que se usa, y el uso específico para el que se emplea el virus recombinante. La determinación de niveles de dosificación eficaces, es decir, los niveles de dosificación necesarios para lograr el resultado deseado, puede ser realizada por un experto en la técnica utilizando métodos farmacológicos de rutina. Normalmente, las aplicaciones clínicas humanas de los productos comienzan con niveles de dosificación más bajos, incrementándose el nivel de dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. Alternativamente, se pueden usar estudios *in vitro* aceptables para establecer dosis útiles y rutas de administración de las composiciones identificadas por los métodos presentes usando métodos farmacológicos establecidos.

40 [0118] Aunque la dosificación exacta se determinará sobre una base fármaco por fármaco, en la mayoría de los casos, se pueden preparar algunas generalizaciones en cuanto a la dosificación. En algunos casos, el rAAV para la entrega de un ácido nucleico en el sistema nervioso (p. ej., SNC) de un sujeto se puede administrar, por ejemplo, mediante inyección, a un sujeto a una dosis de entre  $1 \times 10^{10}$  copias de genoma (CG) del recombinante virus por kg del sujeto y  $2 \times 10^{14}$  CG por kg, por ejemplo entre  $5 \times 10^{11}$  CG/kg y  $5 \times 10^{12}$  CG/kg. En algunos casos, la dosis de rAAV administrada al sujeto no es más de  $2 \times 10^{14}$  CG por kg. En algunos casos, la dosis de la rAAV administrada al sujeto no es más que  $5 \times 10^{12}$  CG por kg. En algunos casos, la dosis de la rAAV administrada al sujeto no es más que  $5 \times 10^{11}$  CG por kg.

45 [0119] Los virus recombinantes descritos en este documento pueden administrarse a un sujeto (p. ej., un ser humano) en necesidad del mismo. La vía de administración no está particularmente limitada. Por ejemplo, se puede administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los virus recombinantes mediante rutas estándar en la técnica. Los ejemplos no limitantes de la ruta incluyen la ruta intramuscular, intravaginal, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, epicutánea, intradérmica, rectal, intraocular, pulmonar, intracraneal, intraósea, oral, bucal, sistemática o nasal. En algunos casos, el virus recombinante se administra al sujeto mediante transducción sistemática. En algunos casos, el virus recombinante se administra al sujeto mediante inyección intramuscular. En algunos casos, el virus recombinante se

administra al sujeto mediante inyección intravaginal. En algunos casos, el rAAV se administra al sujeto por vía parenteral (p. ej., por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea), por escarificación superficial o por inoculación en una cavidad corporal del sujeto. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la(s) vía(s) de administración y el (los) serotipo(s) de los componentes de AAV del virus rAAV teniendo en cuenta la infección y/o el estado de enfermedad que se está tratando y las células/tejidos diana que son para expresar la proteína de interés. En algunos casos, puede resultar ventajoso administrar el rAAV mediante administración intravenosa.

5 [0120] La administración real del rAAV se puede lograr mediante el uso de cualquier método físico que transportará el rAAV en el tejido diana del sujeto. Por ejemplo, el rAAV se puede administrar por vía intravenosa. Como se describe en el presente documento, las proteínas de la cápside del rAAV se pueden modificar de modo que el rAAV se dirija a un entorno diana particular de interés como el sistema nervioso central, y para potenciar el tropismo al entorno diana de interés (p. ej., tropismo del SNC). En algunas realizaciones, el rAAV administra un ácido nucleico al corazón, nervios periféricos o una combinación de los mismos. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, por ejemplo, como formulaciones inyectables.

10 [0121] El virus recombinante para ser usado puede ser utilizado en forma líquida o liofilizada (en combinación con uno o más conservantes adecuados y/o agentes protectores para proteger al virus durante el proceso de liofilización). Para la terapia génica (p. ej., de trastornos neurológicos que pueden ser mejorados por un producto genético específico) una dosis terapéuticamente eficaz del virus recombinante que expresa la proteína terapéutica se administra a un huésped en necesidad de tal tratamiento. El uso del virus recombinante descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para inducir inmunidad o proporcionar terapia génica a un huésped está dentro del alcance de la presente solicitud.

15 [0122] En los casos donde se han establecido dosificaciones humanas para los rAAV para al menos algunas condiciones, se pueden usar esas mismas dosificaciones, o dosificaciones que se encuentran entre aproximadamente 0,1% y 500%, más preferiblemente entre aproximadamente 25% y 250% de la dosificación humana establecida. Cuando no se establezca una dosis humana, como será el caso de las composiciones farmacéuticas recién descubiertas, se puede inferir una dosis humana adecuada a partir de los valores de DE<sub>50</sub> o DL<sub>50</sub>, u otros valores apropiados derivados de estudios *in vitro* o *in vivo*, según lo calificado por estudios de toxicidad y estudios de eficacia en animales.

20 [0123] Una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV puede administrarse a un sujeto en diversos puntos de tiempo. Por ejemplo, el rAAV se puede administrar al sujeto antes, durante o después de que el sujeto haya desarrollado una enfermedad o trastorno. El rAAV también puede ser administrado al sujeto antes de, durante, o después de la aparición de una enfermedad o trastorno (p. ej., enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, tipos I y II, ataxia de Friedreich, ataxia espinocerebelosa y cualquiera de los trastornos de almacenamiento lisosómico que involucran células con SNC, que incluye, entre otros, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Sandhoff, Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher (tipo I, II o III), Enfermedad de Niemann-Pick (deficiencia de NPC1 o NPC2), síndrome de Hurler, enfermedad de Pompe, enfermedad de Batten o cualquier combinación de las mismas), dolor crónico, insuficiencia cardíaca, arritmias cardacas o una combinación de las mismas. En algunos casos, el rAAV se administra al sujeto durante la remisión de la enfermedad o trastorno. En algunos casos, el rAAV se administra antes del inicio de la enfermedad o trastorno en el sujeto. En algunos casos, el rAAV se administra a un sujeto con riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno.

25 [0124] La frecuencia de dosificación del virus rAAV puede variar. Por ejemplo, el virus rAAV se puede administrar al sujeto aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada seis meses, aproximadamente una vez al año, aproximadamente una vez cada dos años, aproximadamente una vez cada tres años, aproximadamente una vez cada cuatro años, aproximadamente una vez cada cinco años, aproximadamente una vez cada diez años o aproximadamente una vez cada quince años. En algunas realizaciones, el virus rAAV se administra al sujeto como máximo aproximadamente una vez por semana, como máximo aproximadamente una vez cada dos semanas, como máximo aproximadamente una vez al mes, como máximo aproximadamente uno cada seis meses, como máximo aproximadamente una vez al año, como máximo como máximo una vez cada dos años, como máximo una vez cada tres años, como máximo una vez cada cuatro años, como máximo una vez cada cinco años, como máximo una vez cada seis años, como máximo una vez cada siete años, como máximo aproximadamente una vez cada ocho años, como máximo una vez cada nueve años, como máximo una vez cada diez años, o como máximo una vez cada quince años.

## **EJEMPLOS**

30 [0125] Algunos aspectos de las realizaciones descritas anteriormente se describen con más detalle en los siguientes ejemplos, que de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

### Ejemplo 1

35 [0126] Evolución de AAV-PHP.B para crear variantes

5 [0126] Para desarrollar variantes de AAV-PHP.B que proporcionen una mayor transducción del SNC y una transducción más selectiva de neuronas, la secuencia AAV-PHP.B 7-mer (SEQ ID NO: 40) descrita en la publicación de patente de EE. UU. Nº 2015/0079038 se aleatorizó parcialmente mediante el reemplazo superpuesto de 3 aminoácidos de la secuencia de 7 unidades y los 2 aminoácidos que flanquean las unidades 7-mer con aminoácidos aleatorios. Se muestra una descripción general de esta estrategia para desarrollar AAV-PHP.B en la **FIG. 1** (X presenta cualquiera de los 20 aminoácidos estándar).

#### AAV-PHP.N

10 10 [0127] Después de dos rondas de selección, se encontraron numerosas variantes para ser enriquecidas en las secuencias recuperadas de una o más de las líneas de Cre. Se eligió una de esas secuencias, AAV-PHP.N (DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4)) para la caracterización como variante individual.

15 15 [0128] La secuencia de DGTLAVPFKAQ representó 8,1% de las secuencias totales recuperadas de los ratones Vgat-IRES-Cre, 4,4% de las secuencias se recuperó de los ratones VGLUT2-IRES-Cre, 0% de las secuencias se recuperó de los ratones GFAP-Cre y 0% de secuencias recuperadas del hígado (recuperación no dependiente de cre). Basándose en estos datos, se creía que DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4) sería selectivamente más eficaz en la transducción de neuronas sobre astrocitos. La secuencia de aminoácidos DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4) se seleccionó independientemente de 2 secuencias de nucleótidos diferentes: (i) GAT GGG ACT TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (SEQ ID NO: 54), (ii) GAT GGG ACG TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (SEQ ID NO: 55). Junto a las secuencias con el consenso D/ES/G-TLAVPK (SEQ ID NO: 40) representaron el 18,9% de las secuencias totales recuperadas de los ratones Vgat-IRES-Cre, el 15,6% de las secuencias recuperadas de los ratones Vglut2-IRES-Cre, 8,3% de las secuencias recuperadas de ratones GFAP-Cre, y 0% de secuencias recuperadas del hígado (recuperación no dependiente de Cre) después de dos rondas de selección.

20 25 [0129] Los datos para AAV-PHP.N (DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4)) se presentan en la **FIG. 2**. La identificación de la cápside que comprende la secuencia AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) fue posible mediante el uso del método CREATE descrito en este documento para realizar selecciones simultáneas en múltiples líneas de ratones transgénicos Cre. Tomados en conjunto, los hallazgos de que (i) la secuencia AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) se recuperó selectivamente de las neuronas del SNC pero no de los astrocitos del SNC o del hígado y que (ii) la cápside AAV-PHP.N proporciona la transducción selectivamente mejorada de neuronas pero no de la glía y el hígado (en comparación con AAV-PHP.B) demuestra la utilidad de realizar selecciones *in vivo* en múltiples tipos de células para diseñar nuevos vectores con características de transducción más deseables.

#### AAV-PHP.S

30 35 [0130] La variante de AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47) fue descubierta por selección de cápsides de AAV que se dirigen de manera más eficiente a las células que expresan GFAP-Cre. La variante se identificó a partir de una biblioteca en donde se insertó 7AA (7-mer) de secuencia aleatoria entre los aminoácidos 588-589 de la proteína de la cápside (numeración VP1). El AAV-PHP.S tiene la secuencia de 7-mer de QAVRTSL (SEQ ID NO: 37) que está codificada por la secuencia de ácido nucleico de CAG GCG GTT AGG ACG TCT TTG (SEQ ID NO: 56).

40 45 [0131] El AAV9 es un vector candidato líder para la transferencia de genes al músculo cardíaco y también proporciona la transducción de nervios periféricos cuando se administra a través de la vasculatura. Los datos mostrados en las **FIGS. 3A-3D** demuestran que AAV-PHP.S administrado sistémicamente (SEQ ID NO: 47) proporciona marcadamente más expresión en el corazón y los nervios sensoriales que AAV9 (SEQ ID NO: 45) que no comprende péptido de direccionamiento AAV-PHP.S.

#### Ejemplo 2

50 Recuperación de secuencias nuevas de cápside de AAV usando evolución dirigida AAV basada en recombinación Cre (CREATE)

55 [0132] La evolución dirigida se ha utilizado para generar AAV que evaden anticuerpos neutralizantes (Maheshri et al 2006) y mejores células de glioma diana (McGuire et al. 2010), epitelio de las vías respiratorias (Excoffon et al. 2009) y fotorreceptores en la retina después de la inyección intravítreo (Dalkara et al 2013). Además, utilizando un modelo de hígado químérico humano/ratón, Lisowski et al. desarrolló un rAAV que se dirigió de manera específica y eficiente a los hepatocitos humanos (2013). Algunos de los casos descritos en este documento proporcionan métodos para el enriquecimiento y la recuperación selectiva de secuencias con rasgos deseables de bibliotecas de variantes de secuencia usando una estrategia de recuperación dependiente de la recombinación.

60 65 [0133] Un enfoque que se ha utilizado para desarrollar rAAV con mejor direccionamiento de tipo de tejido/célula es llevar a cabo la evolución dirigida en el gen de la cápside de AAV. Normalmente, esto se hace creando una biblioteca de AAV competentes para la replicación que se modifican para introducir mutaciones aleatorias en el gen cap de AAV, que codifica las proteínas de la cápside que determinan el tropismo tisular. A continuación, se inyecta la biblioteca de virus de la cápside de AAV en un animal o se administra a las células en cultivo. Despues de un cierto tiempo, se recuperan las

secuencias de la cápside que están presentes en las células/tejido de interés. Estas secuencias recuperadas se utilizan para generar un nuevo grupo de virus y luego se repite el proceso. A través de rondas repetidas de selección/recuperación de secuencia, se enriquecerán las secuencias que generan cápsides que funcionan mejor (es decir, las que pasan repetidamente el proceso de selección). Las cápsides que exhiben una capacidad mejorada para transducir la diana 5 pueden recuperarse y evaluarse como clones individuales o mutar más y someterse a rondas adicionales de selección.

[0134] Este ejemplo describe los métodos y materiales usados en una estrategia de selección llamada evolución dirigida a AAV basada en recombinación Cre (CREATE), que permite el desarrollo de cápsides de AAV que de manera más eficiente transducen *in vivo* poblaciones de células que expresan Cre definidas. Como se describe en el presente 10 documento, CREATE se usó para generar variantes de AAV que transducen de manera eficiente y amplia el sistema nervioso central (SNC) del ratón adulto después de la inyección intravenosa. Las variantes generadas con este método pueden transferir genes a través del SNC con una eficiencia que a veces es 40 veces mayor que la del estándar actual, AAV914-17, y transduce la mayoría de astrocitos y neuronas en múltiples regiones del SNC. En aplicaciones *in vitro*, las 15 variantes pueden transducir neuronas y astrocitos humanos de manera más eficiente que AAV9, lo que demuestra el potencial de CREATE para producir vectores AAV personalizados para aplicaciones biomédicas.

#### Materiales y métodos experimentales

##### *Método de modificación del plásmido de genoma rAAV-Cap-en-cis-lox*

[0135] El plásmido de genoma de rAAV-Cap-en-cis-lox contiene tres elementos principales flanqueadas por AAV2 RTI: (i) un casete de expresión mCherry, que está compuesto por un fragmento de 398pb del gen UBC humano corriente arriba del ADNc de mCherry seguido de una secuencia de poliadenilación sintética40; (ii) el gen de la cápside de AAV9 y las 20 secuencias reguladoras, que comprenden la secuencia promotora p41 de AAV5 (1680-1974 de GenBank AF085716.1) y secuencias de corte y empalme tomadas del gen rep de AAV2; y (iii) un comutador dependiente de Cre, que está 25 compuesto por la secuencia de poliadenilación (pA) de SV40 flanqueada por sitios lox71 y lox66 invertidos. El plásmido del genoma rAAV-Cap-in-cis-lox se modificó adicionalmente para introducir dos sitios de restricción únicos, XbaI y AgeI, dentro de la secuencia de la cápside. Estos sitios flanquean la región (AA450-592) que se reemplaza por el fragmento de 30 biblioteca aleatorizada. La introducción del sitio XbaI introduce una mutación K449R, que no tiene un efecto manifiesto sobre la producción o transducción del vector. Las mutaciones necesarias para insertar el sitio de AgeI son silenciosas. Para el plásmido aceptor rAAV-ΔCap-in-cis usado para la clonación de la biblioteca de cápside, se eliminó la región codificante entre los sitios XbaI y AgeI para evitar la producción de virus a partir del plásmido aceptor que carece del fragmento de la biblioteca.

[0136] Como una plantilla para el fragmento de biblioteca, la región que abarca los sitios XbaI y AgeI de AAV9 modificado fue PCR amplificado. Esta secuencia se modificó para eliminar un sitio de restricción Earl único e insertar un sitio KpnI único (ambas mutaciones silenciosas) para crear el fragmento xE. El fragmento xE modificado se clonó con TA en pCRII (Life Technologies) para generar pCRII-9Cap-xE. La eliminación del sitio Earl proporcionó un segundo método que podría 35 usarse, si fuera necesario, para digerir selectivamente secuencias de cápside contaminantes (AAV9) recuperadas por PCR, pero no digerir las secuencias derivadas de la biblioteca. El uso del aceptor rAAV-ΔCap-in-cis para clonar las bibliotecas y tomar las precauciones estándar de PCR (p. ej., reactivos de tratamiento UV y pipetas) fue suficiente para 40 prevenir la contaminación.

[0137] El plásmido auxiliar AAV2/9 REP-AAP se construyó mediante la introducción de cinco codones de parada en la 45 secuencia de codificación del marco de lectura VP del gen AAV9 en VP1 AA: 6, 10, 142, 148 y 216. El codón de parada en AA216 se diseñó para no alterar la secuencia codificante de la proteína AAP, que está codificada dentro de un marco de lectura alternativo.

[0138] Varios genomas de rAAV se utilizaron en este estudio. Cada se construye dentro de un genoma rAAV 50 monocatenario (ss) con un reportero impulsado por el promotor híbrido ubicuo CMV-β-actina-intrón-β-globina (CAG). Para simplificar, las descripciones de los vectores se han abreviado en el texto. ssAAV-CAG-GFP se refiere a ssAAV-CAG-eGFP-2A-Luc-WPRE-SV40 poliA. ssAAV-CAG-NLS-GFP se refiere a ssAAV-CAG-NLSGFP-WPRE-SV40 poliA, que se construyó insertando la secuencia de localización nuclear PKKKRKV en los extremos N y C de GFP. ssAAV-CAG-mNeGreen-f se refiere a ssAAV-CAGmNeonGreen-f-WPRE con una señal poliA de hormona de crecimiento humana. El 55 mNeonGreen se modificó con la secuencia de dirección de membrana (señales de farnesilación y palmitoilación) de c-Ha-Ras.

##### *Método de generación de bibliotecas de cápsides*

[0139] El fragmento de biblioteca de 7-mer aleatorio (insertado entre los aminoácidos 588 y 589) se generó mediante PCR 60 usando Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB; M0493), cebadores XF y 7xMNN y pCRII-9Cap-xE como plantilla. Los esquemas que muestran los sitios de unión del cebador aproximados se muestran en las FIGS. 8A-8B y las secuencias del cebador se proporcionan en la Tabla 1. Para generar la biblioteca basada en rAAV, los productos de PCR 65 que contienen la biblioteca y el plásmido aceptor de rAAV-ΔCap-in-cis digerido con XbaI y AgeI se ensamblaron usando Gibson Assembly (NEB; E2611). A continuación, los productos de reacción se trataron con Plasmid Safe (PS) DNase (Epicenter; E3105K) para digerir cualquier fragmento sin ensamblar y se purificaron usando un kit de purificación de PCR

QIAquick (Qiagen). Esta reacción normalmente produjo más de 100 ng de plásmido ensamblado (como se define por la cantidad de ADN que queda después de la etapa de digestión con PS DNasa). 100 ng son suficientes para transfectar diez placas de cultivo de tejidos de 150 mm a 10 ng/placa. Tenga en cuenta que las bibliotecas también se pueden construir mediante ligación o ensamblaje de Gibson y luego amplificar en *E. coli*, pero la transformación bacteriana reduce la diversidad de la biblioteca. Al transfectar directamente los productos de reacción ensamblados, la diversidad de la biblioteca está limitada en cambio por el número de células productoras HEK293 transfectadas con éxito.

Tabla 2. Secuencias de cebadores

Cebador	Propósito	Secuencia
9CapF	Paso 1: adelante	CAGGTCTTACGGACTCAGACTATCAG (SEQ ID NO: 57)
CDF	Paso 1: invertido por Cre	CAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCG (SEQ ID NO: 58)
XF	Paso 2: adelante	ACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTAGAAC (SEQ ID NO: 59)
AR	Paso 2: inverso	GGAAGTATTCCCTGGTTTGACCA (SEQ ID NO: 60)
TF	qPCR adelante	GGTCGCGTTCTGTTGTGGAT (SEQ ID NO: 61)
TR	qPCR inverso	GCACCCCTTGAAGCGCATGAACCTCT (SEQ ID NO: 62)
7xMNNN	Generación de biblioteca 588i inverso	GTATTCCCTGGTTTGAAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCMNN MNNMNNMNNMNNMNNMNNNTGGCACTCTGGTGGTTGTC (SEQ ID NO: 63)

## Método de producción y purificación de virus

[0140] AAV recombinantes fueron generados por transfección triple de células 293T (ATCC) utilizando polietilenimina (PEI). Las partículas virales se recogieron del medio a las 72 horas después de la transfección y de las células y el medio a las 120 horas. Los sedimentos celulares se resuspendieron en Tris 10 mM con MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 8, se congelaron-descongelaron tres veces y se trataron con 100 U/ml de Benzonasa (Epicentro) a 37°C durante al menos 1 hora. Los medios virales se concentraron por precipitación con 8% de polietileno glicol 8000 (Sigma-Aldrich) con cloruro de sodio 500 mM, se resuspendieron en Tris-MgCl<sub>2</sub>, y después se añadieron a los lisados. A continuación, las soluciones madre combinadas se ajustaron a NaCl 500 mM, se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se aclararon mediante centrifugación a 2000 x g. A continuación, las soluciones madre clarificadas se purificaron sobre gradientes escalonados de iodixanol (Optiprep, Sigma; D1556) (15%, 25%, 40% y 60%). Los virus se concentraron y formularon en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los títulos de virus se determinaron midiendo el número de vg resistentes a DNase usando qPCR con plásmido de genoma linealizado como estándar.

[0141] Para la generación de virus de la biblioteca de la cápside, se hicieron dos modificaciones en el protocolo de producción de virus de arriba para reducir la producción de cápsides de mosaico que podrían derivarse de la presencia de múltiples secuencias de la cápside en la misma célula. Primero, solo se transfectaron 10 ng del plásmido de la biblioteca rAAV-Cap-in-cis (por placa de 150 mm) para aumentar la probabilidad de que la mayoría de las células transfectadas solo recibieran una secuencia variante de la cápside. En segundo lugar, el virus se recogió a las 48 horas (medio) y 60 horas (células y medio), en lugar de a las 72 horas y 120 horas como se describe anteriormente, para minimizar la transducción secundaria de las células productoras con el virus de la biblioteca Raav liberado en el medio.

## Animales

[0142] Se adquirieron ratones GFAP-Cre que expresaban Cre bajo el control del promotor GFAP de ratón (012886) y ratones C57B1/6J (000664) del Laboratorio Jackson (JAX). La administración intravenosa de vectores rAAV se realizó inyectando el virus en el seno retroorbital. Los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tamaño de muestra predeterminado. No se excluyó ningún ratón de estos análisis. Los experimentadores no estaban cegados a los grupos de muestra.

Selección *in vivo*

[0143] Para las selecciones en ratones GFAP-Cre, 1x10<sup>11</sup> vg de las bibliotecas de la cápside se inyectaron por vía intravenosa en ratones adultos Cre<sup>+</sup> de cualquier sexo. De siete a ocho días después de la inyección, se sacrificó a los ratones y se recogieron el cerebro y la médula espinal. El ADN del vector se recuperó de un hemisferio del cerebro y la mitad de la médula espinal usando 4-5 ml de Trizol (Life Technologies; 15596). Para purificar el ADN viral, la fracción acuosa superior se recogió de acuerdo con el protocolo de extracción del fabricante. Descubrimos que la fracción acuosa contiene una porción significativa de los genomas de ADN viral, así como de ARN. A continuación, el ARN se digirió mediante tratamiento con 1 ul de ARNasa A (Qiagen) a 37°C durante la noche. A continuación, se utilizó una estrategia de amplificación por PCR de dos pasos para recuperar selectivamente secuencias Cap de genomas recombinados con Cre. La primera etapa de amplificación amplifica preferentemente secuencias rAAV-Cap-en-cis-lox recombinadas con Cre utilizando los cebadores 9CapF y CDF (véanse las FIGS. 8A-8B). La PCR se realizó durante 20-26 ciclos de 95°C durante 20 segundos, 60°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos utilizando ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 Hot

Start. A continuación, el producto de PCR se diluyó 1:10 o 1:100 y luego se usó como molde para una segunda reacción de PCR independiente de Cre usando los cebadores XF y AR (**FIGS. 8A-8B** y **Tabla 2**). La segunda PCR generó el fragmento que se clonó de nuevo en el plásmido acceptor rAAV-ΔCap-in-cis como se describió anteriormente. A continuación, 1 µl de las reacciones de ensamblaje de Gibson se diluyeron 1:10 y se transformaron en células competentes SURE2 (Agilent; 200152) para generar clones individuales para secuenciación.

**[0144]** Las variantes que mostraron pruebas de Enriquecimiento se clonaron en un plásmido de AAV Rep-Cap y se transformaron en células competentes DH5 $\alpha$  (ORC). A continuación, se evaluaron las nuevas variantes de AAV Rep-Cap, o AAV2/9 Rep-Cap como control, usando uno de los genomas informadores descritos anteriormente.

10

#### *Biodistribución del vector*

**[0145]** Ratones C57B1/6 hembra de seis semanas de edad fueron inyectados por vía intravenosa con  $1 \times 10^{11}$  vg del vector AAVss-CAG-GFP empaquetado en la cápside de AAV indicada. Los animales se asignaron aleatoriamente a grupos. 25 días después de la inyección, los ratones se sacrificaron y los tejidos y las regiones cerebrales indicadas se recogieron y congelaron a -80°C. El ADN se aisló de las muestras de tejido utilizando el kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue. Los genomas del vector se detectaron usando cebadores de PCR que se unen al elemento WPRE y se normalizaron a los genomas de ratón usando cebadores específicos para el gen del glucagón de ratón. La cuantificación absoluta se realizó usando diluciones en serie de patrones de plásmidos linealizados de concentración conocida<sup>46</sup>. Un animal elegido al azar inyectado con AAV-PHP.B se retiró del estudio de biodistribución para el análisis histológico.

20

#### *Preparación de tejidos, inmunohistoquímica y de formación de imágenes*

**[0146]** Los ratones fueron anestesiados con Nembutal y perfundidos transcardialmente con tampón de fosfato 0,1 M (TF) a temperatura ambiente (TA) a pH 7,4 y luego con paraformaldehído (PFA) recién preparado, enfriado con hielo al 4% en TF. Los cerebros se fijaron posteriormente en PFA al 4% durante la noche y luego se seccionaron mediante vibratomo o se crioprotegieron y se seccionaron mediante criostato. La IHC se realizó en secciones flotantes con anticuerpos primarios y secundarios en PBS que contenía suero de cabra o burro al 10% y Triton X-100 al 0,5% (no se utilizó detergente para la tinción con GAD67). Los anticuerpos primarios utilizados fueron la cápside anti-AAV de ratón (1:20; American Research Products, 03-65158, clon B1), conejo anti-GFP (1:1000; Invitrogen, A11122), pollo anti-GFP (1:1000; Abcam, ab13970), anti-CC1 de ratón (1:200; Calbiochem, OP80), anti-GFAP de conejo (1:1000; Dako, Z0334), anti-NeuN de ratón (1:500; Millipore, MAB377), anti-Iba1 de conejo (1:500; Biocare Medical, CP290), anti-Calbindin D28K de ratón (1:200; Sigma, CB-955), anti-Calretinin de conejo (1:1000; Chemicon, AB5054), anti-GAD67 de ratón (1:1000; Millipore, MAB5406), anti-MAP2 de cobaya (1:1000; Synaptic Systems, 188004), anti-parvalbúmina de ratón (1:1000; Sigma), tirosina hidroxilasa (1:1000, Aves) y anti-CD31 de conejo (1:50; Abcam, ab28364). Se realizaron incubaciones de anticuerpos primarios durante 16-24 horas a TA. A continuación, las secciones se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa (1:1000; Invitrogen) durante 2-16 horas. Para la detección de la cápside con el anticuerpo B1 que reconoce un epítopo interno, las secciones flotantes se trataron con HCl 2M durante 15 minutos a 37°C y luego se lavaron extensamente con PBS antes de la incubación con el anticuerpo primario. Para algunas imágenes, la gamma del canal verde (GFP) de 16 bits se ajustó para permitir la visualización (sin sobresaturación) de las células que expresan GFP bajas y altas presentes dentro del mismo campo de visión. En todos los casos, los cambios en la gamma o el contraste, así como la configuración del microscopio y el láser, se mantuvieron constantes en todos los conjuntos de imágenes. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 equipado con los siguientes objetivos: Fluor 5x/0,25 M27 Plan-Apochromat 10x/0,45 M27 (distancia de trabajo 2,0 mm), Plan-Apochromat 25x/0,8 Imm Corr DIC M27 multi-inmersión y LD CApochromat 40x/1,1 W Korr y objetivos Plan-Apochromat 100x/1,46 Aceite DIC. Se generaron imágenes MIP 3D y películas complementarias con Imaris (Bitplane).

40

#### *Cuantificación de transducción específicas de tipo de células*

**[0147]** Los ratones hembra de seis semanas de edad fueron asignados al azar a grupos y se inyectaron por vía intravenosa con  $2 \times 10^{12}$  vg de AAVss-CAG-NLS-GFP empaquetado en AAV9, AAV-PHP.B o AAV-PHP.A. Tres semanas más tarde, los ratones se perfundieron y los cerebros se procesaron e inmunotearon para el antígeno indicado como se describió anteriormente. Se pre estableció el número de animales por grupo; no se excluyó ningún animal del análisis. Se tomaron imágenes confocales de un solo plano de la inmunotinción específica del tipo celular y la fluorescencia nativa de NLS-GFP. Para evitar el sesgo, se tomaron imágenes de las regiones coincidentes indicadas identificadas viendo solo el canal de inmunotinción específico del tipo de célula, en lugar de la expresión de GFP, antes de la adquisición de la imagen. Asimismo, el recuento de células se realizó contando primero y marcando cada célula teñida por el antígeno específico de la célula observando el canal IHC. A continuación, se contaron las células IHC + marcadas que fueron positivas para la fluorescencia de GFP nativa. Debido a las marcadas diferencias de eficiencia de transducción entre las cápsides, el recuento no fue cegado por grupo.

50

#### *Aclarado del tejido*

**[0148]** Los ratones se perfundieron como anteriormente con 60-80 ml de PFA al 4% enfriado con hielo en TF a un caudal de 14 ml por minuto. A continuación, se redujo el caudal a 2-3 ml/min y se continuó durante 2 horas a TA. Luego, los ratones se colocaron en cámaras personalizadas individuales y se perfundieron con 200 ml de acrilamida al 4% de TA de

reciclaje en TF a 2-3 ml/min durante la noche, seguido de un enjuague de perfusión de 2 horas con TF para eliminar los polímeros/monómeros residuales de la vasculatura. El proceso de polimerización se inició colocando las cámaras en un baño de agua a 42°C y administrando, por perfusión (2-3 mL/min), 200 mL de reciclado, TF desgasificado que contenía iniciador VA-044 al 0,25% durante 2-4 h. A continuación, los ratones se perfundieron con SDS al 8% en TF, pH 7,5 durante 7 días. La solución que contenía SDS se refrescó dos veces durante los 7 días y luego se lavó mediante perfusión de 2 L de TF no recirculante durante la noche. Las muestras de tejido depuradas se montaron en solución RIMS (índice de refracción de 1,46) para la obtención de imágenes.

#### *Generación de esferoides corticales de iPSC humano*

[0149] Esferoides corticales humanos fueron generados a partir de iPSC como se describió anteriormente. Brevemente, las líneas de iPSC derivadas de dos individuos de control sanos se cultivaron en alimentadores de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados en el siguiente medio: DMEM/F12, suero knockout 20%, 1 mM de aminoácidos no esenciales (1:100), GlutaMax (1:200), β-mercaptopetanol (0,1 mM), penicilina y estreptomicina (1:100) (Life Technologies). Los cultivos se probaron regularmente y se mantuvieron libres de micoplasmas. Las colonias de iPSC se separaron intactas con dispasa (0,35 mg/ml, Invitrogen) y se transfirieron a placas de baja adherencia en medio iPSC suplementado con dorsomorfina (5 μm, Sigma) y SB-431542 (10 μm, Tocris), y el medio se cambió a diario. El día seis de diferenciación *in vitro*, los esferoides neurales se transfirieron a medio NPC (Neurobasal A, B27 sin vitamina A, GlutaMax (1:100), penicilina y estreptomicina; Life Technologies), que se complementó con EGF (20 ng/ml) y FGF2 (20 ng/ml) hasta el día 24, y luego suplementado con BDNF (20 ng/ml) y NT3 (20 ng/ml) desde el día 25 al 42. Desde el día 43 en adelante, los esferoides corticales se mantuvieron en medio NPC, que se cambia cada 4 días.

#### *Disociación e infección viral de esferoides corticales*

[0150] Para la disociación enzimática y la cultura en monocapa, esferoides corticales en día 170-200 de la diferenciación *in vitro* (dos diferenciaciones neurales independientes de una línea iPSC de un individuo y una diferenciación de una línea iPSC de otro individuo) se incubaron con Accutase (Innovative Cell Technologies) durante 25 min a 37°C, se lavaron tres veces con medio NPC y se trituraron suavemente con una pipeta P-200. Las células se sembraron en un cubreobjetos de vidrio recubierto de poliornitina y laminina (15 mm) a ~300.000 células/pocillo y se mantuvieron en medio NPC suplementado con BDNF (20 ng/ml) y NT3 (20 ng/ml) durante las primeras 24 horas y luego se mantuvieron en medio NPC sin factores de crecimiento.

[0151] Los cultivos cultivadas en cubreobjetos se infectaron con cada uno de los virus a un título de  $1 \times 10^9$  vg/pocillo y se fijaron 5 días más tarde con 4% de paraformaldehído (PFA) durante 10 min. Para la inmunocitoquímica, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2% durante 10 minutos y se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS durante 1 hora. A continuación, los cubreobjetos se incubaron con anticuerpos diluidos en solución de bloqueo durante 2 horas. Los núcleos se visualizaron con Hoechst 33258 (Life Technologies, 1:10,000).

[0152] Se obtuvieron imágenes de las células con un axioscopio Zeiss M1 usando un objetivo de 40X. La proporción de células GFP<sup>+</sup> etiquetadas con GFAP o MAP2 se cuantificó en imágenes de 10 campos aleatorios por cubreobjetos para cada condición experimental. Los resultados presentados son el promedio de dos experimentos separados de disociación e infección.

[0153] Para infectar cultivos 3D intactos con VAA, esferoides corticales humanos individuales en el día 197 de la diferenciación *in vitro* se transfirieron durante la noche en tubos de 1,5 ml Eppendorf que contenían  $6 \times 10^9$  vg/400 μl en los medios de la APN, y se fijaron 7 días más tarde en PFA al 4% durante la noche. Despues, los esferoides fijados se transfirieron a sacarosa al 30% durante 24 horas, se incluyeron en OCT (Fisher Scientific) y se cortaron en secciones de 14 μm. Para la inmunohistoquímica, las secciones se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS que contenía Triton-X100 al 0,3% durante 1 hora. Las imágenes se recogieron con un microscopio confocal Leica TCS SP8.

#### Generación de variantes de rAAV usando CREATE

[0154] CREATE usa un genoma de cápside de rAAV (rAAV-Cap-in-cis-lox) que acopla un gen *Cap* de AAV de longitud completa, controlado por elementos reguladores del gen *Rep* de AAV (**FIG. 4B**), con un interruptor Cre invertible (**FIG. 4B**). Al construir bibliotecas de cápside dentro del esqueleto rAAV-Cap-in-cis-lox y entregar las bibliotecas de virus a animales con expresión de Cre en una población celular definida, el sistema permite la amplificación selectiva y la recuperación de secuencias que han transducido la población diana (**FIG. 4C**). Debido a que el genoma de rAAV-Cap-in-cis-lox carece de un gen *Rep* funcional, *Rep* debe proporcionarse en trans para la producción de virus. Para este propósito, el plásmido rep-cap de AAV2/9 se puede modificar para eliminar la expresión de la proteína de la cápside insertando codones de parada en marco de lectura para cada proteína de la cápside, VP1-3 (**FIG. 4D**). Estos codones de parada no alteran la secuencia de aminoácidos de la proteína de ensamblaje de activación (AAP), que se expresa a partir de un marco de lectura alternativo dentro del gen *Cap* 22. Este genoma dividido de rAAV-Cap-in-cis-lox y el sistema auxiliar RepAAP AAV genera eficientemente rAAV (**FIG. 4E**) y es la base de la plataforma de selección CREATE, que permite la recuperación de la secuencia de la cápside a partir de poblaciones de células que expresan Cre definidas genéticamente dentro de muestras de tejido heterogéneas (véanse las **FIGS. 8A-8B**).

- [0155] Dentro del genoma aceptor rAAV-Cap-en-cis-lox de una biblioteca se generó de variantes AAV a través de la inserción de 7 aminoácidos (AA) de secuencia aleatoria (7-mer) entre AA588-589 (posición VP1) de la cápside AAV9 (**FIGS. 4F-4G**). Para seleccionar los vectores que cruzaban la BHE y las células transducidas por todo el SNC, se administró la biblioteca de cápside por vía intravenosa a ratones GFAP-Cre adultos, que expresan Cre en astrocitos. Una semana más tarde, se aisló el ADN del tejido del cerebro y de la médula espinal y se recuperaron las secuencias de la cápside mediante PCR de los genomas virales que habían experimentado una recombinación mediada por Cre. La biblioteca completa de secuencias Cap recuperadas se clonó de nuevo en el genoma aceptor rAAV-Cap-in-cis-lox para generar la biblioteca GFAP1 y se eligieron al azar 13 clones para la secuenciación. Todas las secuencias probadas recuperadas de la biblioteca GFAP1 fueron únicas y, por lo tanto, la biblioteca de plásmidos GFAP1 se usó para generar una segunda biblioteca de virus y realizó una ronda adicional de selección en ratones GFAP-Cre. Después de la segunda selección, se enriquecieron varias variantes (ver **Tabla 3**) y mostraron una transducción mejorada del SNC (**FIG. 9A**). Se eligió la variante más enriquecida, AAV-PHP.B, para una evaluación adicional del tropismo *in vivo*. AAV-PHP.B representó el 25% de las secuencias de la biblioteca recuperadas y codifica la secuencia de 7-mer TLAVPK (SEQ ID NO: 40).
- [0156] Se han usado cápsides AAV-PHP.B y AAV9 para empaquetar un vector reportero GFP monocatenario (ss) impulsado por el promotor CAG ubicuo (AAVss-CAG-GFP). Tanto AAV-PHP.B como AAV9 produjeron virus con eficiencias similares (**FIG. 9B**). Se administraron genomas de vector (vg) de cualquier vector en una cantidad de  $1 \times 10^{12}$  a ratones de seis semanas de edad mediante inyección intravenosa. La transducción se evaluó mediante la expresión de GFP tres semanas más tarde. Los datos muestran que AAV-PHP.B transdujo todo el SNC del adulto con alta eficiencia, como se indica mediante imágenes de inmunohistoquímica de GFP (IHC) (**FIG. 5A**) o fluorescencia de eGFP nativa en varias regiones del cerebro (**FIG. 5B**), la médula espinal (**FIG. 5C**) y retina (**FIG. 5D**). Usando CLARITY basado en PARS para el aclaramiento de tejido corporal completo<sup>24</sup>, se detectó la fluorescencia de eGFP nativa a través de secciones aclaradas de tejido de la médula espinal (**FIG. 5C**), corteza y cuerpo estriado (**FIG. 5E**). Estas representaciones 3D demuestran la transducción del SNC amplia y eficiente con el vector AAV-PHP.B. Fuera del SNC, el tropismo a nivel celular de AAV-PHP.B y AAV9 parecía similar en varios órganos, con la excepción del páncreas donde la eficiencia de la transducción por AAV-PHP.B se redujo en comparación con AAV9 (**FIG. 5F**).
- [0157] Para cuantificar la eficacia de la transferencia génica para el SNC y órganos periféricos por AAV-PHP.B en comparación con AAV9, se midió el número de genomas virales presentes en varias regiones del cerebro y de los órganos 25 días después de la inyección (**FIG. 5G**). AAV-PHP.B proporcionó una transferencia de genes significativamente mayor que AAV9 a cada una de las regiones del SNC examinadas: corteza (40 veces), cuerpo estriado (92 veces), tálamo (76 veces), cerebro (41 veces) y médula espinal (75 veces). La biodistribución del genoma del vector fuera del SNC mostró que AAV-PHP.B transfirió genes al páncreas y la glándula suprarrenal de forma menos eficaz que AAV9 (**FIG. 5G**). No se encontraron diferencias significativas entre los dos vectores en hígado, corazón, músculo esquelético y riñones. Cuando se considera junto con los datos de biodistribución del SNC, en todas las áreas del SNC excepto el cerebro, el número de genomas virales detectados en ratones tratados con AAV-PHP.B fue similar al medido en el hígado, un órgano transducido eficazmente por AAV9<sup>21,25</sup>, y mayor que la observada en otros órganos. Por el contrario, la transferencia de genes mediada por AAV9 a cada una de las regiones del SNC examinadas fue al menos 120 veces menor que en el hígado. Por lo tanto, aunque el tropismo de AAV-PHP.B no es específico del SNC, las características mejoradas de transferencia génica de este vector son específicas del SNC.
- [0158] El AAV9 transduce preferentemente astrocitos cuando se administra por vía intravenosa a ratones adultos y primates no humanos, pero también transduce neuronas en varias regiones. Para examinar los tipos de células transducidos por AAV-PHP.B, se analizó la co-localización de GFP con varios marcadores de tipo celular. Debido a la transducción altamente eficiente, los astrocitos que expresan GFP individuales fueron difíciles de discernir en ratones que recibieron  $1 \times 10^{12}$  vg AAV-PHP.B (**FIG. 5A**), pero podrían identificarse más fácilmente morfológicamente por sus procesos compactos y altamente ramificados en animales que recibió 10 veces menos virus (**FIGS. 5A-5B**) y por co-localización con IHC para GFAP (**FIG. 6A**). Además de astrocitos, AAV-PHP.B transdujo CC1 + oligodendrocitos (**Fig. 6B**) y todos los subtipos neuronales examinados, incluyendo NeuN+ por todo el cerebro (**Fig. 6C**) así como neuronas dopamínergicas (TH)<sup>+</sup> de hidroxilasa de tirosina de mesencéfalo (**FIG. 6D**), calbindina+ células de Purkinje cerebelosas (**FIG. 6E**) y varias poblaciones de interneuronas (**FIGS. 10A-10D**). AAV-PHP.B también transdujo células endoteliales CD31 + (**FIG. 10E**) pero no pareció transducir microglía Iba1 + (**FIGS. 10F-10G**). La escasez de microglía de GFP<sup>+</sup> observada después de la administración intravenosa de AAV-PHP.B es consistente con informes previos de expresión génica mediada por AAV rara o inexistente en esta población celular<sup>14,27-30</sup>. Se observó fluorescencia de GFP nativa a partir de la expresión de la proteína GFP en todo el cerebro durante un año después de la administración de AAV-PHP.B, lo que sugiere que AAV-PHP.B puede proporcionar expresión transgénica dirigida al SNC a largo plazo (**FIG. 11**).
- [0159] A continuación, se cuantificó la fracción de varios tipos de células transducidas por AAV-PHP.B y se comparó con AAV9. Para facilitar el recuento de células individuales fiable, se construyó un vector que expresa una GFP nuclear localizada (NLS-GFP) bajo el control del promotor CAG, ssAAV-CAG-NLS-GFP. Una sola inyección de  $2 \times 10^{12}$  vg/ratón de ssAAVPHP.B: CAG-NLS-GFP transdujo la mayoría de los astrocitos Aldh1L1 + (**FIGS. 6F y 12A**) y neuronas NeuN+ (**FIGS. 6G y 12B**), así como una fracción modesta de células del linaje de oligodendrocitos Olig2+ (**FIGS. 6H y 12C**) en todas las regiones cerebrales examinadas. En todos los casos, AAV-PHP.B proporcionó una transducción significativamente mejorada en comparación con la misma dosis de AAV9. Notablemente, AAV-PHP.B también transducidas más del 94% de las neuronas motoras de Chat+ a lo largo de la médula espinal (**FIG. 3I**),  $91,4 \pm 1,6\%$  de neuronas dopamínergicas del mesencéfalo TH+ (**FIG. 12D**) y  $91,7 \pm 5,8\%$  de las células calbindina + Purkinje (*n* = 5). En

resumen, la administración intravenosa de AAV-PHP.B en adultos se dirige eficazmente a múltiples tipos de células neuronales y gliales en el ratón adulto.

**[0160]** El método utilizado para identificar AAV-PHP.B sólo selecciona por la transducción de la población de células diana; no necesariamente selecciona por especificidad. Sin embargo, en un ensayo separado en ratones GFAP-Cre, (después de dos rondas de selección *in vivo*) se identificó otra variante de la cápside de AAV, AAV-PHP.A. AAV-PHP.A contiene una secuencia de 7-mer, YTLSQGW (SEQ ID NO: 38), que exhibe una transducción de astrocitos del SNC más eficiente y selectiva (**FIGS. 7A-7D**), así como un tropismo reducido para el hígado (**FIGS. 7E-7F**) y otros órganos periféricos (**FIG. 7F**), en comparación con AAV9. El aumento en la especificidad para la transferencia de genes al SNC sobre el hígado proporcionado por AAV-PHP.A versus AAV9 es de 400 a 1200 veces, como resultado de una combinación de transferencia de genes del SNC en adultos mejorada (2,6 a 8 veces más dependiendo de la región específica) y reducción de la transferencia de genes hepáticos (152 veces). Otras dos variantes enriquecidas en este ensayo (**FIG. 9A**) no mostraron una expresión mejorada de GFP en neuronas del SNC o glía en comparación con AAV9.

**[0161]** Para determinar si AAV-PHP.A y AAV-PHP.B también pueden transducir células neurales humanas, estas variantes se ensayaron en neuronas y astrocitos corticales derivados de células madre pluripotentes inducidas por el hombre (hiPSCs) usando un método de diferenciación 3D. Las líneas de HiPSC de dos individuos se diferenciaron en estructuras similares a la corteza cerebral 3D (esferoides corticales) y se mantuvieron *in vitro* durante hasta 200 días. Los esferoides corticales envejecidos contienen neuronas excitadoras corticales de capa superficial y profunda y hasta un 20% de astrocitos<sup>31</sup>. En esferoides corticales disociados que fueron expuestos a los tres virus en monocapa, AAV-PHP.B transdujo de manera más eficiente tanto los astrocitos que expresan GFAP como las neuronas que expresan MAP2 en comparación con AAV9 o AAV-PHP.A (**FIG. 12**; ANOVA de dos vías  $p < 0,01$ ,  $n = 3$ ). Además, los tres virus fueron capaces de transducir esferoides corticales 3D intactos (**FIG. 5C**).

**[0162]** En dos ensayos para astrocitos de orientación, se identificaron las variantes AAV-PHP.B, B2, y B3 (**FIG. 9**). Estas variantes proporcionan una amplia transducción del SNC tanto de neuronas como de la glía, y AAV-PHP.A que proporciona una transducción de astrocitos selectivamente más eficiente. Se esperaba la identificación de cápsides con propiedades distintas del mismo esquema de selección dado que el método de recuperación utilizado se seleccionó para la transducción de astrocitos en lugar de para cualquier paso intermedio específico, por ejemplo, asociación vascular cerebral, transcitosis BBB o unión/internalización de astrocitos. Por lo tanto, las variantes de la cápside que son más eficientes en cualquiera de estos pasos intermedios deben recuperarse en el proceso de selección.

**[0163]** A través de la inmunotinción para cápsides se encontró que las cápsides de AAV-PHP, a diferencia de AAV9, fácilmente fueron localizadas a la vasculatura del cerebro poco después de la administración intravenosa (**FIGS. 14A-14B**). Además, 24 horas después de la administración, se observaron significativamente más células que expresan GFP a lo largo de la vasculatura cerebral de los ratones que recibieron AAV-PHP.B en comparación con los que recibieron AAV9 o AAV-PHP.A (**FIGS. 14C-14D**). Considerados junto con las características de transducción de AAV-PHP.B y AAV-PHP.A *in vivo* (**FIGS. 5A-5G, 6A-6I y 7A-7F**) y en cultivos neurales humanos (**FIGS. 13A-C**), estos datos sugieren que si bien ambos vectores AAV-PHP se asocian de manera más eficiente con la vasculatura cerebral, pueden diferir en la entrada o pasos de transporte específicos del tipo de célula subsiguiente.

Tabla 3

	Variante	Secuencia AA	Secuencia de nucleótidos	% del total	Características <i>in vivo</i>	producción
45	AAV PHP.B	TLAVPFK (SEQ ID NO: 40)	ACTTTGGCGGTGCCTT TAAG (SEQ ID NO: 74)	25,00%	Transducción amplia del SNC	Bien
50	AAV PHP.B2	SVSKPFL (SEQ ID NO: 41)	AGTGTGAGTAAGCCTTT TTTG (SEQ ID NO: 75)	11,76%	Transducción amplia del SNC	Bien
55	AAV PHP.B3	FTLTPPK (SEQ ID NO 42)	TTTACGTTGACGACGCC TAAG (SEQ ID NO: 76)	7,35%	Transducción amplia del SNC	Bien
60	AAV PHP.A	YTLSQGW (SEQ ID NO: 38)	TATACTTGTCCAGGG TTGG (SEQ ID NO: 77)	40,00%	Mayor selectividad de astrocitos	Pobre
65	G2A12	QAVRTSL (SEQ ID NO: 37)	CAGGCGGTTAGGACGT CTTTG (SEQ ID NO: 78)	33,33%	Similar a AAV9 en el cerebro	Excelente
	G2A15	LAKERLS (SEQ ID NO: 39)	CTTGCAGAGGAGCGGC TTTCG (SEQ ID NO: 79)	20,00%	Similar a AAV9 en el cerebro	Excelente

5 [0164] Usando CREATE, se desarrollaron nuevas variantes de AAV que permiten una transferencia génica generalizada eficiente al SNC del ratón adulto después de la administración intravenosa. Una ventaja importante de este sistema es que introduce presión selectiva para las cápsides que median el tráfico intracelular eficiente y la conversión del genoma viral monocatenario en formas persistentes de ADN bicatenario (dsADN) necesarias para la transducción a largo plazo (solo los genomas dsADN deben sirven como sustratos para Cre). Esta presión selectiva adicional para las cápsides funcionales puede haber contribuido a la identificación de AAVPHP.A y las variantes de AAV-PHP.B (descritas en este documento) en ensayos independientes después de sólo dos rondas de selección *in vivo*. En comparación, muchos métodos previos de selección de cápside de VAA *in vivo* e *in vitro* han aplicado de 3 a 10 rondas de selección para identificar variantes de cápside con propiedades mejoradas.

10 15 [0165] Sin desear quedar ligado por ninguna teoría particular, se cree que CREATE puede ser aplicado para descubrir la variantes de cápside AAV que se dirigen a tipos de células que expresan CRE definidas en cualquier órgano. Por lo tanto, puede usarse no solo en animales transgénicos, como se muestra aquí, sino también para desarrollar variantes de AAV que se dirigen a (i) tipos de células Cre<sup>+</sup> específicas en cultivos de esferoides o cultivos de organoides, (ii) células fabricadas con Cre<sup>+</sup> en cultivos no transgénicos animales mediante, por ejemplo, inyecciones virales que logran expresión de Cre basada en población, proyección33 o actividad o (iii) células humanas Cre<sup>+</sup> en animales químéricos humanos/de ratón. Dadas las diferencias de tropismo de AAV informadas entre modelos animales y humanos, los esquemas de selección que utilizan células Cre<sup>+</sup> humanas *in vivo*, la expresión de Cre específica de la célula en modelos celulares tridimensionales derivados de hiPSC o futuros títes transgénicos Cre pueden ser deseables para desarrollar vectores mejorados para aplicaciones clínicas aplicaciones. Además, el éxito de las terapias génicas basadas en AAV, especialmente las que requieren administración sistémica, puede verse obstaculizado por la presencia de anticuerpos neutralizantes de la cápside de AAV en la población humana. Al usar CREATE junto con la exposición de bibliotecas de AAV a sueros humanos combinados, uno podría imaginar la selección simultánea de cápsides con características de transducción retenidas o mejoradas que también son menos susceptibles a la neutralización mediada por anticuerpos.

20 25 30 [0166] CREATE también se puede usar con secuenciación de próxima generación para predecir mejor las características de las secuencias recuperadas antes de probar las variantes individualmente. La secuenciación del conjunto completo de variantes recuperadas de las células diana que expresan Cre, junto con la biblioteca de virus no seleccionada debería permitir la cuantificación del grado relativo de enriquecimiento de cada secuencia recuperada. Además, la secuenciación de las cápsides recuperadas de múltiples poblaciones que expresan o no expresan Cre podrían proporcionar un medio para realizar una selección tanto positiva como negativa en múltiples tipos de células en un solo experimento. Tales enfoques de selección *in vivo-in silico* deberían aumentar el poder de CREATE para mejorar la transferencia de genes al SNC y otras poblaciones de células difíciles de apuntar.

35 40 [0167] En el presente documento se describen nuevas secuencias de direccionamiento del SNC que se desarrollaron mediante el uso del método CREATE. En algunos casos, se elaboraron bibliotecas de ADN que tenían secuencias de inserción de 7 unidades entre los aminoácidos 588-599 de la proteína de la cápside AAV9. Después de crear bibliotecas de virus a partir de las bibliotecas de ADN, se utilizó el método CREATE para seleccionar y recuperar nuevas secuencias de cápside de AAV que transdijeron células que expresan Cre una semana después de la administración. Las variantes recuperadas del proceso de selección se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4

	Nombre	Secuencia AA	% de clones recuperados	Fenotipo
45	PHP.A	YTLSQGW (SEQ ID NO: 38)	40,0%	Transducción de astrocitos mejorada, producción deficiente de virus, transducción periférica reducida
50	PHP.S	QAVRTSL (SEQ ID NO: 37)	33,3%	Transducción mejorada de neuronas periféricas y miocitos cardíacos, similar a AAV9 dentro del SNC
55	G2A3	LAKERLS (SEQ ID NO: 39)	20,0%	Transducción de SNC mejorada de AAV9 similar, transducción amplia
60	PHP.B	TLAVPK (SEQ ID NO: 40)	25,0%	Fuera del SNC (similar a AAV9)
	PHP.B2	SVSKPFL (SEQ ID NO: 41)	10,0%	Transducción mejorada del SNC
	PHP.B3	FTLTTPK (SEQ ID NO 42)	7,5%	Transducción mejorada del SNC
	G2B4	MNSTKNV (SEQ ID NO: 43)	5,0%	Similar a AAV9
	G2B5	VSGGHHS (SEQ ID NO: 44)	2,5%	Similar a AAV9

65 [0168] Se utilizó CREATE para determinar la transducción de tres poblaciones del SNC: GFAP-Cre (astrocitos), Vgat-IRES-Cre (neuronas GAGAérgicas) y Vglut2-IRES-Cre (un subconjunto de neuronas glutamatérgicas). Después de que se aisló el ADN de los cerebros y la médula espinal, las variantes recuperadas se evaluaron mediante secuenciación

clonal y/o de próxima generación después de 2 rondas de selección. Este enfoque ha llevado a la identificación de vectores que exhiben una transducción eficiente del SNC (ver **Tabla 5**). Se encontró que varios vectores identificados eran más efectivos en la transducción del SNC que PHP.B, por ejemplo PHP.B-DGT (PHP.N), PHP.B-EST y PHP.BATT-T.

5

**Tabla 5**

	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia AA</b>	<b>SEQ ID NO.</b>	<b>Observación</b>
10	PHP.B-DGT (PHP.N)	DGTLA VPFKAQ	SEQ ID NO: 4	tropismo amplio del SNC, fuerte transducción del SNC
	PHP.B-EST	ESTLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 5	Fuerte transducción del SNC, especialmente fuerte en astrocitos y células de Purkinje.
15	PHP.B-GGT	GGTLA VPFKAQ	SEQ ID NO: 6	Fuerte transducción del SNC
	PHP.B-ATP	AQTLA TPFKAQ	SEQ ID NO: 7	Fuerte transducción del SNC
20	PHP.B-ATT-T	ATTLATPFKAQ	SEQ ID NO: 8	fuerte transducción del SNC
	PHP.B-DGT-T	DGTLA TPFKAQ	SEQ ID NO: 9	Fuerte transducción del SNC
25	PHP.B-GGT-T	GGTLA TPFKAQ	SEQ ID NO: 10	Fuerte transducción del SNC
	PHP.B-SGS	SGSLAVPFKAQ	SEQ ID NO: 11	Fuerte transducción del SNC
30	PHP.B-AQP	AQTLAQPFKAQ	SEQ ID NO: 12	Fuerte transducción del SNC
	PHP.B-QQP	AQTLQQPFKAQ	SEQ ID NO: 13	Fuerte transducción del SNC
35	PHP.B -SNP (3)	AQTLSNPFKAQ	SEQ ID NO: 14	Fuerte transducción del SNC
	PHP.B-SNP	AQTLA VPFSNP	SEQ ID NO: 15	Fuerte tropismo del SNC con alta especificidad por neuronas

**Ejemplo 3**Método de elaboración de variantes de AAV-PHP.B para la transducción eficaz de neuronas y glía del SNC

[0169] El péptido de 7-mer de AAV-PHP.B y las secuencias flanqueantes evolucionaron adicionalmente mediante mutagénesis de saturación de sitio de tres aminoácidos consecutivos (véase **FIG 13**). Las cinco bibliotecas de saturación (XXX1-XXX5) se generaron mediante PCR, se mezclaron en cantidades iguales y se utilizaron para generar ADN. El ADN se utilizó para generar las bibliotecas de cápsides de AAV. Usando CREATE, se realizaron selecciones en paralelo para la transducción de tres poblaciones del SNC: GFAP-Cre (astrocitos), Vgat-IRES Cre (neuronas GABAérgicas) y Vglut2-IRES-Cre (un subconjunto de neuronas glutamatérgicas). El ADN se aisló del cerebro y la médula espinal. Las variantes recuperadas se evaluaron mediante secuenciación clonal y/o de próxima generación después de 2 rondas de selección. Este enfoque ha llevado a la identificación de vectores adicionales que exhiben una transducción eficaz del SNC (véanse las **Tablas 3 y 4**). Las secuencias se eligieron para la validación individual en función de uno o más de los siguientes criterios (i) la frecuencia con la que cada variante está presente después de dos rondas de selección (es probable que las secuencias presentes en frecuencias más altas se hayan enriquecido durante la selección *in vivo*), (ii) la presencia de múltiples variantes de secuencia de ácido nucleico que codifican la misma secuencia de aminoácidos, y (iii) enriquecimiento observado en comparación con la biblioteca de virus.

**Ejemplo 4**Fabricación de variantes de AAV-PHP.B

[0170] AAV-PHP.B 7-mer (SEQ ID NO: 40) fue aleatorizado parcialmente para hacer variantes correspondientes a través de la superposición de sustitución de 3 aminoácidos de la secuencia de 7-mer y los 2 aminoácidos que flanquean el 7-mer con aminoácidos aleatorios. Se muestra en la **FIG. 21** una descripción general de la estrategia para hacer variantes de AAV-PHP.B.

[0171] Después de dos rondas de selección, la secuencia DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4) fue elegida para la caracterización. La secuencia DGTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 4) se seleccionó independientemente de 2 secuencias de aminoácidos diferentes: (i) GAT GGG ACT TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (SEQ ID NO: 54) y (ii) GAT GGG ACG TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (SEQ ID NO: 55).

**[0172]** En algunos casos, se insertó una secuencia de (7-mer) 7AA entre los aminoácidos 588 a 589 de la proteína de cápside AAV9. La inserción de 7-mer AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 37) tiene la siguiente secuencia de 7 mer: QAVRTSL (SEQ ID NO. 37). Se seleccionó de la secuencia de nucleótidos: CAG GCG GTT AGG ACG TCT TTG (SEQ ID NO 56).

5    Ejemplo 5

Caracterización de AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) y AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47)

**[0173]** Este ejemplo proporciona una caracterización adicional de dos variantes de AAV, AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) y AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47). AAV-PHP.N se diferencia de AAV-PHP.B por dos sustituciones de aminoácidos (A587D y Q588G). La cápside de AAV-PHP.B mostró una mayor eficiencia en la entrega de genes a varias poblaciones de neuronas del SNC en comparación con la cápside de AAV-PHP.N, que puede permitir la transferencia de genes a una mayor fracción de células o altas tasas de transducción con dosis más bajas de virus.

**[0174]** Para evaluar cuantitativamente la eficacia de la transducción de AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) y AAV-PHP.B, se les inyectaron a ratones adultos jóvenes por vía intravenosa  $1 \times 10^{11}$  vg de AAV-CAG-NLS-GFP monocatenario (ss) empaquetado en AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) o AAV-PHP.B (**FIGS. 23A-E**). Tres semanas después de la administración, se evaluó la fracción de células DAPI+ que expresaban GFP nuclear localizada en la corteza y el cuerpo estriado. AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) transdujo una fracción significativamente mayor de células DAPI + en la corteza que AAV-PHP.B (**FIGS. 24A, 24D**). Se observó una tendencia similar en el cuerpo estriado ( $p = 0,054$ ). A continuación, se determinó el porcentaje de neuronas transducidas por cada vector en la corteza y el cuerpo estriado (NeuN+) y neuronas de Purkinje en el cerebelo (Calbindin<sup>+</sup>) (**FIGS. 24B, 24E**). AAV-PHP.N proporcionó una transducción de neuronas significativamente más eficiente en cada región. En apoyo adicional de la mayor eficiencia de transducción por AAV-PHP.N en comparación con AAV-PHP.B, se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de GFP por célula (media de la intensidad media de fluorescencia de GFP por núcleo) en los cerebros de ratones que recibieron AAV-PHP.N (SEQ ID NO: 46) (**FIG. 24G**).

Ejemplo 6

Cuantificación de transducción por AAV-PHP.S

**[0175]** El AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47) de la cápside proporciona transducción eficaz de las neuronas sensoriales periféricas en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) y en los órganos viscerales incluyendo el sistema nervioso entérico. Se examinó la eficacia de la transducción de neuronas periféricas con AAV-PHP.S (SEQ ID NO: 47) en comparación con AAV9 (SEQ ID NO: 45). Se usaron AAVPHP.S y AAV9 para empaquetar el mismo genoma ss AAV-CAG-NLS-GFP usado anteriormente y los virus se inyectaron por vía intravenosa en ratones adultos jóvenes a una dosis de  $1 \times 10^{12}$  vg. Tres semanas más tarde se determinó el porcentaje de neuronas PGP9,5<sup>+</sup> DRG transducidas por ambos vectores. En ratones que recibieron AAV-PHP.S, se observó un aumento significativo tanto en el porcentaje de células PGP9,5<sup>+</sup> que expresaban GFP nuclear como un aumento significativo en la expresión de GFP (medida por la intensidad de fluorescencia) por célula. Además, la intensidad media de GFP en las células dentro de los ganglios cardíacos también aumentó en relación con AAV9 (**FIGS. 24A-G**).

**[0176]** Sin desear quedar ligado por ninguna teoría particular, se cree que AAV-PHP.S es útil para el estudio y el tratamiento de una variedad de enfermedades y lesiones, incluyendo pero no limitado a la ataxia de Friedreich, insuficiencia cardíaca, enfermedad isquémica del corazón, hipertrofia cardiaca, dolor crónico y lesión de nervios periféricos.

Ejemplo 7

Método de tratamiento usando péptidos dirigidos

**[0177]** Se identifica un sujeto que tiene un trastorno que puede tratarse mediante la aplicación de un ácido nucleico para expresarse dentro de un sujeto. A continuación, se administra al sujeto una primera cantidad de un vector de AAV que incluye el polinucleótido que se va a expresar. El polinucleótido codifica una proteína terapéutica. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento que comprende, o consta de, cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir el direccionamiento adecuado de la proteína para expresarse en el sistema apropiado dentro del sujeto. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se exprese en el sujeto en el sistema apropiado una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína a expresar.

Ejemplo 8

Método de tratamiento de la enfermedad de Huntington

**[0178]** Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Huntington. A continuación, se administra al sujeto una primera cantidad de un vector de AAV que incluye el polinucleótido que se va a expresar. El polinucleótido codifica una proteína

terapéutica. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir que se exprese la dirección adecuada de la proteína al sistema nervioso dentro del sujeto. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se exprese una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína a expresar dentro del sujeto en el sistema nervioso.

5

Ejemplo 9Método de tratamiento de la enfermedad de Huntington

10

**[0179]** Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Huntington. Luego, al sujeto se le administra una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido que codifica un ARN pequeño no codificante (ARN en horquilla pequeño (shARN) o microARN (miARN)) configurado para reducir la expresión de la proteína Huntingtin por su secuencia. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir el direccionamiento adecuado de dicho polinucleótido al sistema nervioso. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que una cantidad terapéuticamente eficaz del pequeño ARN no codificante se expresa en el sujeto en el sistema nervioso.

15

Ejemplo 10

20

Método de Tratamiento de la enfermedad de Huntington

25

**[0180]** Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Huntington. Despues, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido que codifica una proteína de dedo de zinc (ZFP) diseñada para reprimir la transcripción del gen Huntingtin (HTT). El vector AAV incluirá una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir la dirección adecuada de la ZFP al sistema nervioso, entre otros órganos. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de ZFP.

30

Ejemplo 11Método de la enfermedad de Huntington

35

**[0181]** Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Huntington. Luego, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido que codifica un ARN pequeño no codificante (ARN en horquilla pequeña (shARN) o microARN (miARN)) diseñado por un experto en la técnica para reducir la expresión de la proteína Huntingtin. El vector AAV incluirá una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir la dirección adecuada del polinucleótido al sistema nervioso, entre otros órganos. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que una cantidad terapéuticamente eficaz del pequeño ARN no codificante se expresa en el sujeto en el sistema nervioso.

40

Ejemplo 12

45

Método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

50

**[0182]** Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer. A continuación, se administra al sujeto una primera cantidad de un vector de AAV que incluye un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-Abeta o fragmentos de anticuerpo. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir la dirección adecuada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para expresarse al sistema nervioso. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se exprese en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

55

Ejemplo 13Método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

60

**[0183]** Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer. A continuación, se administra al sujeto una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido que codifica una proteína apolipoproteína E (ApoE), preferiblemente el polipéptido apoE humano apoE2 o una variante modificada de apoE2. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir la dirección adecuada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para expresarse al sistema nervioso. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína ApoE.

Ejemplo 14Método de tratamiento de AMS

- 5 [0184] Se identifica un sujeto que tiene la atrofia muscular espinal (AMS). A continuación, se administra al sujeto una primera cantidad de un vector de AAV que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de la neurona motora de supervivencia 1 (SMN1). El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir que se dirija correctamente la proteína SMN expresada al sistema nervioso. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína SMN.

Ejemplo 1515 Método de tratamiento de Ataxia de Friedreich

- 20 [0185] Se identifica un sujeto que tiene la ataxia de Friedreich. Después, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector de AAV que incluye un polinucleótido que codifica una proteína frataxina. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir que se dirija correctamente la proteína frataxina expresada al sistema nervioso y al corazón, entre otros órganos. Si es necesario, al sujeto se le administra una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso y el corazón una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína frataxina.

25 Ejemplo 16Método de tratamiento de la enfermedad de Pompe

- 30 [0186] Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Pompe. Después, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector de AAV que incluye un polinucleótido que codifica una proteína alfa-glucosidasa (GAA) ácida. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir que se dirija correctamente la proteína GAA expresada al sistema nervioso y al corazón, entre otros órganos. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso y el corazón una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína GAA.

Ejemplo 1740 Método de tratamiento de ceroidolipofuscinosis neuronal infantil tardía

- 45 [0187] Se identifica un sujeto que tiene ceroidolipofuscinosis infantil tardía (LINCL). Después, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido CLN2 que codifica la proteína tripeptidil peptidasa 1. El vector incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir el direccionamiento adecuado de la proteína tripeptidil peptidasa 1 a expresarse en el sistema nervioso. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína tripeptidil peptidasa 1.

50 Ejemplo 18Método de tratamiento de la enfermedad de Batten

- 55 [0188] Se identifica un sujeto que tiene la forma juvenil NCL de la enfermedad de Batten. A continuación, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido CLN3 que codifica la proteína battenina. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir el direccionamiento adecuado de la proteína battenina, expresado al sistema nervioso. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína battenina.

60 Ejemplo 19Método de tratamiento de la enfermedad de Canavan

- 65 [0189] Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Canavan. A continuación, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido ASPA que codifica la proteína

aspartoacilasa. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir que se dirija correctamente la proteína aspartoacilasa expresada al sistema nervioso. Si es necesario, al sujeto se le administra una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína aspartoacilasa.

Ejemplo 20

Método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson

[0190] Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Parkinson. Después, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de uno o más vectores de AAV que cada uno incluye uno o más polinucleótidos que codifican una enzima o enzimas necesarias para el aumento de la producción de dopamina a partir de células no dopaminérgicas. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir la dirección adecuada de dicha(s) enzima(s) para expresarse al sistema nervioso. Si es necesario, al sujeto se le administra una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de la(s) enzima(s).

Ejemplo 21

Método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson

[0191] Se identifica un sujeto que tiene la enfermedad de Parkinson. Después, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido que codifica una forma modificada, resistente a la agregación de proteína alfa-sinucleína que reduce la agregación de alfa-sinucleína endógena. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesto por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir el direccionamiento adecuado de la proteína de alfa-sinucleína resistente a agregación que se va a expresar en el sistema nervioso. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína.

Ejemplo 22

Método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica o demencia frontal

[0192] Se identifica un sujeto que tiene esclerosis lateral amiotrófica o demencia frontal causada por una mutación en C9ORF72. A continuación, se administra al sujeto una primera cantidad de un vector de AAV que incluye un polinucleótido que codifica un ARN no codificante que reduce los focos de ARN nuclear provocados por la expansión de hexanucleótidos (GGGGCC) en las células de los sujetos. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesto por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir el direccionamiento adecuado de ARN(s) para expresarse al sistema nervioso. Si es necesario, al sujeto se le administra una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se exprese en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz de ARN(s).

Ejemplo 23

Método de tratamiento de la esclerosis múltiple

[0193] Se identifica un sujeto que tiene esclerosis múltiple. A continuación, al sujeto se le administra sistémicamente una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido que codifica un factor trófico o inmunomodulador, por ejemplo, factor inhibidor de leucemia (LIF) o factor eurotrófico ciliar (CNTF). El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye un protón de péptido de direccionamiento compuesto por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir que el direccionamiento adecuado de dicho factor sea expresado al sistema nervioso. Si es necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que se expresa al sujeto en el sistema nervioso una cantidad terapéuticamente eficaz del factor.

Ejemplo 24

Método de tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

[0194] Se identifica un sujeto que tiene la esclerosis lateral amiotrófica causada por mutación SOD1. A continuación, se administra al sujeto una primera cantidad de un vector AAV que incluye un polinucleótido que codifica un ARN pequeño no codificante (ARN en horquilla pequeño (shARN) o microARN (miARN)) diseñado por un experto en la técnica para reducir la expresión de proteína SOD1 mutante. El vector AAV incluye una proteína de la cápside que incluye una porción de péptido de direccionamiento compuesta por cualquiera de las SEQ ID NO: 1-44, 48-53, 65-68 y 74-93, para permitir el direccionamiento adecuado de los ARN pequeños no codificantes que se expresará en el sistema nervioso. Si es

necesario, se administra al sujeto una segunda o tercera dosis del vector, hasta que una cantidad terapéuticamente eficaz del pequeño ARN no codificante se expresa en el sujeto en el sistema nervioso.

5       **[0195]** La especificación escrita anterior se considera suficiente para que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La descripción y los ejemplos anteriores detallan ciertas realizaciones preferidas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que no importa cuán detallado pueda aparecer en el texto lo anterior, la invención se puede poner en práctica de muchas formas y la invención debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de las mismas.

10      **[0196]** En al menos algunas de las realizaciones descritas anteriormente, uno o más elementos utilizados en una forma de realización pueden indistintamente ser utilizados en otra realización a menos que dicha sustitución no es técnicamente factible. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar otras diversas omisiones, adiciones y modificaciones a los métodos y estructuras descritos anteriormente sin apartarse del alcance de la materia reivindicada. Todas estas modificaciones y cambios están destinados están dentro del alcance del tema en cuestión, según se define en las 15 reivindicaciones adjuntas.

20      **[0197]** Con respecto a la utilización de sustancialmente cualesquiera términos plurales y/o singulares del presente documento, los expertos en la técnica pueden traducir del plural al singular y/o del singular al plural, como es apropiado para el contexto y/o aplicación. Las diversas permutaciones de singular/plural pueden establecerse expresamente en este documento por motivos de claridad.

25      **[0198]** Los expertos en la técnica entenderán que, en general, los términos usados en este documento, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (p. ej., los cuerpos de las reivindicaciones adjuntas) generalmente se entienden como términos "abiertos" (p. ej., el término "incluye" debe interpretarse como "incluye pero no se limita a", el término "tener" debe interpretarse como "tener al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye pero no se limita a", etc.). Los expertos en la técnica entenderán además que si se pretende un número específico de una recitación de reivindicación introducida, dicha intención se recitará explícitamente en la reivindicación y, en ausencia de dicha recitación, dicha intención no está presente. Por ejemplo, como ayuda para la comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de las frases introductorias "al menos uno" y "uno o más" para presentar las descripciones de las 30 reivindicaciones. Sin embargo, el uso de tales frases no debe interpretarse en el sentido de que la introducción de una recitación de reivindicación por los artículos indefinidos "un" o "una" limita cualquier reivindicación particular que contenga dicha recitación de reivindicación introducida a realizaciones que contengan solo una de dichas declaraciones, incluso cuando la misma reivindicación incluye las frases introductorias "uno o más" o "al menos uno" y artículos indefinidos como "un" o "una" (p. ej., "un" y/o "una" debe interpretarse como "al menos uno" o "uno o más"); lo mismo es válido para el uso 35 de artículos definidos utilizados para introducir recitaciones de reclamaciones. Además, incluso si un número específico de una recitación de reivindicación introducida se recita explícitamente, los expertos en la técnica reconocerán que tales recitación debe interpretarse en el sentido de al menos el número recitado (p. ej., la recitación desnuda de "dos recitaciones," sin otros modificadores, significa al menos dos recitaciones, o dos o más recitaciones). Además, en aquellos casos en los que una convención análoga a "al menos uno de A, B y C, etc." se utiliza, en general, dicha construcción 40 está pensada en el sentido en que un experto en la técnica entendería la convención (p. ej., "un sistema que tiene al menos uno de A, B y C" incluiría, entre otros, sistemas que tienen A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). En aquellos casos en los que una convención análoga a "al menos uno de A, B o C, etc." se utiliza, en general, dicha construcción está pensada en el sentido en que un experto en la técnica entendería la convención (p. ej., "un sistema que tenga al menos uno de A, B o C" incluiría, entre otros, sistemas que tienen A solo, B 45 solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). Los expertos en la técnica entenderán además que prácticamente cualquier palabra y/o frase disyuntiva que presente dos o más términos alternativos, ya sea en la descripción, reivindicaciones, o dibujos, debe entenderse que contemplan las posibilidades de incluir uno de los términos, cualquiera de los términos o ambos términos. Por ejemplo, se entenderá que la frase "A o B" incluye las posibilidades de "A" o "B" o "A y B".

50      **[0199]** Además, cuando se describen características o aspectos de la divulgación en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la descripción también se describe de este modo en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

55      **[0200]** Como se entenderá por un experto en la técnica, por cualquier y todos los fines, como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos en este documento también abarcan cualquier y todos los subintervalos y combinaciones de subintervalos posibles de los mismos. Cualquier intervalo enumerado se puede reconocer fácilmente como suficientemente describir y permitir que el mismo rango se desglose en por lo menos mitades iguales, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como un ejemplo no limitante, cada rango discutido en la presente memoria se puede romper fácilmente hacia abajo en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la técnica, todos los lenguajes tales como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que" y similares incluyen el número mencionado y se refieren a rangos que se pueden dividir posteriormente en subintervalos como se discutió anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la técnica, una gama incluye cada miembro individual. Así, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 artículos. De manera similar, un grupo que tiene de 1 a 5 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 artículos, etc.

**[0201]** Aunque diversos aspectos y realizaciones se han descrito en este documento, otros aspectos y realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los diversos aspectos y realizaciones descritos en este documento tienen el propósito de ilustrar y no pretenden ser limitantes, estando indicado el alcance real por las siguientes reivindicaciones.

## 5 LISTA DE SECUENCIAS

**[0202]**

10 <110> Instituto de Tecnología de California  
 Deverman, Benjamin E.  
 Gradinaru, Viviana  
 Chan, Ken Y.

15 <120> PÉPTIDOS DIRIGIDOS PARA DIRIGIR VIRUS ADENOASOCIADOS (AAV)

20 <130> CALTE.118WO

<150> 62/266184  
 <151> 2015-12-11

25 <150> 62/421891  
 <151> 2016-11-14

<160> 93

30 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> PHP.B

<400> 1

40 Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
           1                  5                         10

45 <210> 2  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> PHP.B2

<400> 2

55 Ala Gln Ser Val Ser Lys Pro Phe Leu Ala Gln  
           1                  5                         10

60 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> PHP.B3

ES 2 869 284 T3

<400> 3

5           Ala Gln Phe Thr Leu Thr Thr Pro Lys Ala Gln  
          1                 5                           10

10          <210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15          <220>

<223> PHP.N/PHP.B-DGT

<400> 4

20          Asp Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
          1                 5                           10

25          <210>5

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30          <220>

<223> PHP.B-EST

<400> 5

35

          Glu Ser Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
          1                 5                           10

40

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PHP.B-GGT 3387

50

<400> 6

55

          Gly Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
          1                 5                           10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

60

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PHP.B-ATP

65

<400> 7

Ala Gln Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

5

<210> 8  
 <211> 11

10

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-ATT-T  
  
 15                  <400> 8

20

Ala Thr Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

25

<210> 9  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-DGT-T  
  
 30                  <400> 9

35

Asp Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

40

<210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-GGT-T  
  
 45                  <400> 10

50

Gly Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

55

<210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60                  <220>  
 <223> PHP.B-SGS  
  
 <400> 11  
  
 65

Ser Gly Ser Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
                   1                      5                      10

5

<210> 12  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-AQP

15

&lt;400&gt; 12

Ala Gln Thr Leu Ala Gln Pro Phe Lys Ala Gln  
                   1                      5                      10

20

<210> 13  
 <211> 11  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B -QQP  
 30 <400> 13

35

Ala Gln Thr Leu Gln Gln Pro Phe Lys Ala Gln  
                   1                      5                      10

40

<210> 14  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-SNP (3)  
 45 <400> 14

50

Ala Gln Thr Leu Ser Asn Pro Phe Lys Ala Gln  
                   1                      5                      10

55

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-SNP  
  
 <400> 15

65

Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Ser Asn Pro  
 1                   5                   10

5

<210> 16  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-QGT  
  
 15 <400> 16

Gln Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

20

<210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-NQT  
  
 30 <400> 17

Asn Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

35

<210> 18  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-EGS  
  
 45 <400> 18

Glu Gly Ser Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

50

<210> 19  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> PHP.B-SGN  
  
 60 <400> 19

Ser Gly Asn Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

65

<210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> PHP.B-EGT

10 <400> 20

Glu	Gly	Thr	Leu	Ala	Val	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln
1										
					5					
									10	

15

<210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> PHP.B-DST

25 <400> 21

Pro	His	Pro	Asx	Asp	Ser	Thr
1						
					5	

30

<210> 22  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> PHP.B-DST

40 <400> 22

Ala	Val	Thr	Leu	Ala	Val	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln
1										
					5					
									10	

45

<210> 23  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> PHP.B-STP

55 <400> 23

Ala	Gln	Thr	Leu	Ser	Thr	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln
1										
					5					
									10	

60

<210> 24  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> PHP.B-PQP

<400> 24

5

Ala Gln Thr Leu Pro Gln Pro Phe Lys Ala Gln  
1 5 10

10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> PHP.B-SQP

<400> 25

20

Ala Gln Thr Leu Ser Gln Pro Phe Lys Ala Gln  
1 5 10

25

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> PHP.B-QLP

<400> 26

35

Ala Gln Thr Leu Gln Leu Pro Phe Lys Ala Gln  
1 5 10

40

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> PHP.B-TMP

<400> 27

50

Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln  
1 5 10

55

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> PHP.B-TTP

<400> 28

65

Ala Gln Thr Leu Thr Thr Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

5

<210> 29  
<211> 11  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> PHP.A  
  
15 <400> 29

Ala Gln Tyr Thr Leu Ser Gln Gly Trp Ala Gln  
 1                   5                   10

20

<210> 30  
<211> 11  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
  
30 <400> 30

Ala Gln Met Asn Ala Thr Lys Asn Val Ala Gln  
 1                   5                   10

35

<210> 31  
<211> 11  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
  
45 <400> 31

Ala Gln Val Ser Gly Gly His His Ser Ala Gln  
 1                   5                   10

50

<210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
  
60 <400> 32

Ala Gln Thr Leu Pro Gln Pro Phe Lys Ala Gln  
 1                   5                   10

65

<210> 33  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> PHP.B-ATP

<400> 33

10

**Ala Gln Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln**  
                   1                     5                         10

15

<210> 34  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

<400> 34

25

**Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln**  
                   1                     5                         10

30

<210> 35  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

<400> 35

40

**Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln**  
                   1                     5                         10

45

<210> 36  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

<400> 36

55

**Ala Gln Thr Leu Ser Lys Pro Phe Lys Ala Gln**  
                   1                     5                         10

60

<210> 37  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> AAV-PHP.S

<400> 37

5

Gln Ala Val Arg Thr Ser Leu  
1 5

10

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> PHP.A

<400> 38

20

Tyr Thr Leu Ser Gln Gly Trp  
1 5

25

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> G2A3

<400> 39

35

Leu Ala Lys Glu Arg Leu Ser  
1 5

40

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> PHP.B

<400> 40

50

Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys  
1 5

55

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> PHP.B2

<400> 41

65

**Ser Val Ser Lys Pro Phe Leu**  
**1**                                  **5**

5

<210> 42  
<211> 7  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> PHP.B3  
  
15 <400> 42

**Phe Thr Leu Thr Thr Pro Lys**

20

**1**                                  **5**

25 <210> 43  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
30 <220>  
<223> G2B4  
  
<400> 43

**Met Asn Ser Thr Lys Asn Val**  
**1**                                  **5**

40 <210> 44  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
45 <220>  
<223> G2B5  
  
<400> 44

**Val Ser Gly Gly His His Ser**  
**1**                                  **5**

55 <210> 45  
<211> 736  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
60 <220>  
<223> AAV9 Secuencia de cápside  
  
<400> 45

65

## ES 2 869 284 T3

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

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 869 284 T3

	195	200	205
	Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser		
	210	215	220
5	Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile		
	225	230	235
	Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu		
	245	250	255
	Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn		
10	260	265	270
	Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg		
	275	280	285
	Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn		
	290	295	300
15	Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile		
	305	310	315
	Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn		
	325	330	335
	Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu		
20	340	345	350
	Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro		
	355	360	365
	Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp		
	370	375	380
25	Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe		
	385	390	395
	Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu		
	405	410	415
	Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu		
	420	425	430
30	Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser		
	435	440	445
	Arg Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser		
	450	455	460
	Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro		
35	465	470	475
	Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn		
	485	490	495
	Asn Asn Ser Glu Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn		
	500	505	510
40	Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys		
	515	520	525
	Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly		
	530	535	540
	Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile		
45	545	550	555
	Thr Asn Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser		
	565	570	575
	Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln		
	580	585	590
50	Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln		
	595	600	605
	Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His		
	610	615	620
	Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met		
55	625	630	635
	Lys His Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala		
	645	650	655
	Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr		
	660	665	670
60	Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln		
	675	680	685
	Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn		
	690	695	700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val  
 705 710 715 720  
 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 725 730 735

5

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 743

&lt;212&gt; PRT

10

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; AAV-PHP.N Secuencia de cápside VP1

15

&lt;400&gt; 46

	Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser	
	1 5 10 15	
20	Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro	
	20 25 30	
	Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro	
	35 40 45	
25	Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro	
	50 55 60	
	Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp	
	65 70 75 80	
	Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala	
	85 90 95	
30	Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly	
	100 105 110	
	Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro	
	115 120 125	
	Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg	
	130 135 140	
35	Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly	
	145 150 155 160	
	Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr	
	165 170 175	
40	Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro	
	180 185 190	
	Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly	
	195 200 205	
	Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser	
	210 215 220	
45	Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile	
	225 230 235 240	
	Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu	
	245 250 255	
50	Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn	
	260 265 270	
	Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg	
	275 280 285	
	Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn	
	290 295 300	
55	Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile	
	305 310 315 320	
	Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn	
	325 330 335	
60	Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu	
	340 345 350	
	Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro	
	355 360 365	
	Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp	
	370 375 380	

65

## ES 2 869 284 T3

	Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe			
385	390	395	400	
	Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu			
	405	410	415	
5	Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu			
	420	425	430	
	Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser			
	435	440	445	
10	Arg Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser			
	450	455	460	
	Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro			
	465	470	475	480
	Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn			
	485	490	495	
15	Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn			
	500	505	510	
	Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys			
	515	520	525	
20	Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly			
	530	535	540	
	Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile			
	545	550	555	560
	Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser			
	565	570	575	
25	Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Asp Gly Thr Leu Ala Val			
	580	585	590	
	Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile			
	595	600	605	
30	Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro			
	610	615	620	
	Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro			
	625	630	635	640
	Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile			
	645	650	655	
35	Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp			
	660	665	670	
	Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val			
	675	680	685	
40	Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro			
	690	695	700	
	Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe			
	705	710	715	720
	Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr			
	725	730	735	
45	Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu			
	740			

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 743

50 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

55 &lt;223&gt; AAV-PHP.S Secuencia de cápside VP1

&lt;400&gt; 47

	Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asn Leu Ser			
60	1	5	10	15
	Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro			
	20	25	30	
	Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro			
	35	40	45	

	Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
	50	55	60	
5	Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
	65	70	75	80
	Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala			
	85	90	95	
	Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
	100	105	110	
10	Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro			
	115	120	125	
	Leu Gly Leu Val Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
	130	135	140	
	Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly			
	145	150	155	160
15	Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr			
	165	170	175	
	Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro			
	180	185	190	
20	Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly			
	195	200	205	
	Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser			
	210	215	220	
	Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile			
	225	230	235	240
25	Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
	245	250	255	
	Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn			
	260	265	270	
30	Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg			
	275	280	285	
	Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn			
	290	295	300	
	Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile			
	305	310	315	320
35	Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn			
	325	330	335	
	Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu			
	340	345	350	
40	Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro			
	355	360	365	
	Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp			
	370	375	380	
	Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe			
	385	390	395	400
45	Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu			
	405	410	415	
	Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu			
	420	425	430	
	Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser			
	435	440	445	
50	Arg Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser			
	450	455	460	
	Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro			
	465	470	475	480
55	Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn			
	485	490	495	
	Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn			
	500	505	510	
	Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys			
	515	520	525	
60	Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly			
	530	535	540	
	Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile			

	545	550	555	560
	Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser			
	565	570	575	
5	Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Gln Ala Val Arg			
	580	585	590	
	585	595	600	605
10	Thr Ser Leu Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile			
	605	610	615	620
	Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro			
	620	625	630	635
15	Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro			
	635	640		
	Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile			
	640	645	650	655
20	Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp			
	655	660	665	670
	670	675	680	685
	Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro			
	685	690	695	700
25	Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe			
	700	705	710	715
	715	720		
	Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr			
	720	725	730	735
	735	Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu		
	740			

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

30 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia de aminoácidos sintéticos

35 &lt;400&gt; 48

Ser	Ala	Gln	Thr	Leu	Ala	Val	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln
1				5						10	

40

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

45 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia de aminoácidos sintéticos

50 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 2-4  
<223> Xaa = cualquier aminoácido

55 &lt;400&gt; 49

Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Ala	Val	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln
1				5						10	

60

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

65 &lt;213&gt; Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

5           <220>  
               <221> VARIANTE  
               <222> 4-6  
               <223> Xaa = cualquier aminoácido

10          <400> 50

**Ser Ala Gln Xaa Xaa Xaa Val Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln**  
               1                           5                                   10

15          <210> 51  
               <211> 14  
               <212> PRT  
               <213> Secuencia artificial

20          <220>  
               <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
  
 25          <220>  
               <221> VARIANTE  
               <222> 6-8  
               <223> Xaa = cualquier aminoácido  
  
 30          <400> 51

**Ser Ala Gln Thr Leu Xaa Xaa Xaa Phe Lys Ala Gln Ala Gln**  
               1                           5                                   10

35          <210> 52  
               <211> 14  
               <212> PRT  
               <213> Secuencia artificial

40          <220>  
               <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

45          <220>  
               <221> VARIANTE  
               <222> 8-10  
               <223> Xaa = cualquier aminoácido

50          <400> 52

**Ser Ala Gln Thr Leu Ala Val Xaa Xaa Xaa Ala Gln Ala Gln**  
               1                           5                                   10

55          <210> 53  
               <211> 14  
               <212> PRT  
               <213> Secuencia artificial

60          <220>  
               <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

65          <220>  
               <221> VARIANTE

<222> 10-12  
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

5 <400> 53

Ser Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Xaa Xaa Xaa Ala Gln  
 1                   5                   10

10

<210> 54  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

20

<400> 54  
 gatgggactt tggcggtgcc ttttaaggca cag 33

<210> 55  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

30

<400> 55  
 gatgggacgt tggcggtgcc ttttaaggca cag 33

<210> 56  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

40

<400> 56  
 caggcggta ggacgtctt g 21

<210> 57  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos

50

<400> 57  
 caggtcttca cggaactcaga ctatcg 27

55

<210> 58  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos sintética

65

<400> 58  
 caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat cg 32  
 <210> 59

<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Secuencia de nucleótidos sintéticos

10 <400> 59  
actcatcgac caatacttgt actatctctc tagaac 36

15 <210> 60  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

25 <400> 60  
ggaagtattc ctgggttg aaccga 26

30 <210> 61  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

40 <400> 61  
ggtcgcggtt ctgttttg gat 23

45 <210> 62  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Secuencia sintética de nucleótidos

55 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> 42, 43, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 60, 61  
<223> n = a, c, t o g

60 <400> 63

65 <210> 64  
<400> 64  
000

66 gtattcctt gttttgaacc caaccggctc ggcgcgtgtc mnnnnnnnnnn nnmnnnnnnnn 60  
nttggggact ctgggtgtt gtc 83

5 <210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

15 <400> 65

**Thr Asn His Gln Ser Ala Gln**  
1                                       5

20 <210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

<400> 66

**Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp**  
1                                       5

30 <210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

40 <400> 67

**Asp Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys**  
1                                       5

45 <210> 68

<211> 11

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

55 <220>

<221> VARIANTE

<222> 10-11

<223> Xaa = cualquier aminoácido

60 <400> 68

**Asp Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Xaa Xaa**  
1                                       5                                   10

# ES 2 869 284 T3

<210> 69  
<211> 64  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> Secuencia de nucleótidos sintéticos  
  
10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> 36, 37, 39, 40, 42, 43  
<223> n = a, c, t o g  
  
<400> 69  
15  
gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcnnnnnn mnnaaaaaggc accgccaaag 60  
tttg 64  
  
20 <210> 70  
<211> 70  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
25 <220>  
<223> Secuencia sintética de nucleótidos  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
30 <222> 42, 43, 45, 46, 48, 49  
<223> n = a, c, t o g  
  
<400> 70  
  
35 gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcctgtgc mnnnnnnnnnc accgccaaag 60  
tttgggact 70  
  
40 <210> 71  
<211> 77  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
45 <220>  
<223> Secuencia sintética de nucleótidos  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
50 <222> 48, 49, 51, 52, 54, 55  
<223> n = a, c, t o g  
  
<400> 71  
  
55 gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcctgtgc cttaamnnn nnmnncaaag 60  
tttgggact ctgggg 77  
  
60 <210> 72  
<211> 83  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
65 <220>  
<223> Secuencia sintética de nucleótidos  
<220>

5                   <221> misc\_feature  
 <222> 54, 55, 57, 58, 60, 61  
 <223> n = a, c, t o g  
 <400> 72  
  
 10                  gtattccttg gtttgaacc caaccggct gcgcctgtgc cttaaaaaggc acmnnnnnnmn 60  
 nttgggcaact ctgggtgtt gtg 83  
  
 15                  <210> 73  
 <211> 90  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20                  <220>  
 <223> Secuencia de cebador inversa utilizada para generar las bibliotecas AAV-PHP.B-XXX  
  
 25                  <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 57, 58, 60, 61, 63, 64  
 <223> n = a, c, to g  
 <400> 73  
  
 30                  ttccttgggtt ttgaacccaa ccggtctgcg cctgtgcctt aaaaggcacc gccaaamnnmn 60  
 nmnnactctg gtgggttgtg gccacttgtc 90  
  
 35                  <210> 74  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40                  <220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos  
  
 45                  <400> 74  
 actttggcgg tgccctttaa g 21  
 <210> 75  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50                  <220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos  
  
 55                  <400> 75  
 agtgtgagta agccctttt g 21  
  
 <210> 76  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60                  <220>  
 <223> Secuencia de núcleo sintético  
  
 65                  <400> 76  
 ttacgttga cgacgcctaa g 21  
  
 <210> 77  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5                   <220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos  
 <400> 77  
 tatacttgtt cgcaagggttg g 21  
 10                  <210> 78  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15                  <220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos  
 <400> 78  
 caggcggta ggacgtctt g 21  
 20                  <210> 79  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25                  <220>  
 <223> Secuencia sintética de nucleótidos  
 <400> 79  
 ctgcgaagg agcggcttc g 21  
 30                  <210> 80  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35                  <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
 <400> 80  
 40                  **Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln**  
 1                    5  
 45                  <210> 81  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50                  <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
 <400> 81  
 55                  **Val Pro Phe Lys Ala Gln**  
 1                    5  
 60                  <210> 82  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 65                  <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

<400> 82

5

Phe Lys Ala Gln  
1

10

<210> 83  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
<400> 83

20

Ala Gln Thr Leu Ala Val  
1 5

25

<210> 84  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
<400> 84

35

Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe  
1 5

40

<210> 85  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
<400> 85

50

Gln Ala Val Arg  
1

55

<210> 86  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos  
<400> 86

65

**Ala Val Arg Thr**  
1

5

<210> 87  
<211> 4  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintética

15 <400> 87

**Val Arg Thr Ser**  
1

20

<210> 88  
<211> 4  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

30 <400> 88

**Arg Thr Ser Leu**  
1

35

<210> 89  
<211> 5  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

45 <400> 89

**Gln Ala Val Arg Thr**  
1 5

50

<210> 90  
<211> 5  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

60 <400> 90

**Ala Val Arg Thr Ser**  
1 5

65

<210> 91  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

10 <400> 91

Val Arg Thr Ser Leu  
1 5

15

<210> 92  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

25 <400> 92

Gln Ala Val Arg Thr Ser  
1 5

<210> 93  
<211> 6  
30 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos sintéticos

35 <400> 93

Ala Val Arg Thr Ser Leu  
1 5

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido AAV que comprende una secuencia de 11 aminoácidos contiguos  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ , en donde
- 5             $X_1$  es D, A, E, Q, N, G o S;  
                $X_2$  es G, N, S, T, Q, R o V;  
                $X_3$  es T, S o N;  
                $X_4$  es L o V;  
                $X_5$  es A, S, Q, P, o T;  
 10             $X_6$  es V, T, Q, N, L o M;  
                $X_7$  es P;  
                $X_8$  es F, Y, V, L, C, o S;  
                $X_9$  es K, R o S;  
                $X_{10}$  es A o N; y  
 15             $X_{11}$  es Q o P,  
               en donde el péptido AAV no comprende la secuencia de aminoácidos AQTLAVPFKAQ (SEQ ID NO: 1).
2. El péptido AAV de la reivindicación 1, en donde los aminoácidos  $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  son PFKAQ o PFSNP.
- 20            3. El péptido AAV de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde los aminoácidos  $X_4X_5X_6$  son LAV, LAT, LAQ, LQQ o LSN.
- 25            4. El péptido AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1 -3, en donde los aminoácidos  $X_1X_2X_3$  son DGT, GGT, EGT, EGS, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, AQT, o ART.
- 30            5. El péptido AAV de la reivindicación 1, en donde los 11 aminoácidos contiguos son AQTLAVPFSNP (SEQ ID NO: 15).
- 35            6. El péptido AAV de la reivindicación 1, en donde los aminoácidos  $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  son PFKAQ, los aminoácidos  $X_4X_5X_6$  son LAV y los aminoácidos  $X_1X_2X_3$  son DGT, DST, EGT, EST, EGS, GGT, SGS, QGT, NQT, SGN o AVT.
- 40            7. El péptido AAV de la reivindicación 1, en donde los aminoácidos  $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  son PFKAQ, los aminoácidos  $X_4X_5X_6$  son LAT y los aminoácidos  $X_1X_2X_3$  son AQT, ATT, DGT o GGT.
- 45            8. El péptido AAV de la reivindicación 1, en donde los aminoácidos  $X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$  son PFKAQ, los aminoácidos  $X_1X_2X_3$  son AQT y los aminoácidos  $X_4X_5X_6$  son LAQ, LQQ, LSN, LST, LPQ, LSQ o LQL.
- 50            9. El péptido AAV de la reivindicación 8, en donde los aminoácidos  $X_4X_5X_6$  son LAQ, LQQ o LSN.
- 4-26. 10. El péptido AAV de la reivindicación 1, en donde la secuencia de 11 aminoácidos contiguos es una de las SEQ ID NO:
- 55            12. El péptido AAV de la reivindicación 1, en donde la secuencia de 11 aminoácidos contiguos es SEQ ID NO: 4.
13. El péptido AAV de la reivindicación 1, donde la secuencia de 11 aminoácidos contiguos es SEQ ID NO: 5.
14. El péptido AAV de la reivindicación 1, donde la secuencia de 11 aminoácidos contiguos es SEQ ID NO: 6.
- 50            15. El péptido AAV de la reivindicación 1, donde la secuencia de 11 aminoácidos contiguos es la SEQ ID NO: 9.
- 60            16. Una proteína de la cápside de AAV que comprende el péptido de AAV de cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

55

60

65

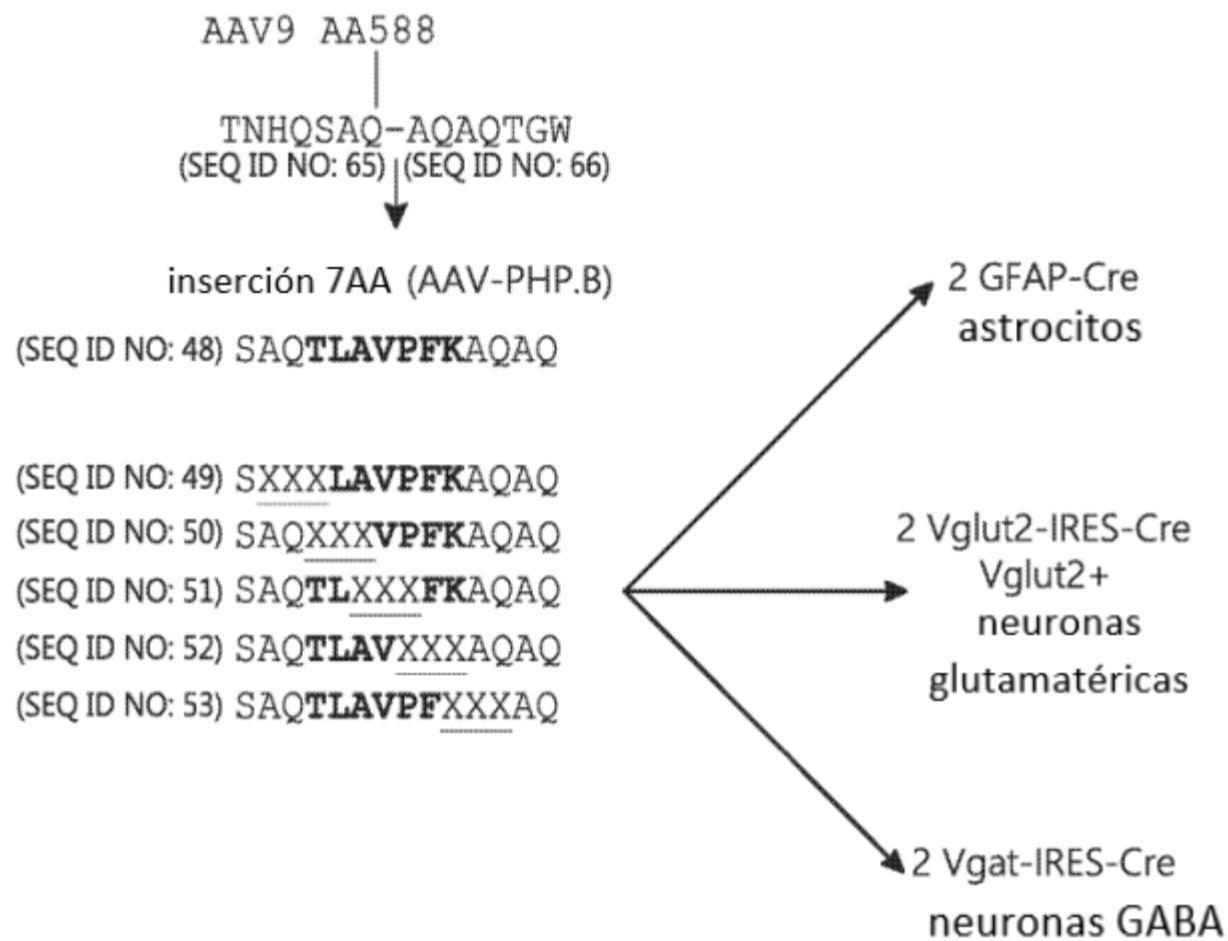


FIG. 1

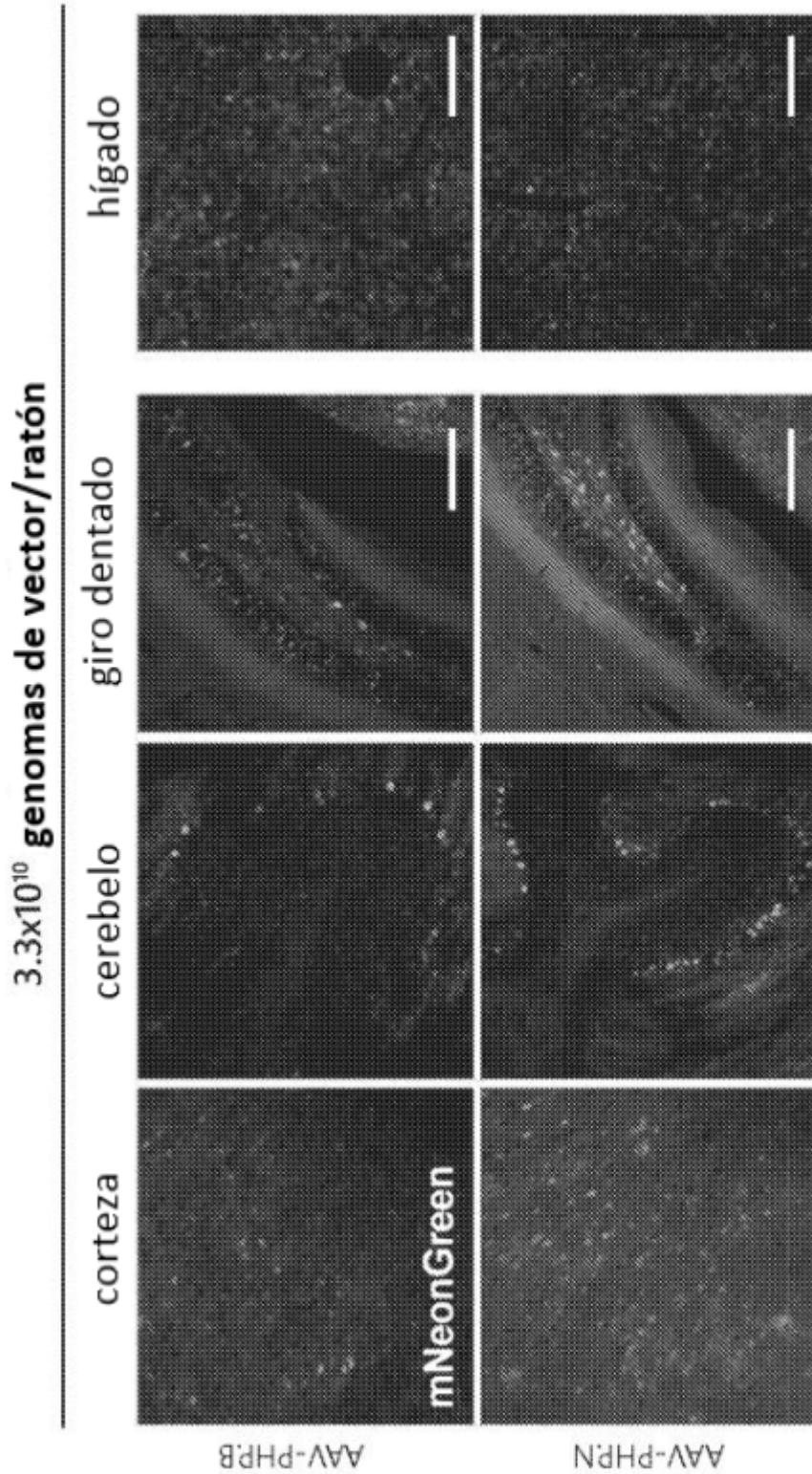


FIG. 2

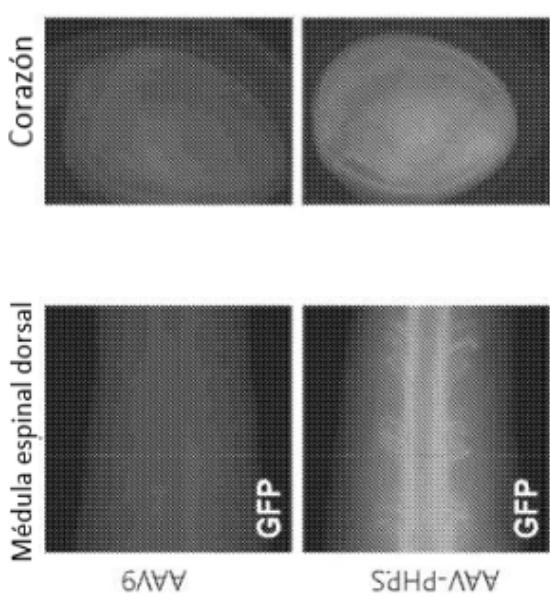
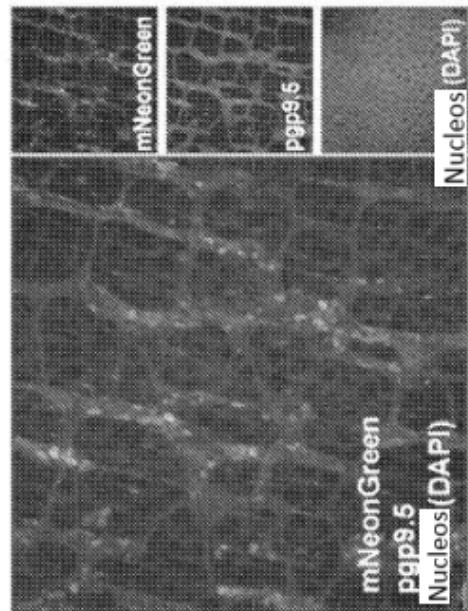
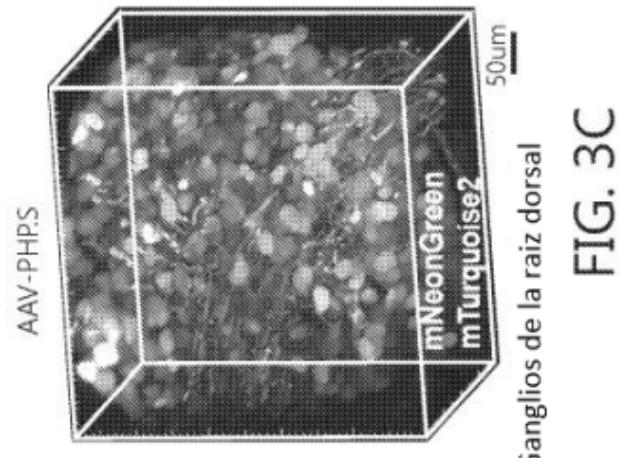
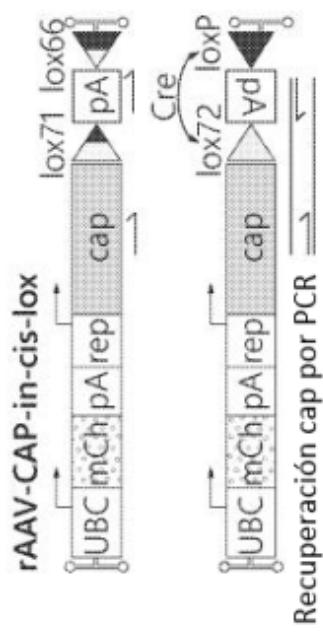
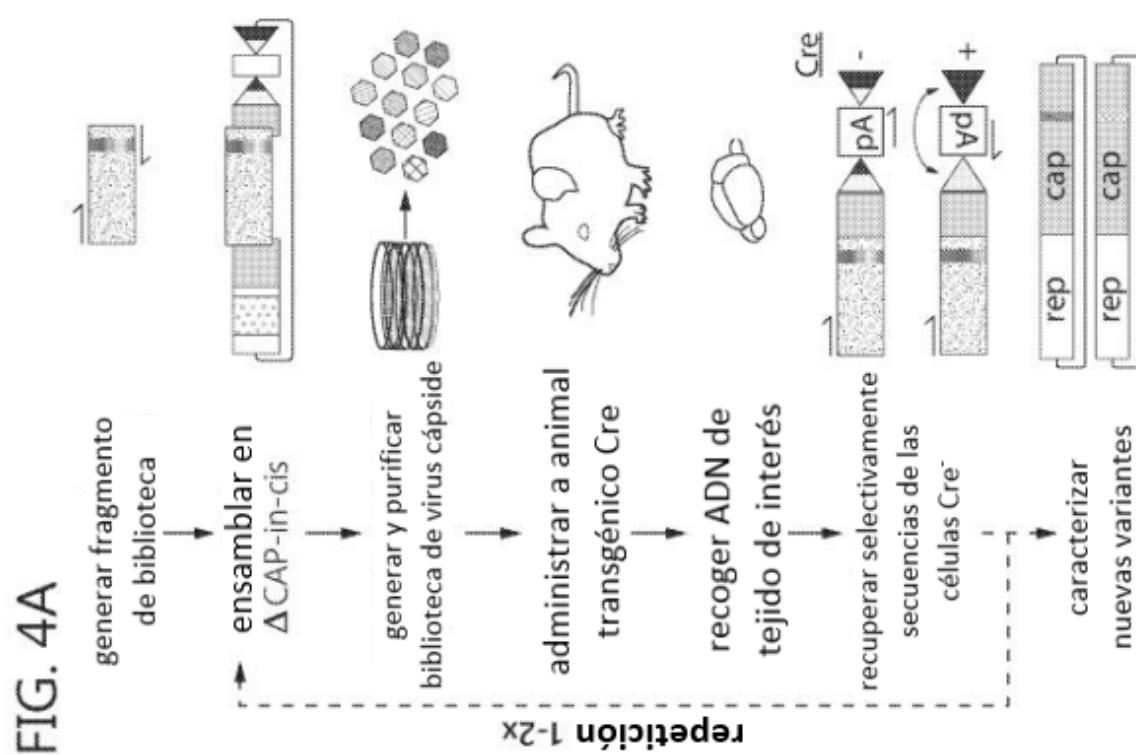
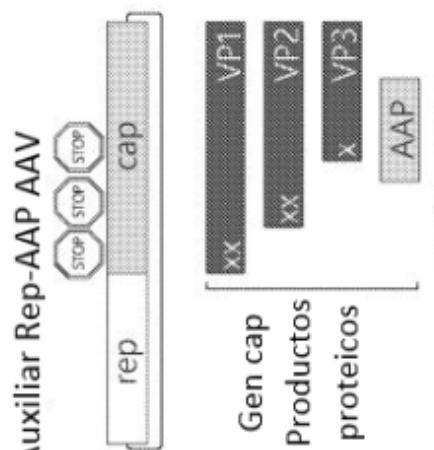
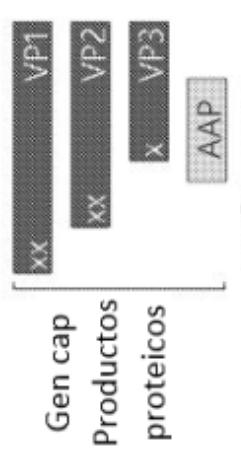


FIG. 3A



**FIG. 4B****FIG. 4C**

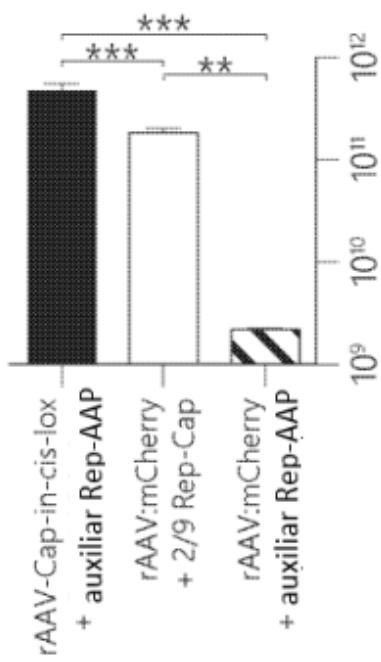


FIG. 4E

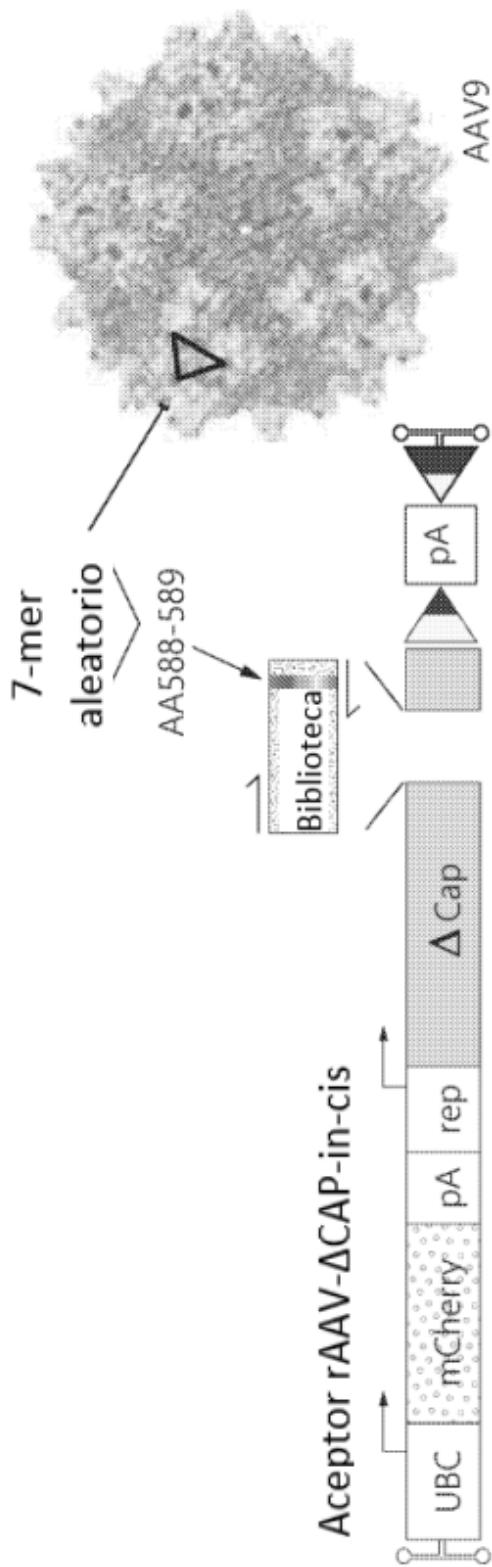
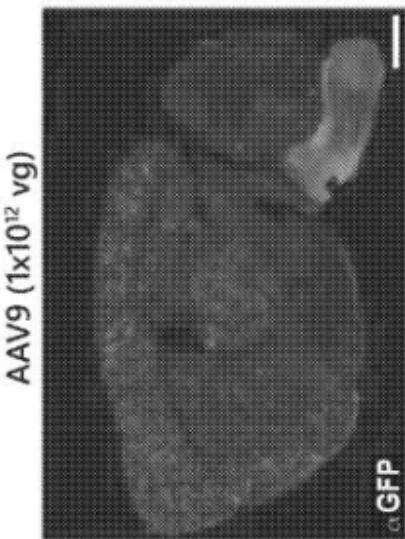
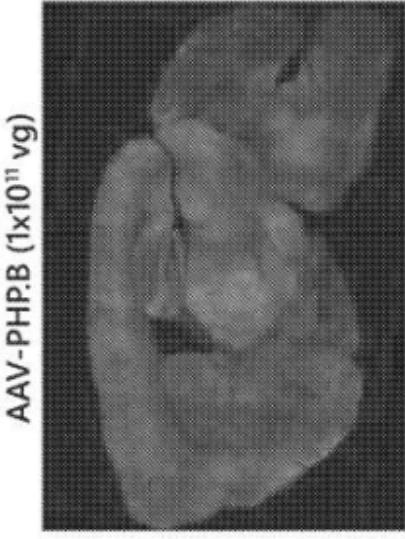


FIG. 4F

FIG. 4G



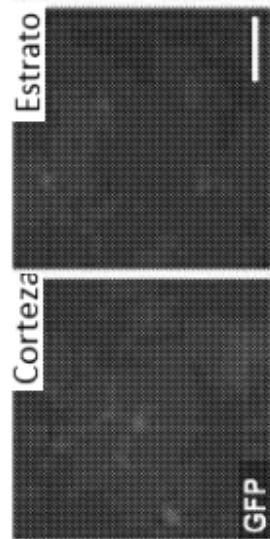
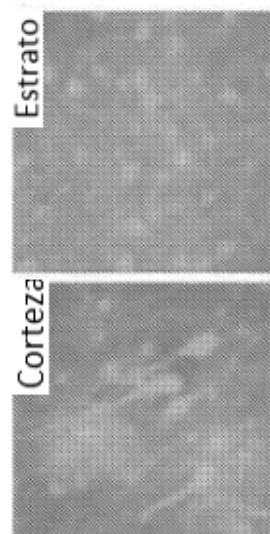
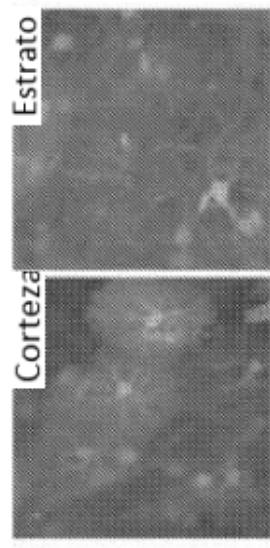
AAV-PHP.B ( $1 \times 10^{11}$  vg)

AAV-PHP.B ( $1 \times 10^{12}$  vg)

AAV9 ( $1 \times 10^{12}$  vg)

GFP

FIG. 5A



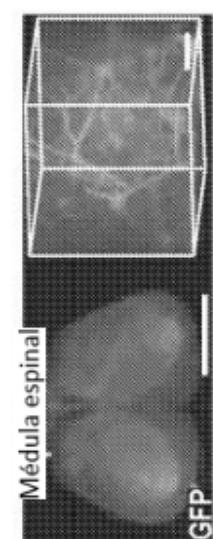
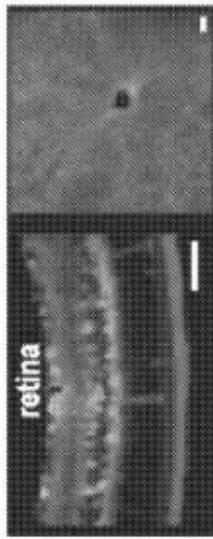
Corteza

Corteza

Corteza

GFP

FIG. 5B



Médula espinal

GFP

FIG. 5D

FIG. 5C

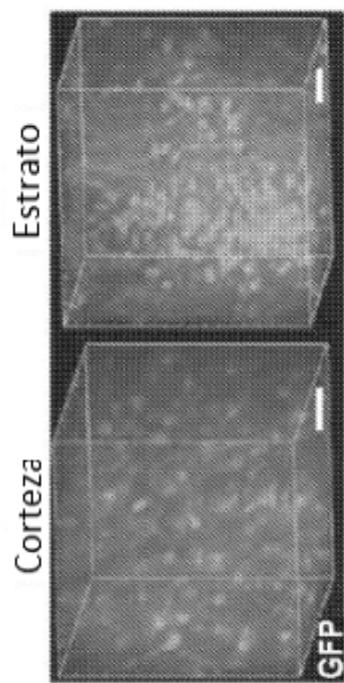
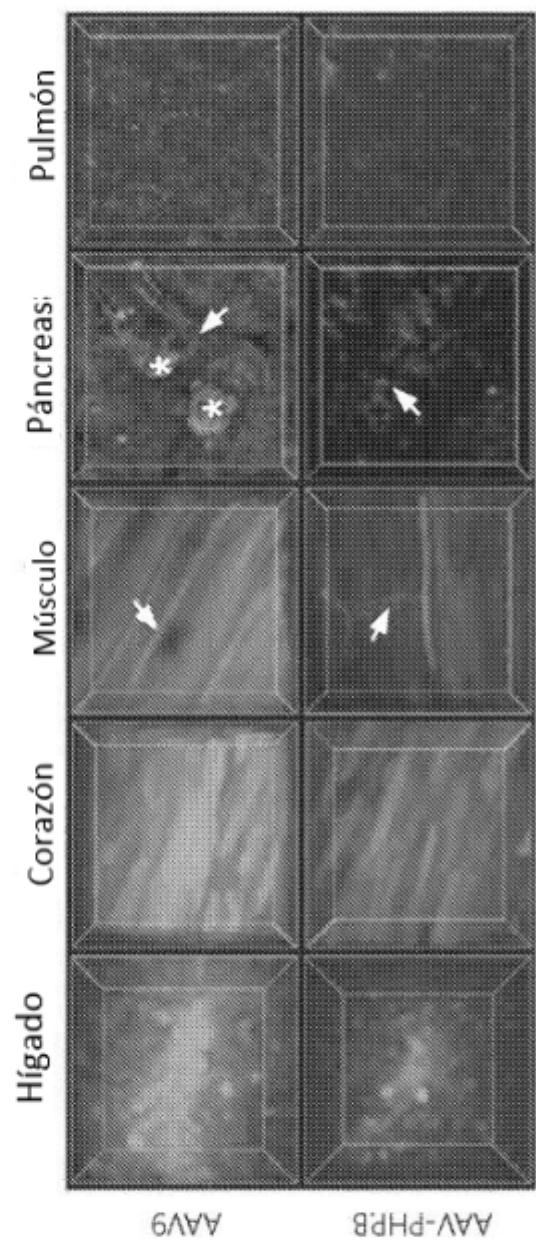


FIG. 5E



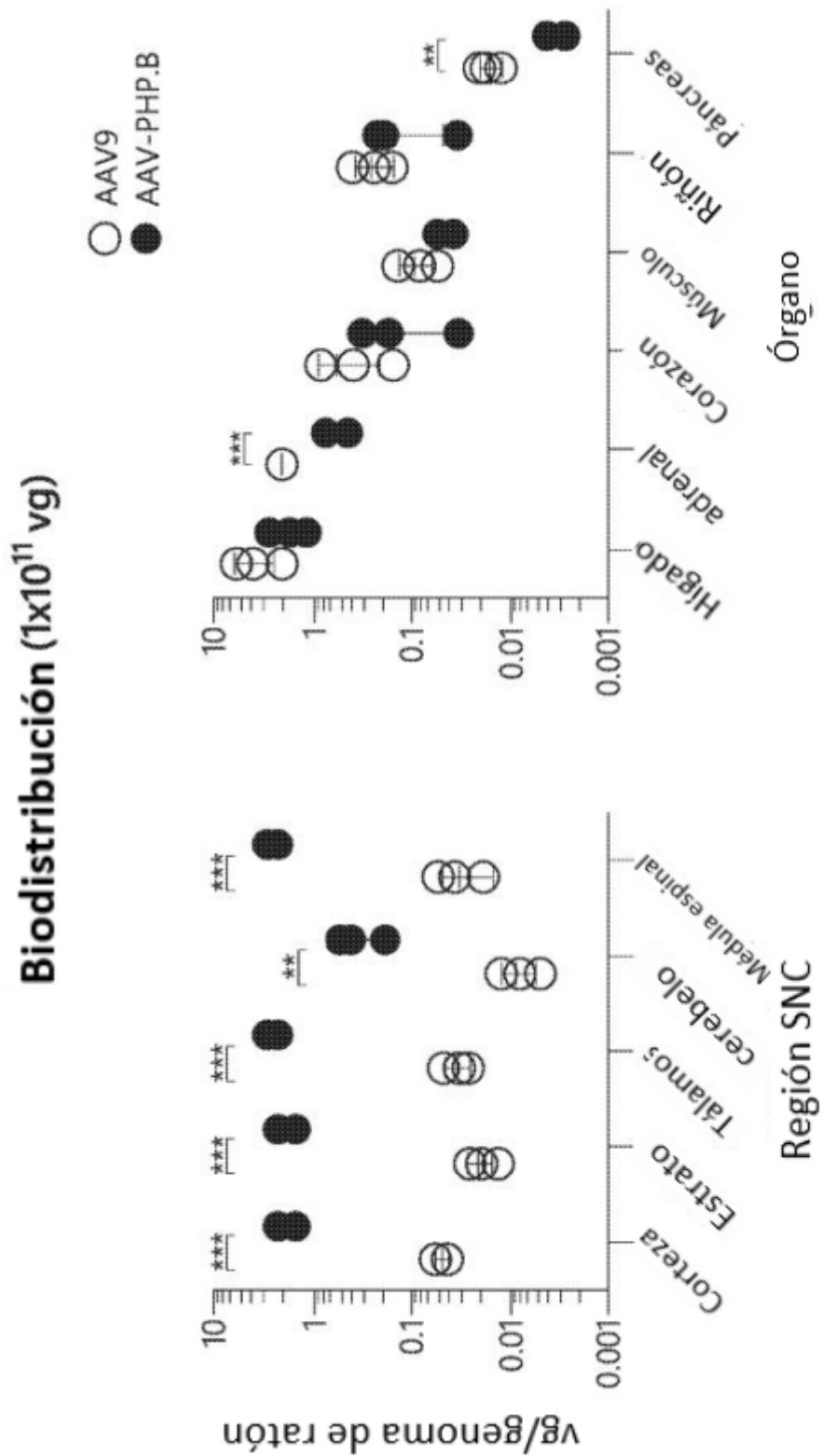


FIG. 5G

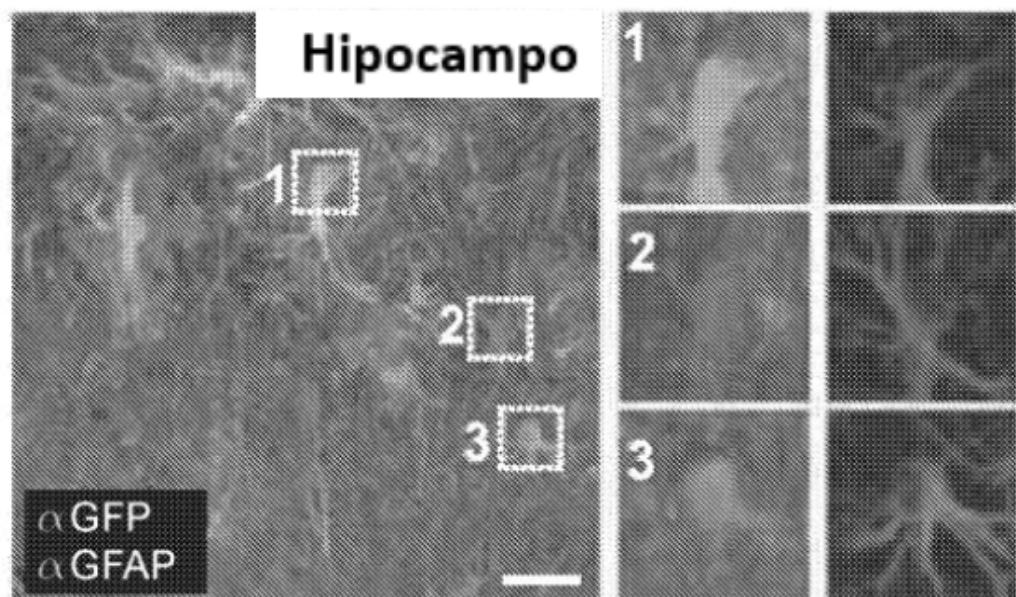


FIG. 6A

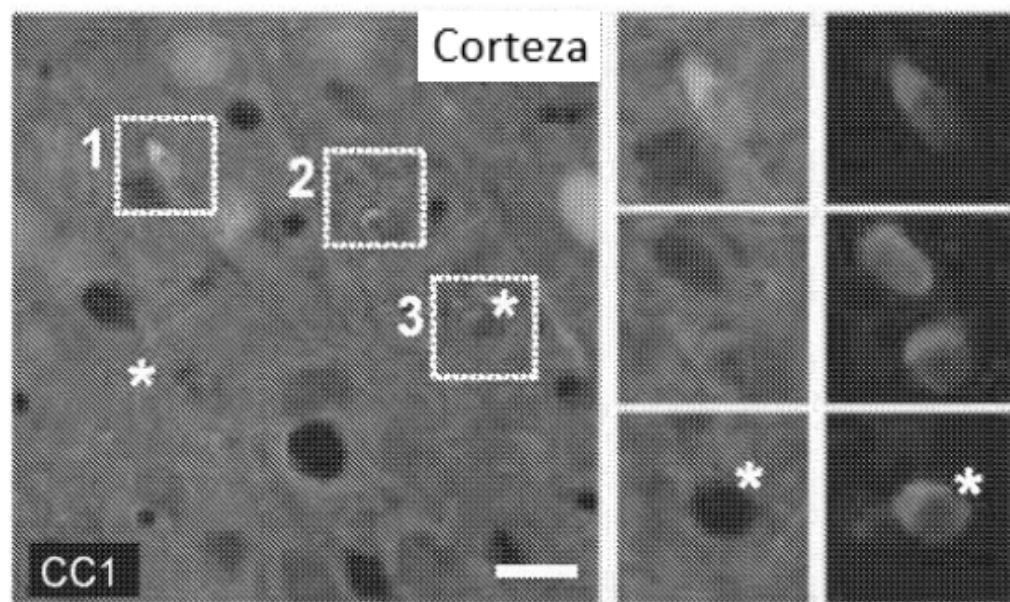


FIG. 6B

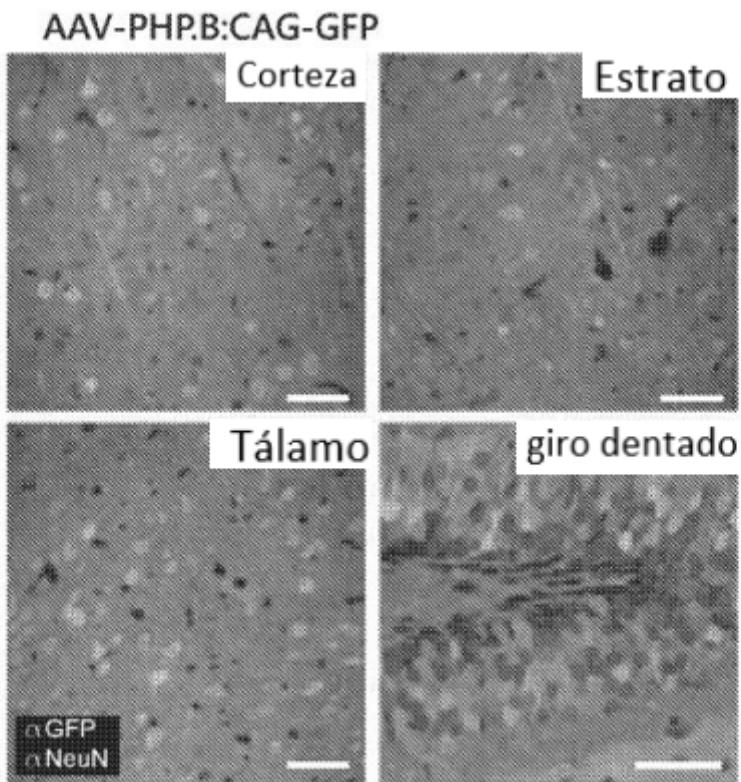


FIG. 6C

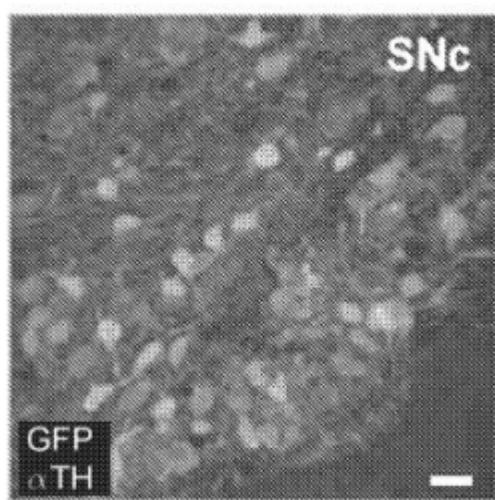


FIG. 6D

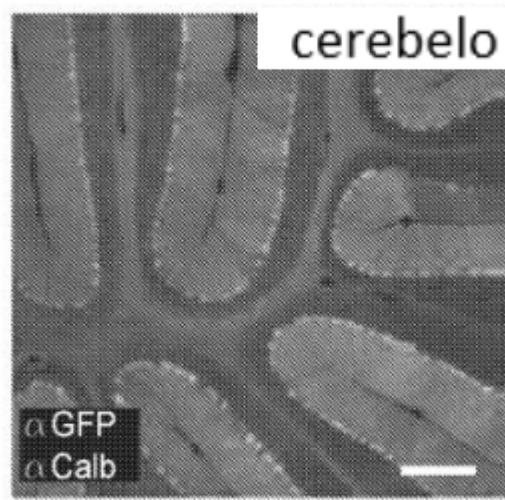
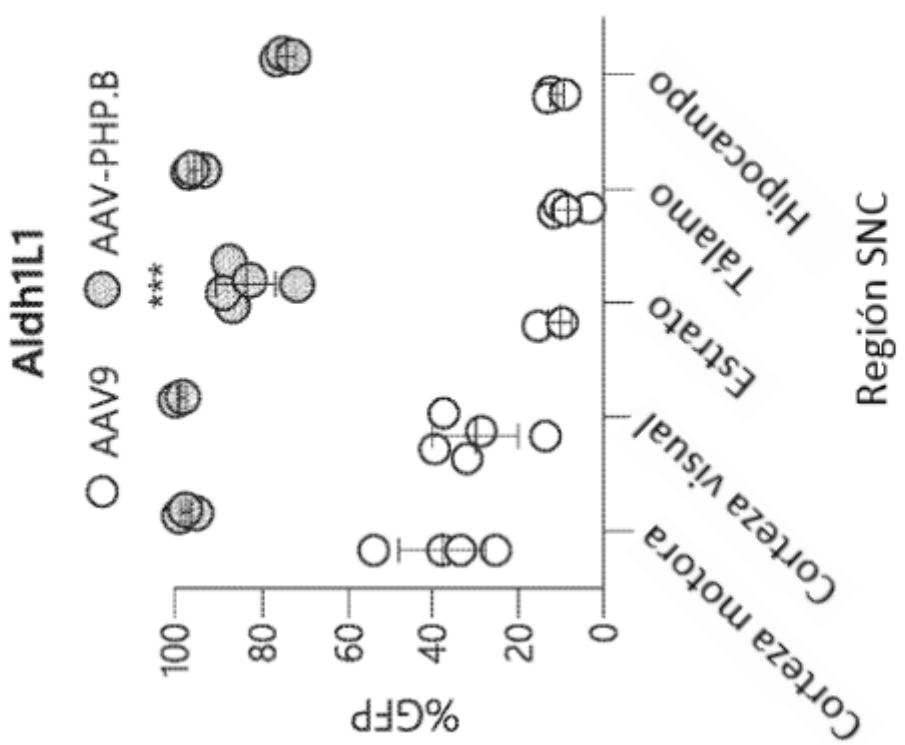
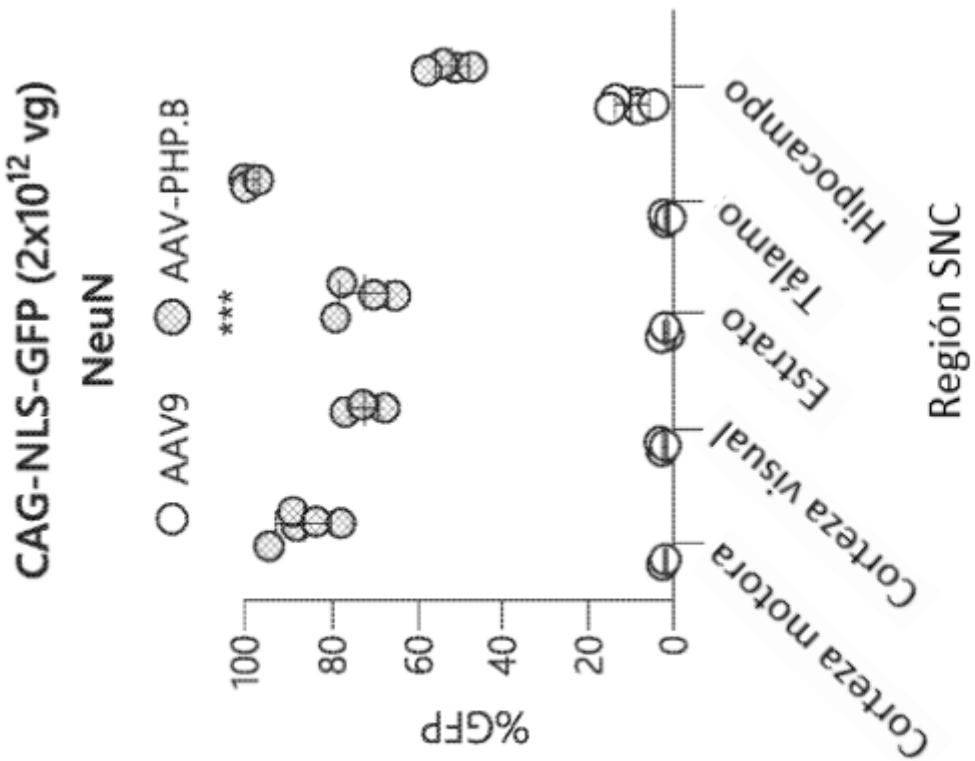
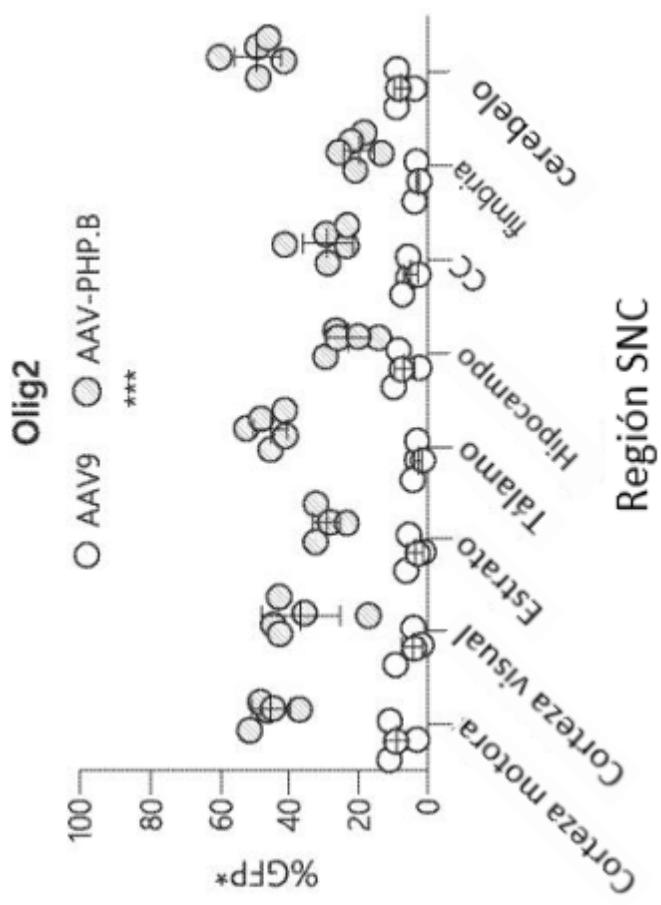
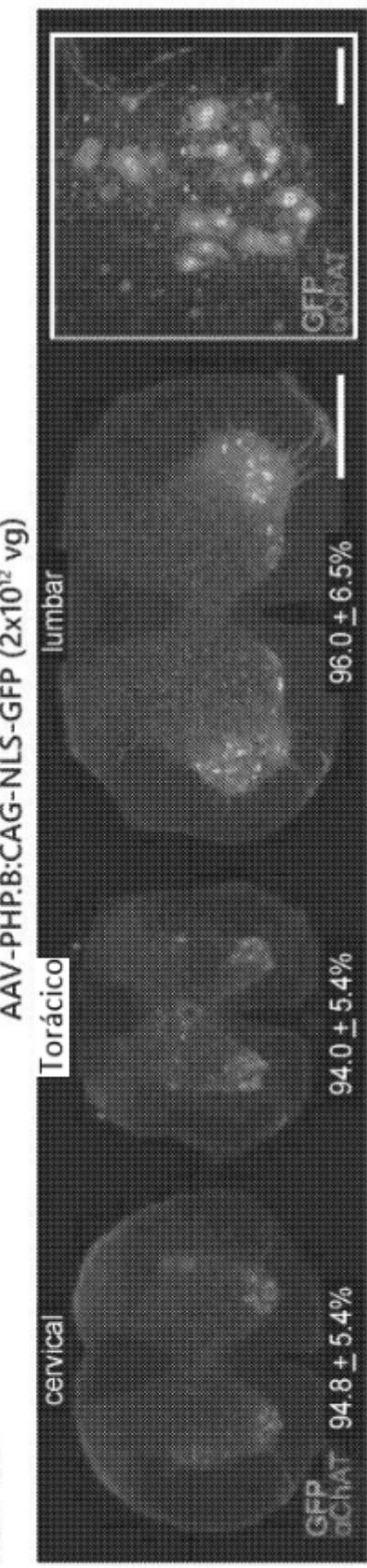


FIG. 6E

**FIG. 6G**

**FIG. 6H****FIG. 6I**

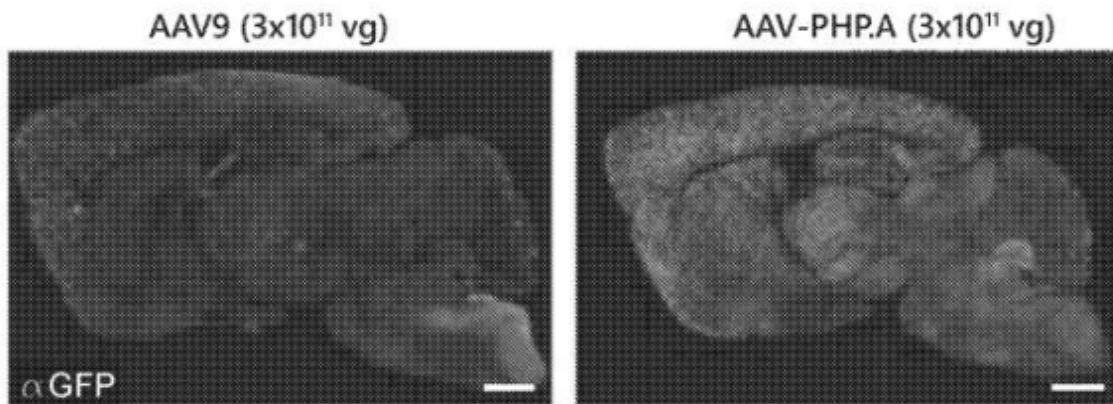


FIG. 7A

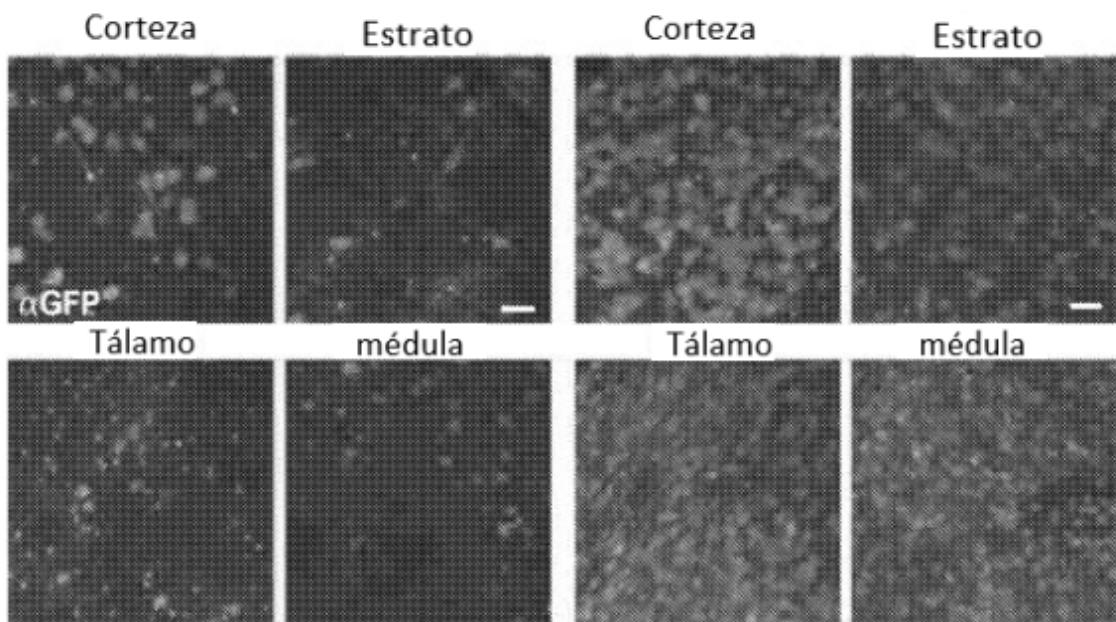


FIG. 7B

### Hipocampo

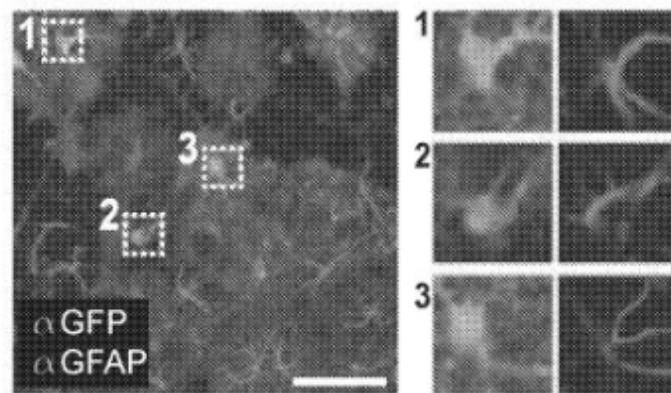


FIG. 7C

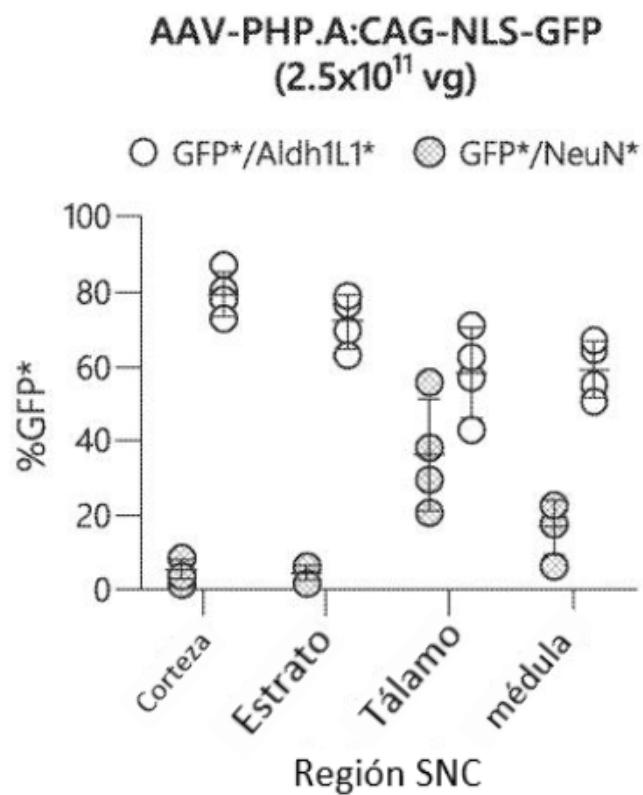


FIG. 7D

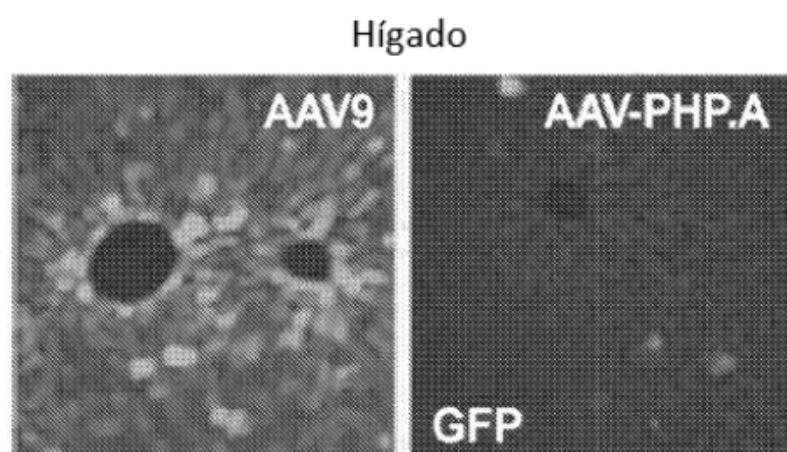


FIG. 7E

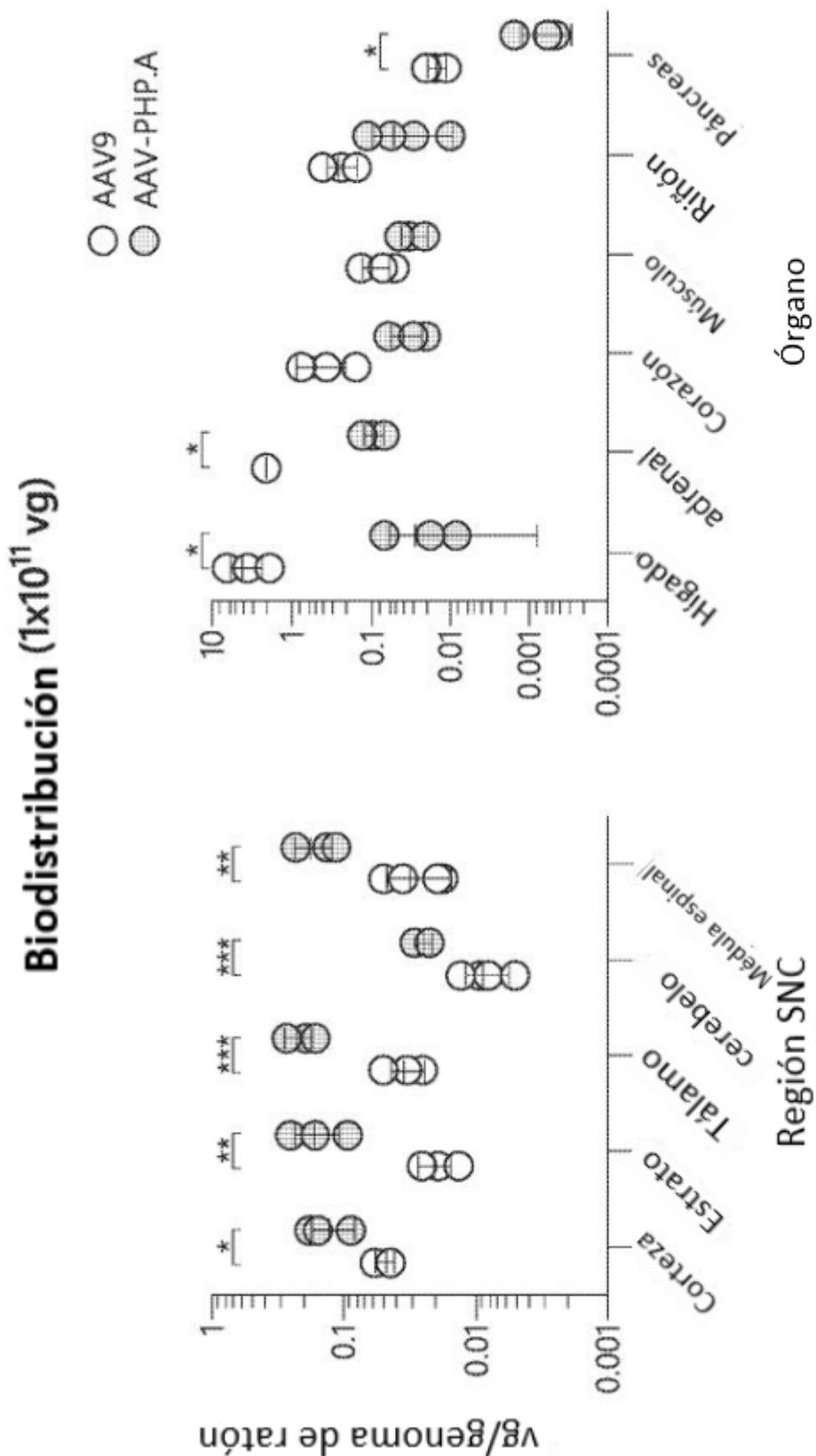


FIG. 7F

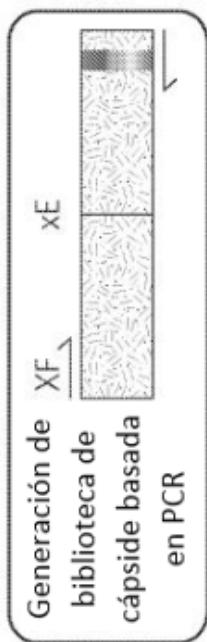


FIG. 8A

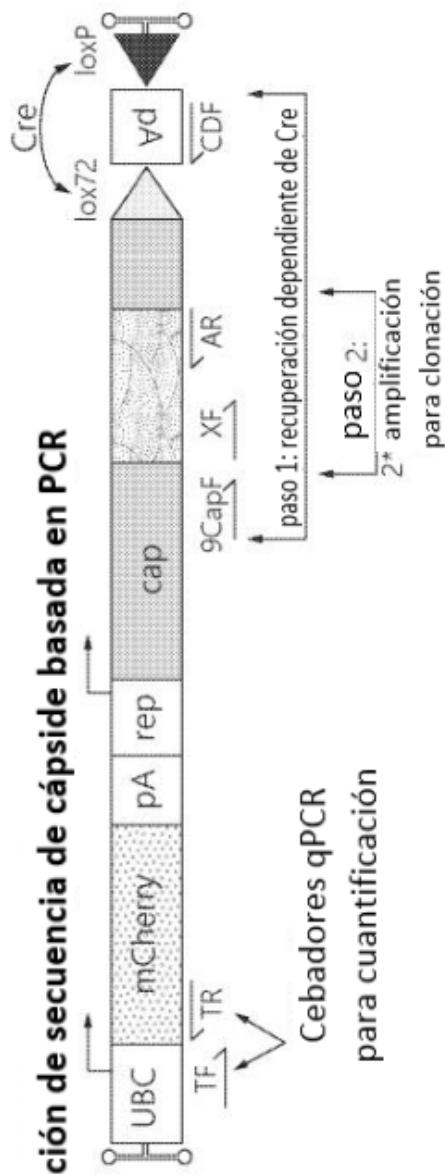
**Recuperación de secuencia de cápside basada en PCR**

FIG. 8B

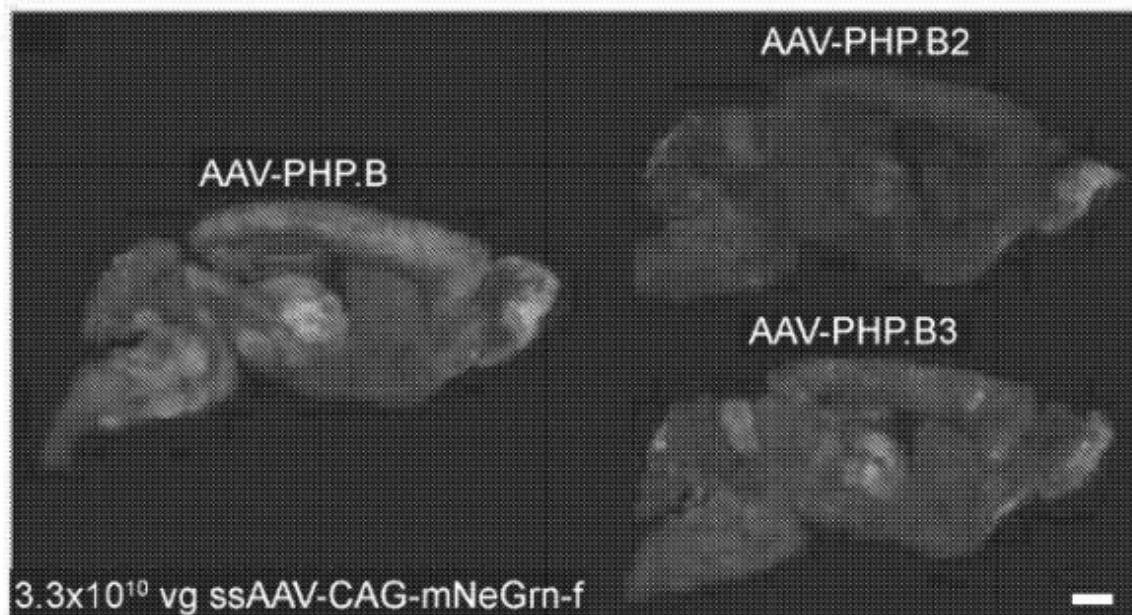


FIG. 9A

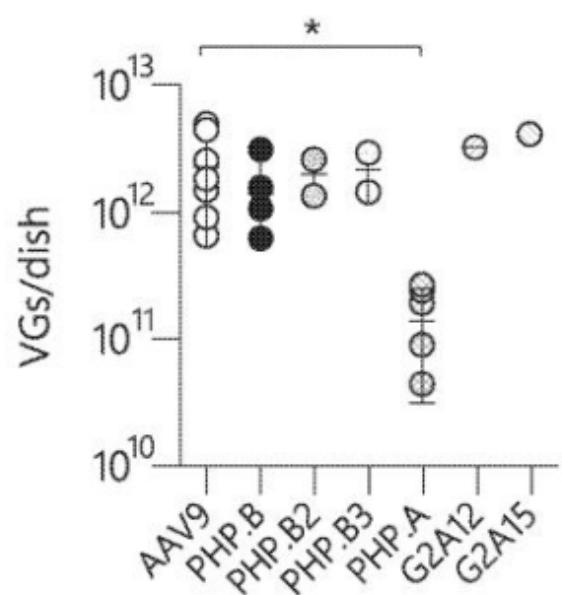


FIG. 9B

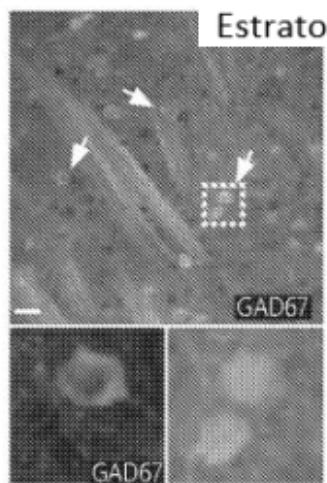


FIG. 10A

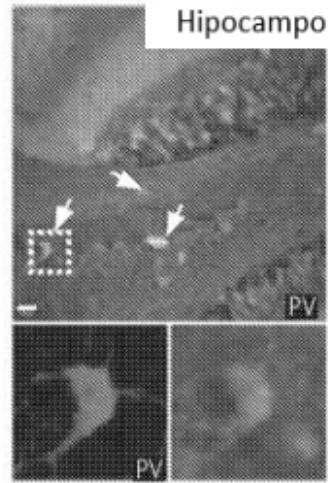


FIG. 10B

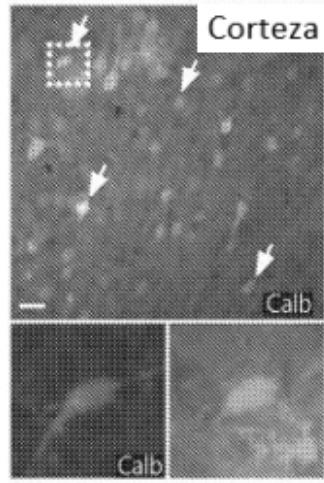


FIG. 10C

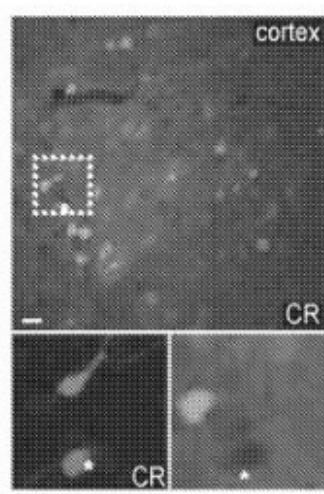


FIG. 10D

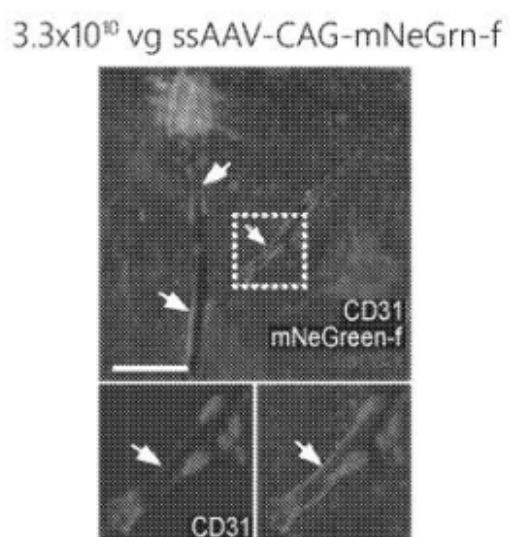


FIG. 10E

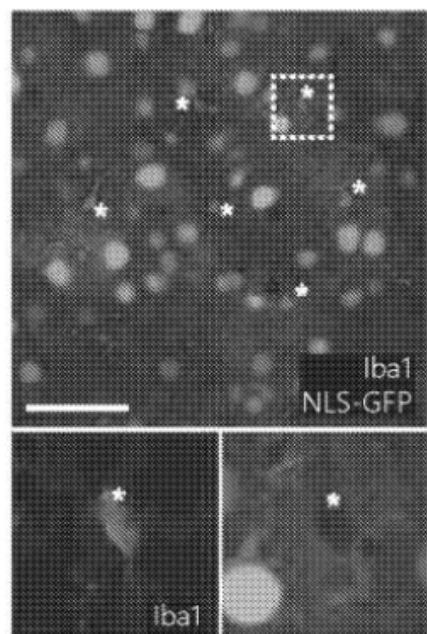


FIG. 10F

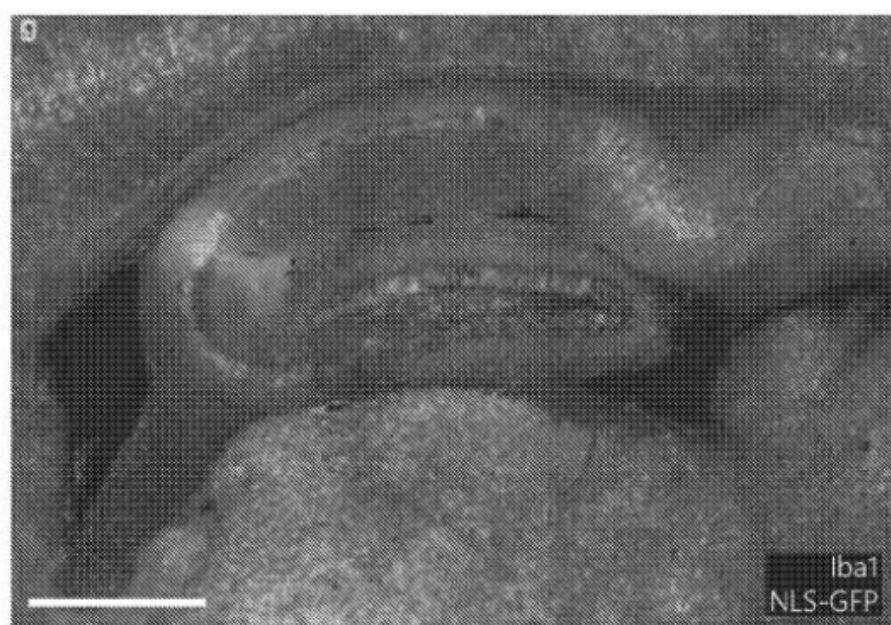


FIG. 10G

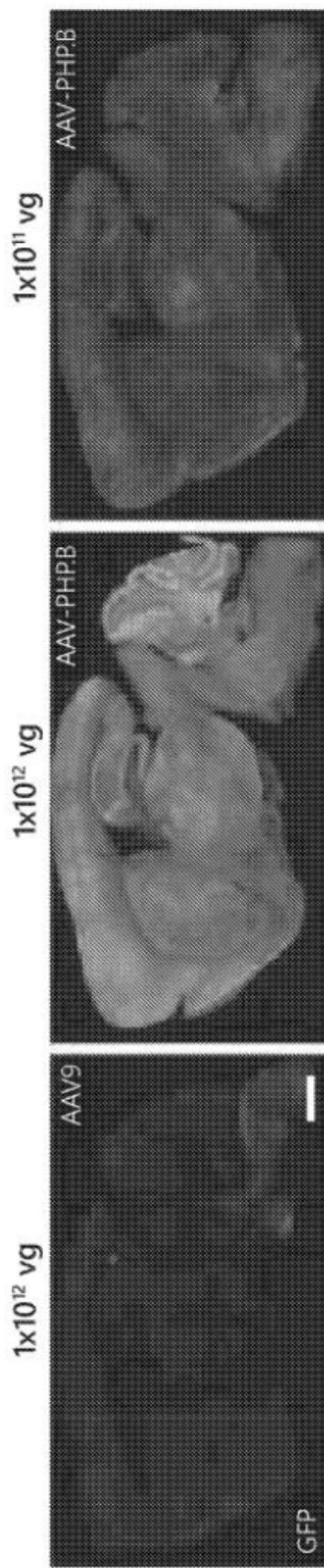


FIG. 11

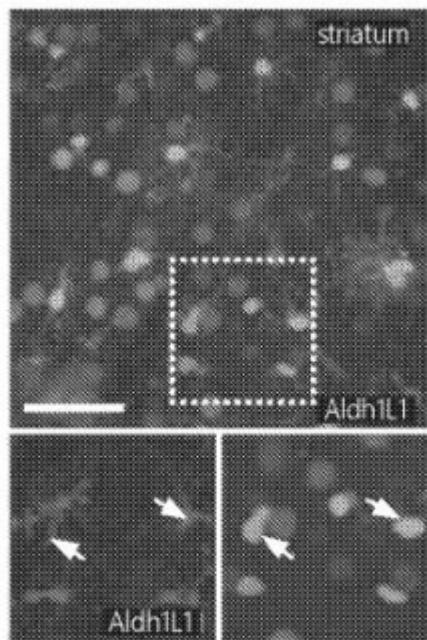


FIG. 12A

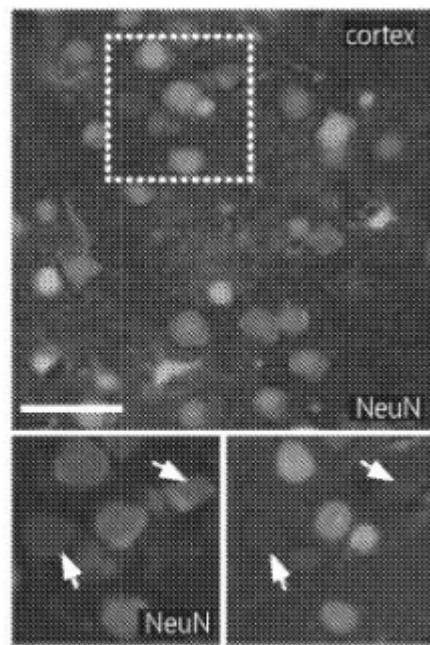


FIG. 12B

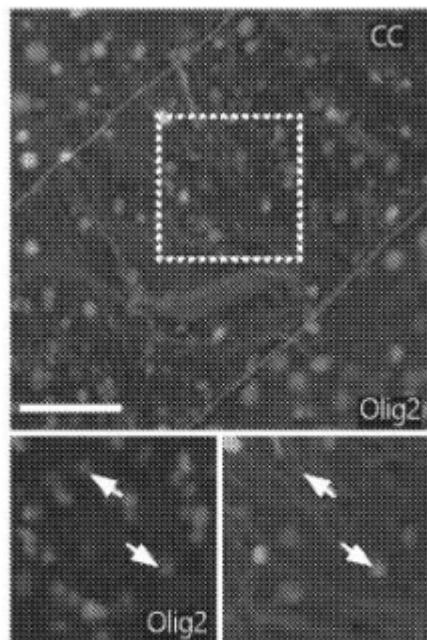


FIG. 12C

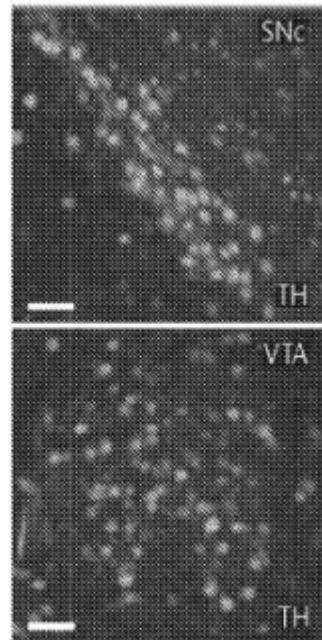


FIG. 12D

esferoides corticales derivados por iPSC humano  
(cultivos disociados:  $1 \times 10^6$  vg/pocillo)

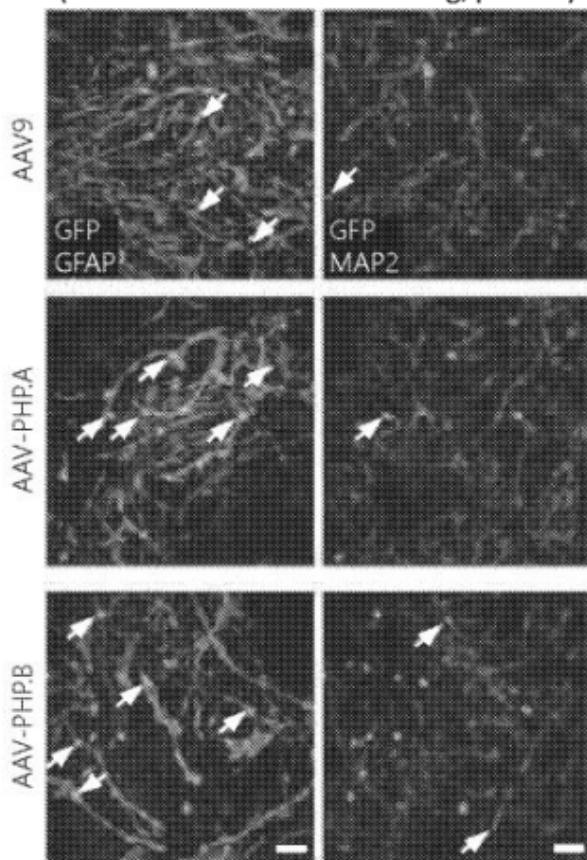


FIG. 13A

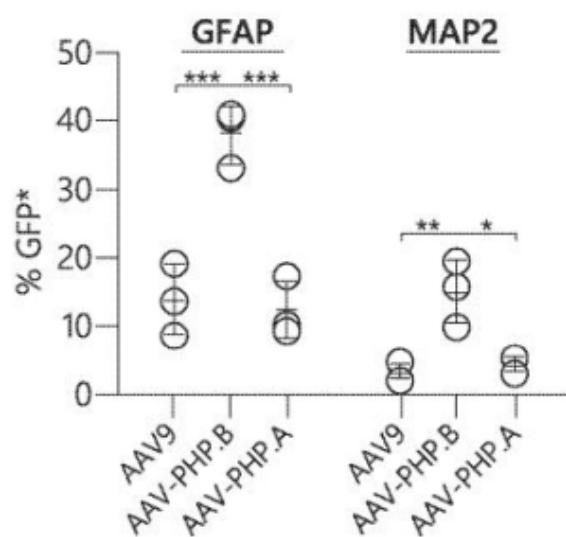


FIG. 13B

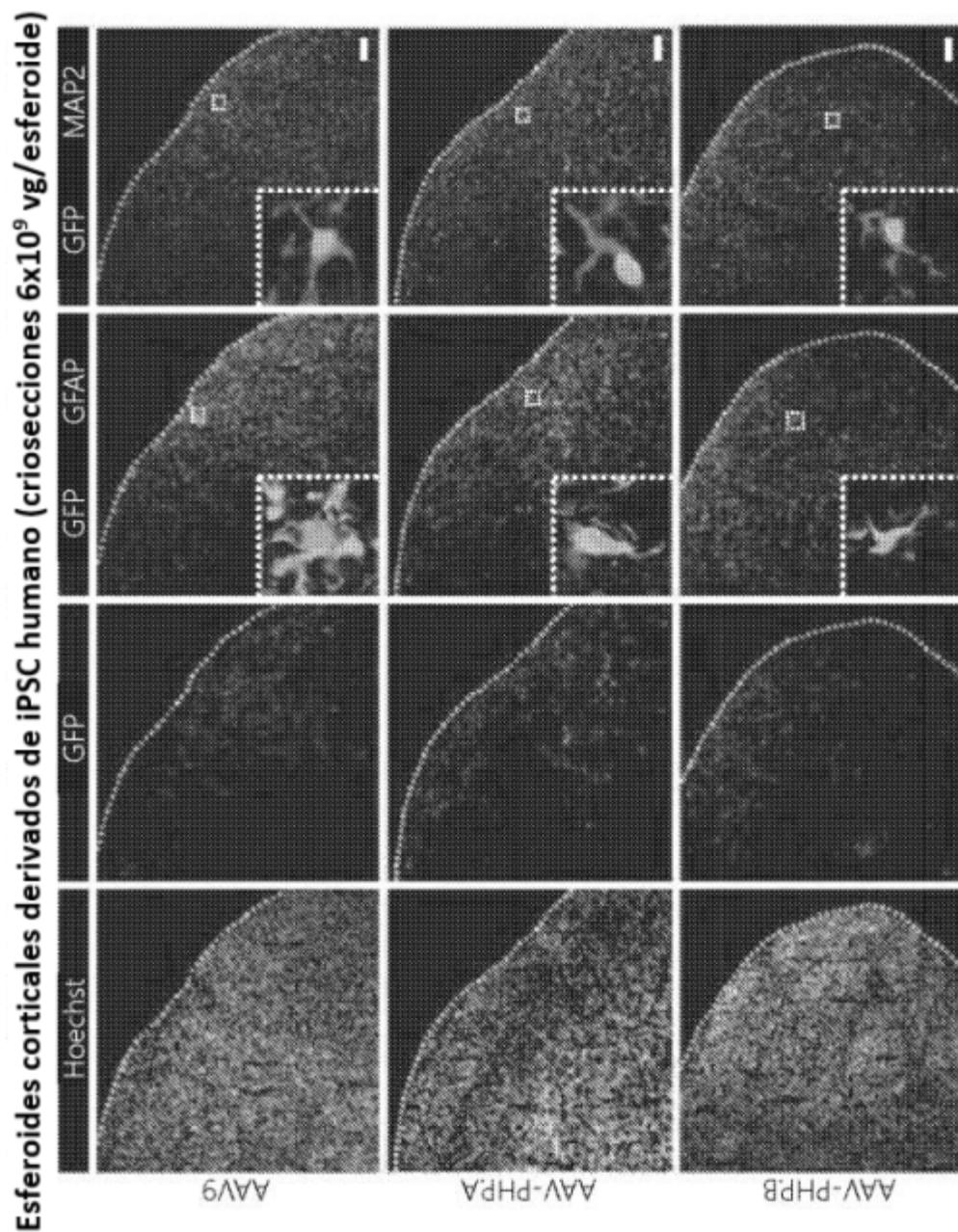


FIG. 13C

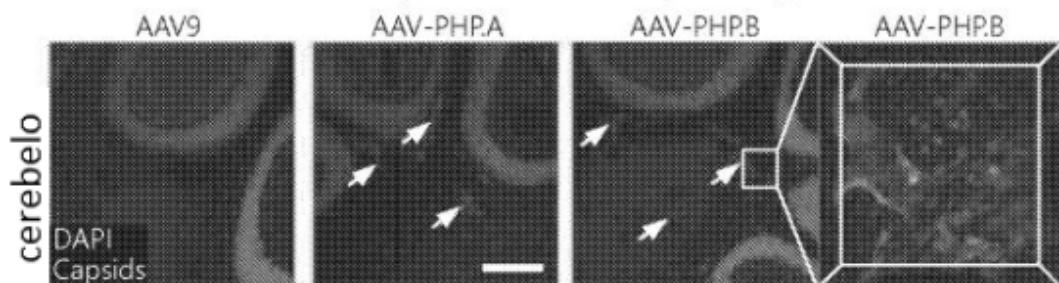
**Distribución de cápsides 1 h ( $1 \times 10^{11}$  vg)**

FIG. 14A

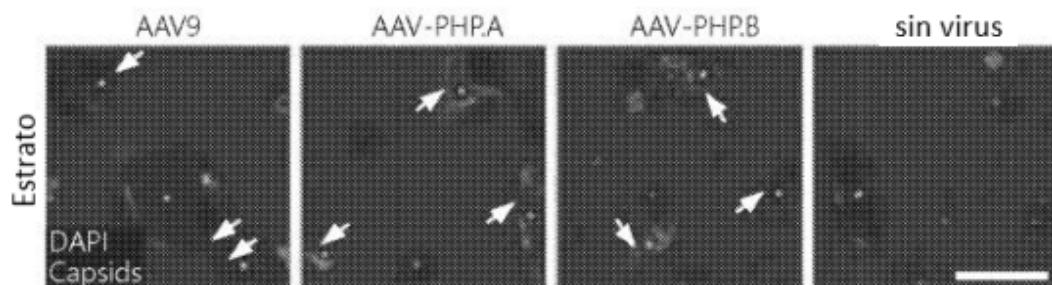


FIG. 14B

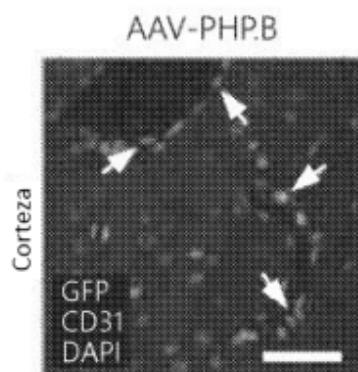
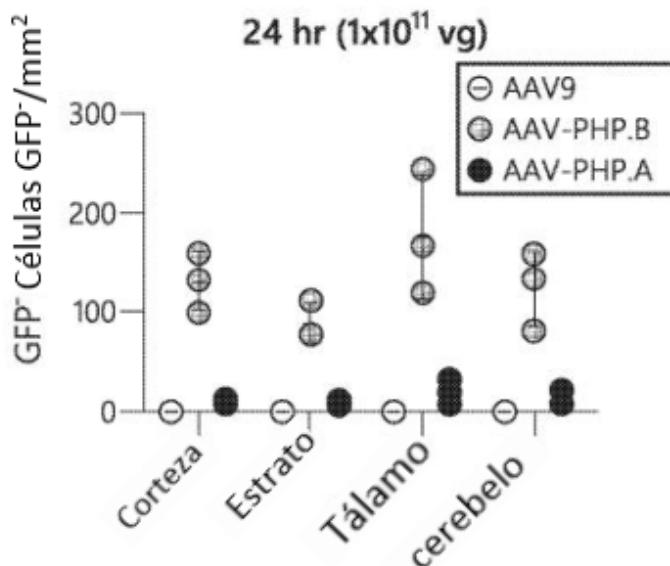


FIG. 14C

FIG. 14D



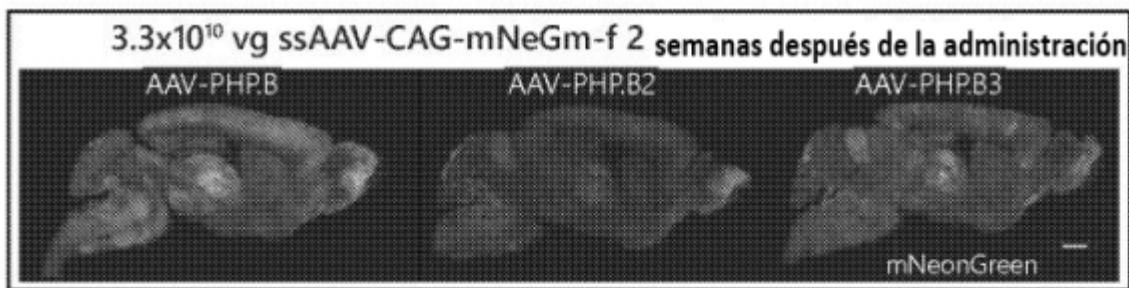


FIG. 15A

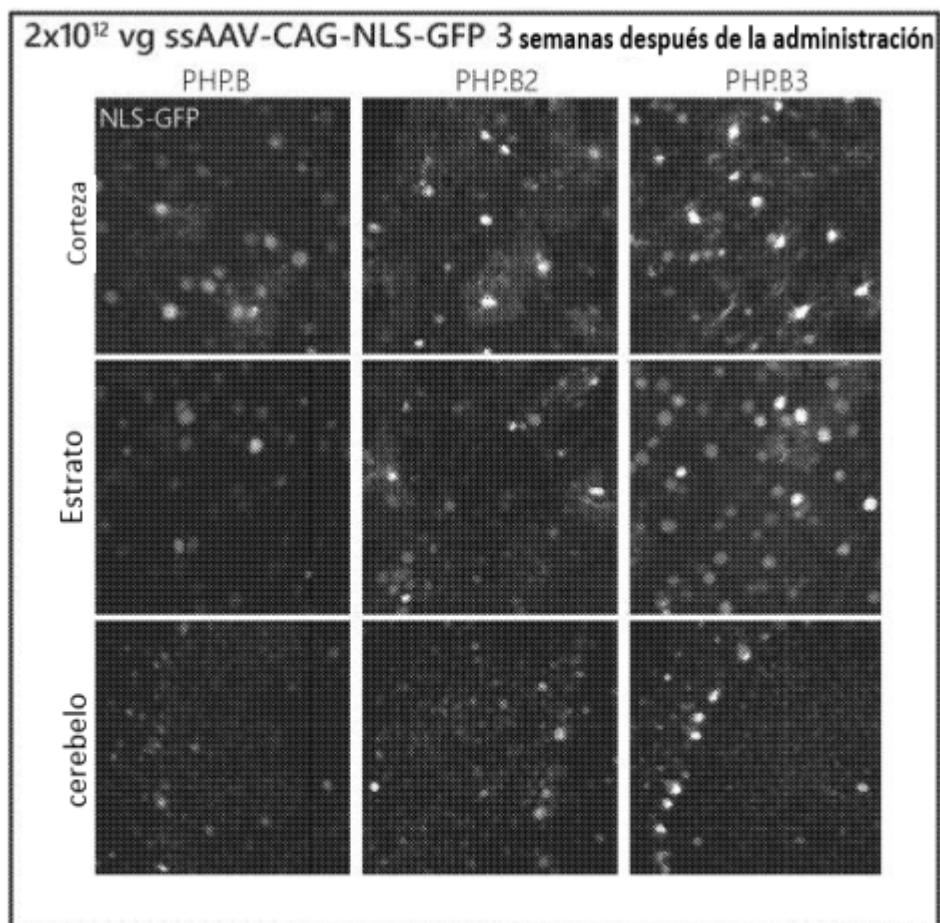
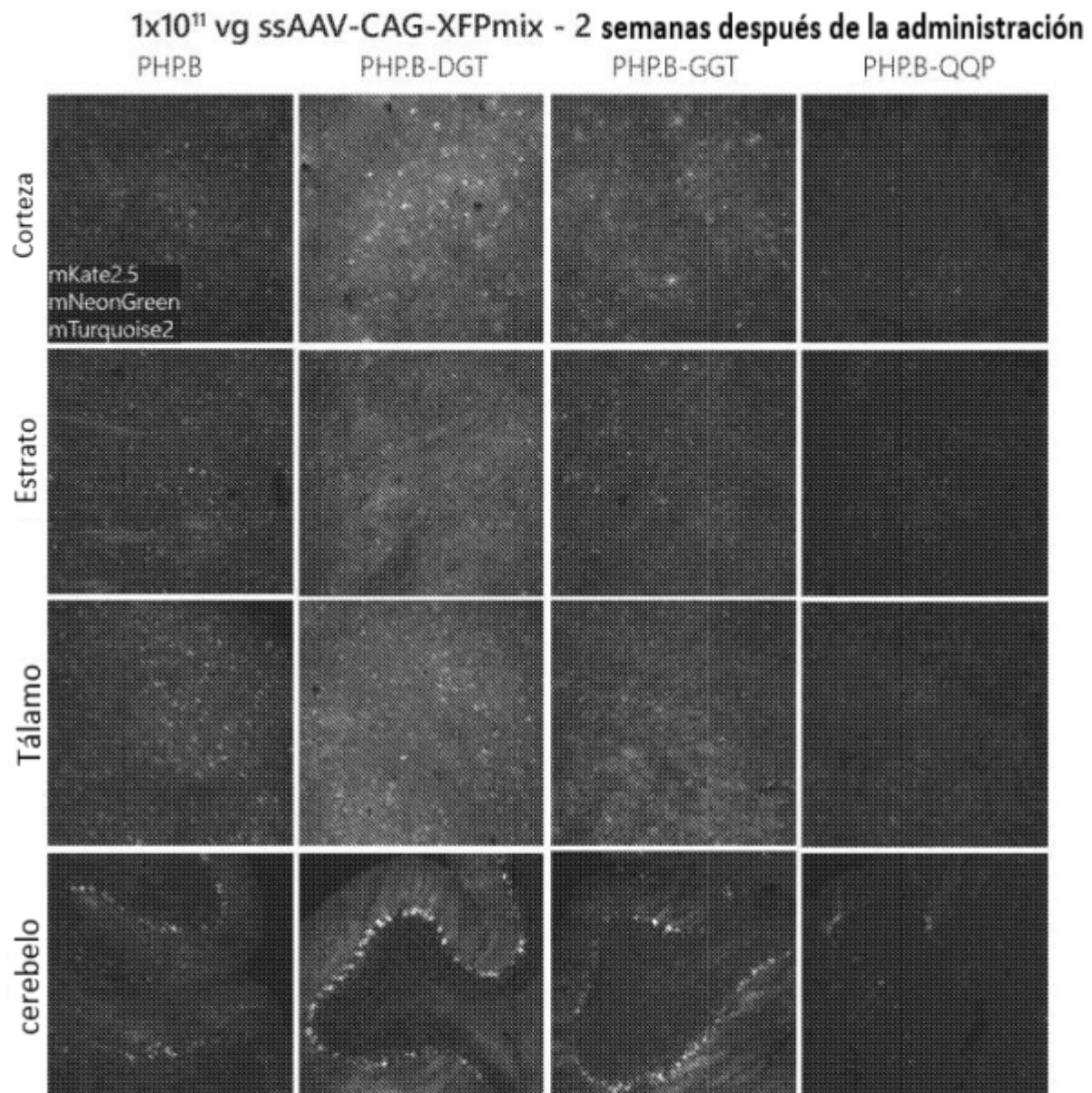


FIG. 15B



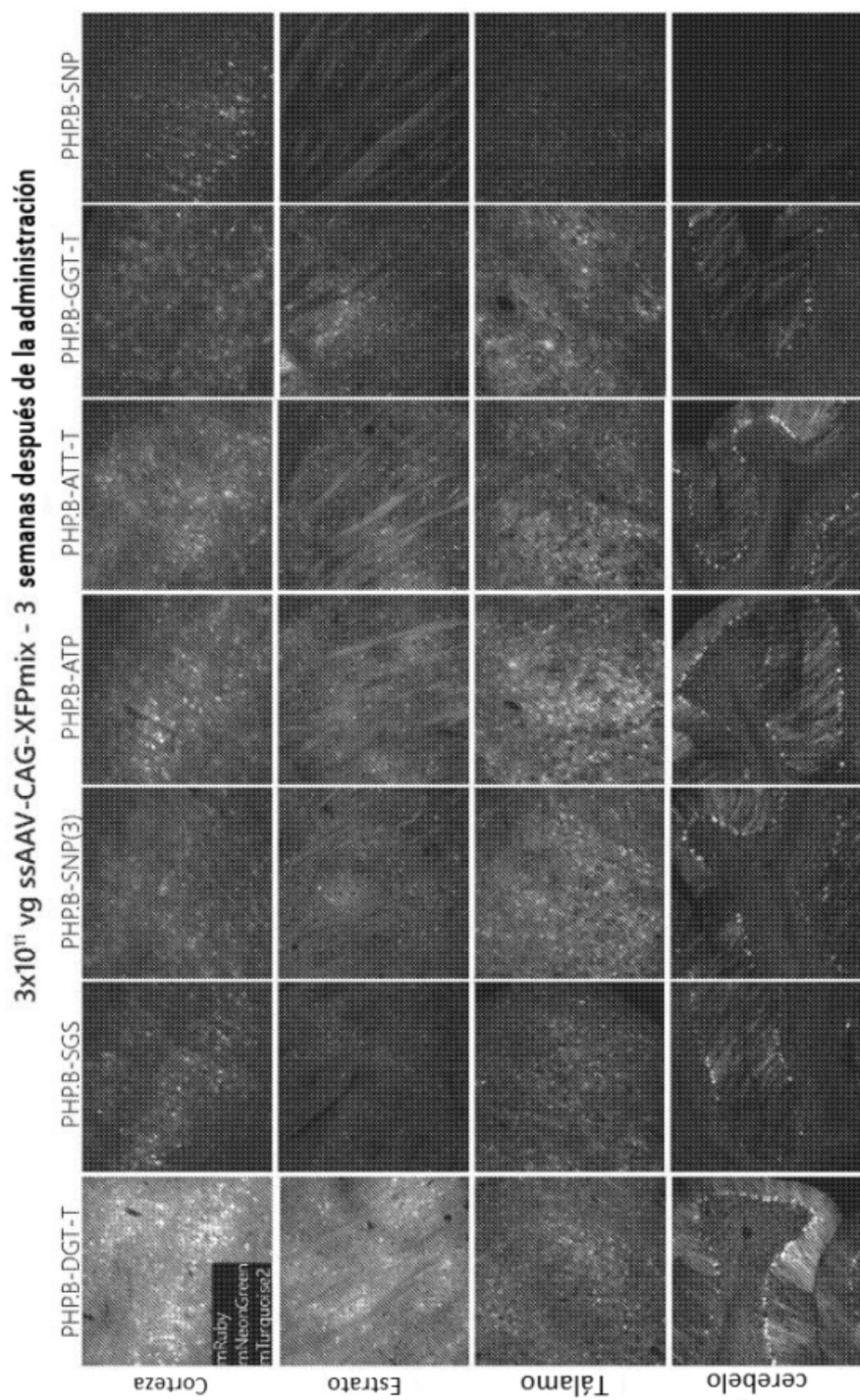


FIG. 17

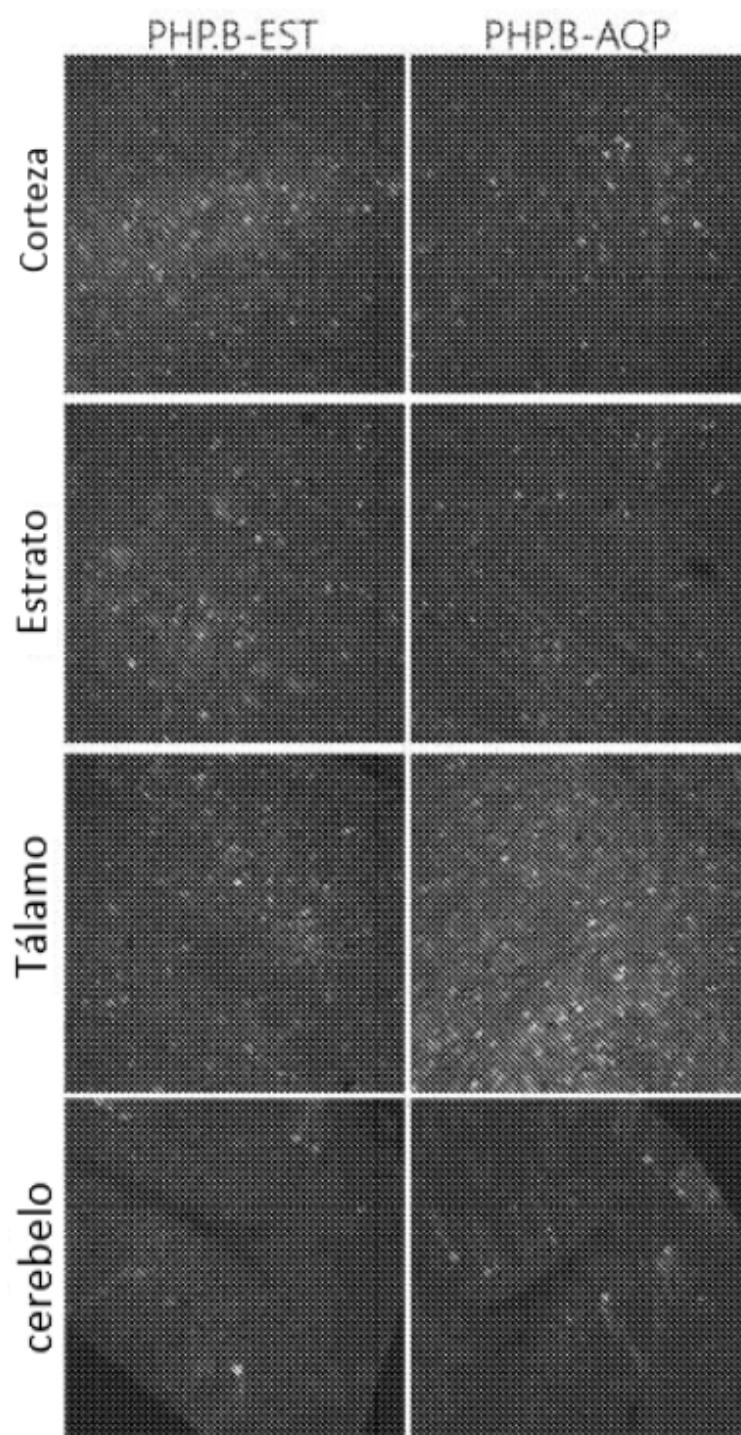


FIG. 18

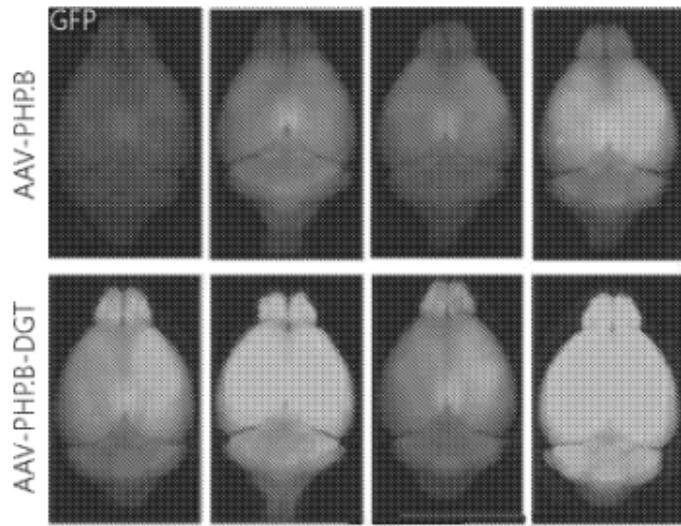


FIG. 19A

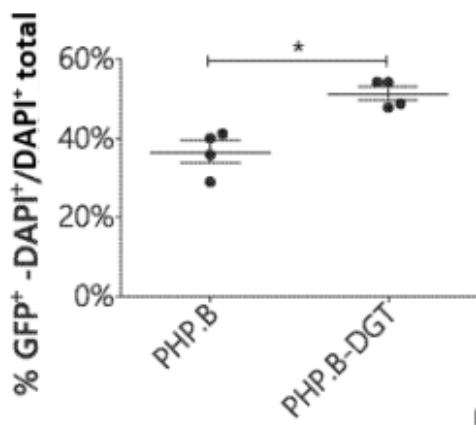


FIG. 19B

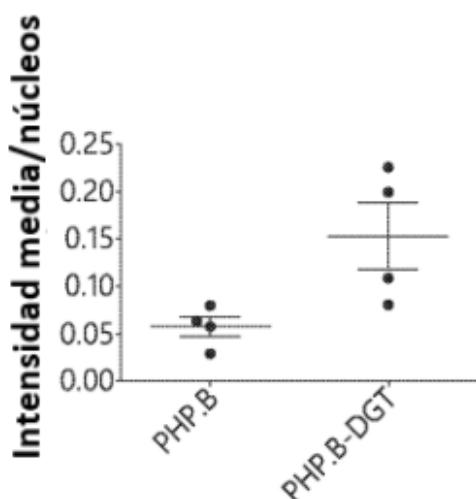
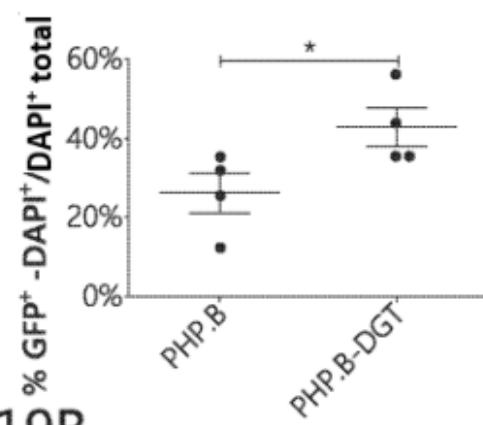
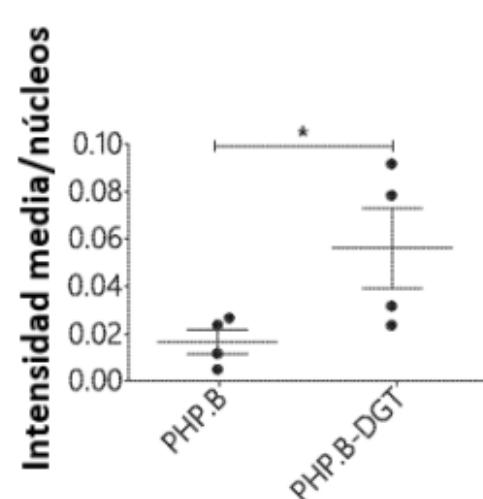
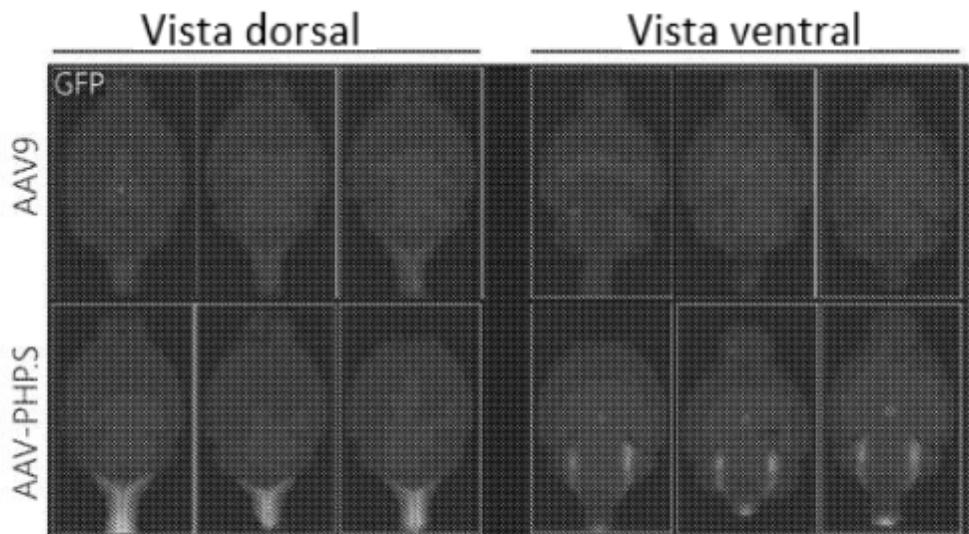


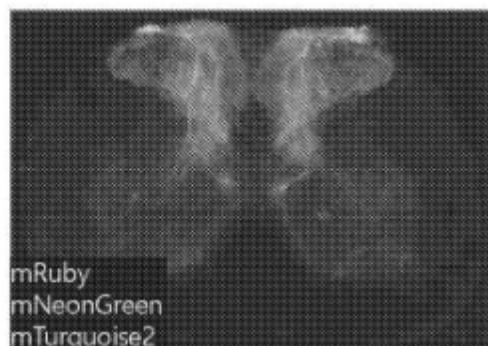
FIG. 19C



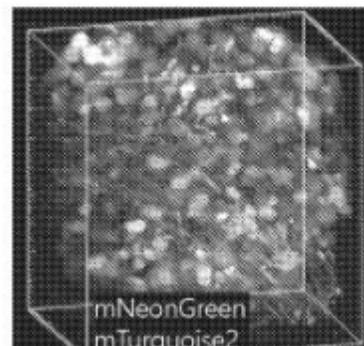


Fluorescencia GFP – imágenes de cerebro entero

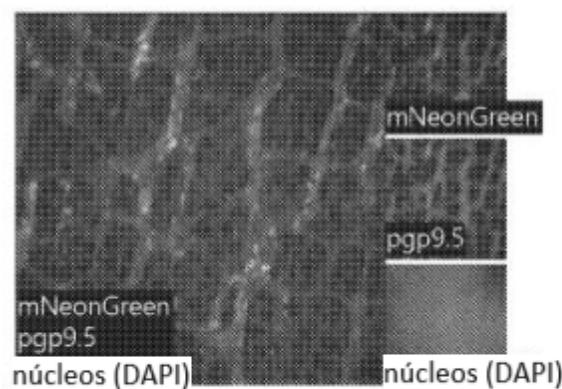
FIG. 20A



Médula espinal  
FIG. 20B



Ganglios de raiz dorsal  
FIG. 20C



Intestino  
FIG. 20D

<b>PHP.B 7-mer - insertado entre AA 588-589</b>	<b>XXXX1</b>	SXXXX <u>LAVPFPKAQAAQ</u> (SEQ ID NO: 49)
	<b>XXXX2</b>	<u>SAQXXXXVPFPKAQAAQ</u> (SEQ ID NO: 50)
	<b>XXXX3</b>	<u>SAQTLXXXXFKAKQAAQ</u> (SEQ ID NO: 51)
<b>PHP.B SAQTLAVPFPKAQAAQ (SEQ ID NO: 48)</b>	<b>XXXX4</b>	<u>SAQTLAVVXXXXAQAQ</u> (SEQ ID NO: 52)
	<b>XXXX5</b>	<u>SAQTLAVPFPXXXXAQ</u> (SEQ ID NO: 53)

FIG. 21

**FIG. 22A**

AAV- PHP.N VP1 Secuencia de cápside  
SEQ ID NO: 46

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLYGPGNGLDKGEP  
VNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDETSFGGNLGRAVFOAKKRILLEP  
IGLVEEAAKTAPGKKRPEQSPOEFDSAGIGKSGAQPAKKRLNFQGTGDTESVPDFQPIGEPP  
AAPSGVGSLTMASGGAPVADNNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDVRVITTSRTWALPTYNHH  
YKQISNSTSGSSNDNAYFGYSTPwgYFDENRFHCHFSPRDWQRLINFKLFNT  
QVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVETDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLD  
GSQAVGRSSFYCLEFPSQMLRTGNNFQFSYEVENVPFHSSYAHQSLSDRLMNPLIDQYLYYL  
RTINGSGONQQTTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTWTQNNNSEFAWPGASSWALN  
GRNSLMNPGPAMASHKEGEDDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATES  
YQQVATNHQSDSTLLAVPFKAQAQTGWVNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKI PHTDGNFHPS  
IMGGFGMKHPPPQILLIKNTPVADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP  
EIQYTSNYYKSNNVFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

**FIG. 22B**

AAV- PHP.S VP1 Secuencia de cápside  
SEQ ID NO: 47

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLYGPGNGLDKGEP  
VNAADAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDETSFGGNLGRAVFOAKKRILLEP  
IGLVEEAAKTAPGKKRPEQSPOEFDSAGIGKSGAQPAKKRLNFQGTGDTESVPDFQPIGEPP  
AAPSGVGSLTMASGGAPVADNNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDVRVITTSRTWALPTYNHH  
YKQISNSTSGSSNDNAYFGYSTPwgYFDENRFHCHFSPRDWQRLINFKLFNT  
QVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVETDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPOQYGYLTLD  
GSQAVGRSSFYCLEFPSQMLRTGNNFQFSYEVENVPFHSSYAHQSLSDRLMNPLIDQYLYYL  
RTINGSGONQQTTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTWTQNNNSEFAWPGASSWALN  
GRNSLMNPGPAMASHKEGEDDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATES  
YQQVATNHQSAQQAVRTSLLAQAQTGWNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKI PHTDGNFHPS  
IMGGFGMKHPPPQILLIKNTPVADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP  
EIQYTSNYYKSNNVFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

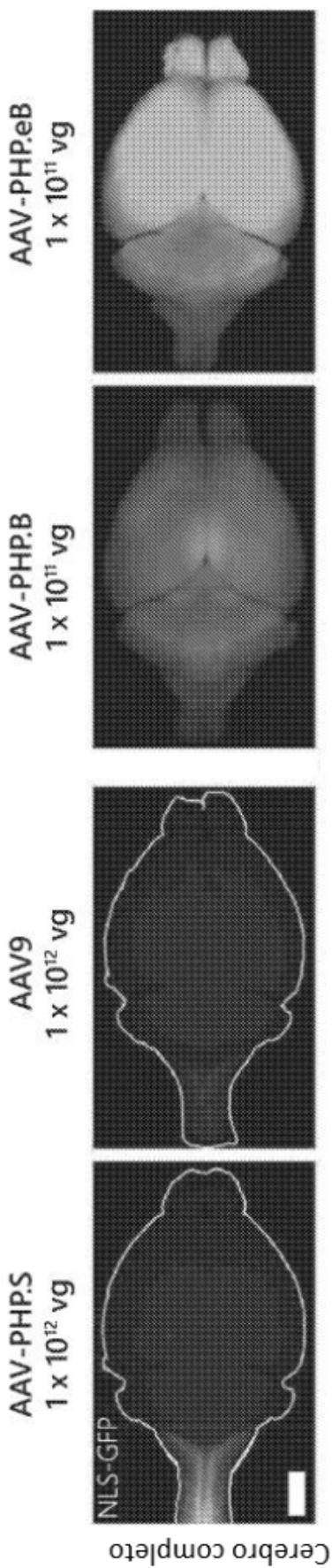


FIG. 23A

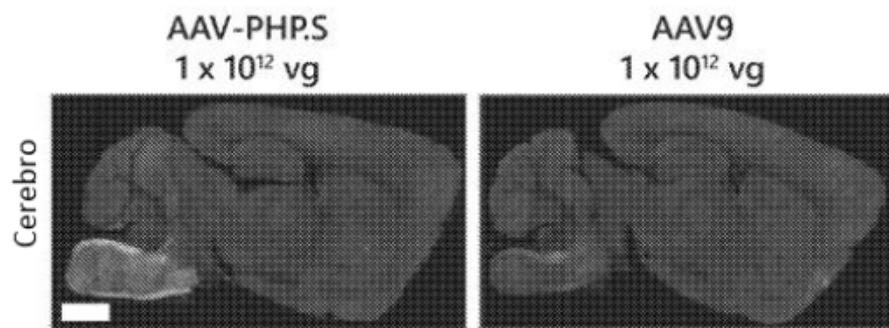


FIG. 23B

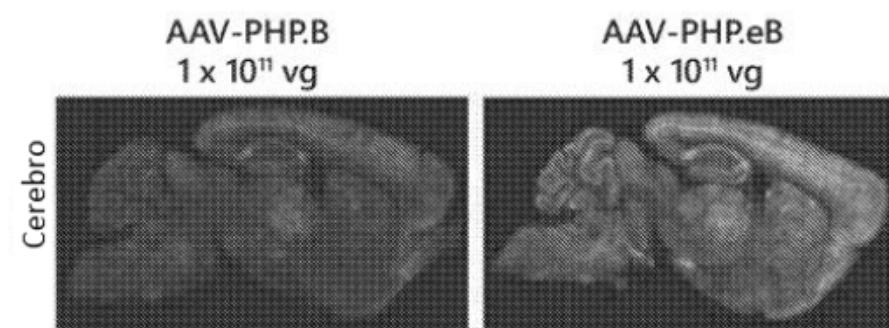


FIG. 23C

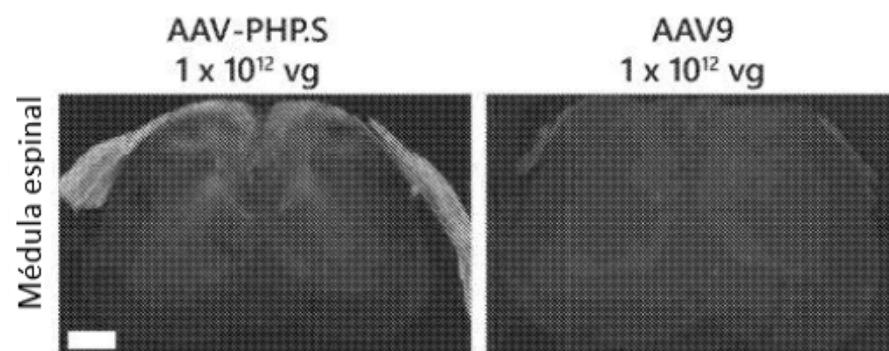


FIG. 23D

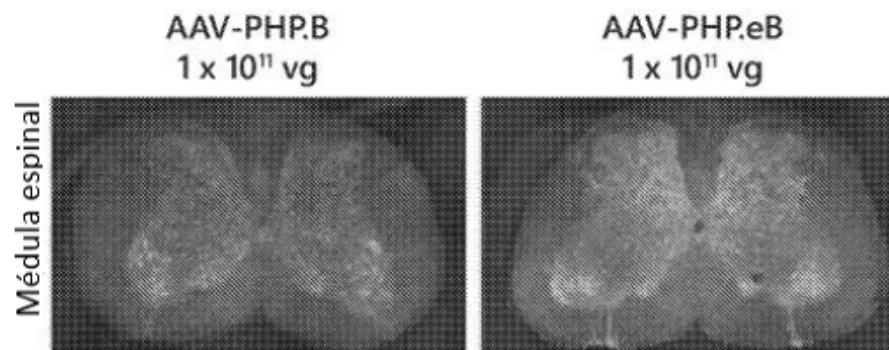


FIG. 23E

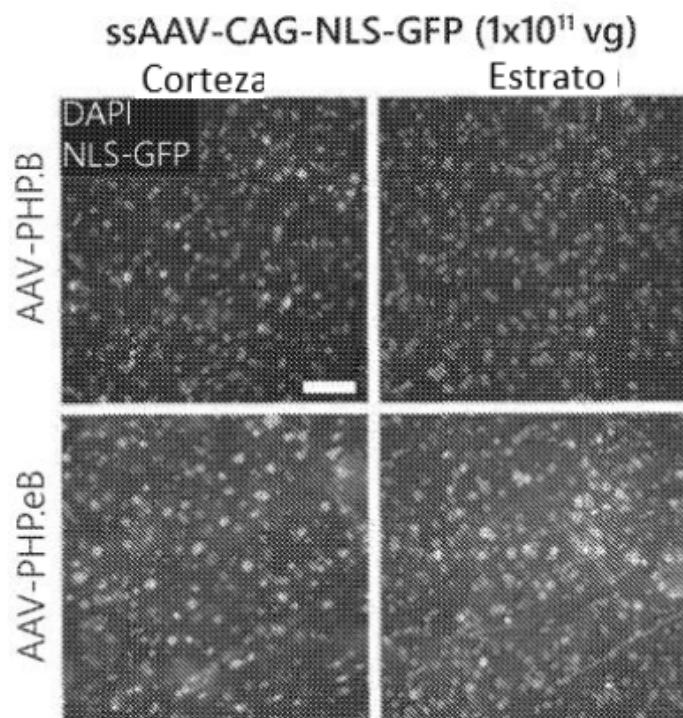


FIG. 24A

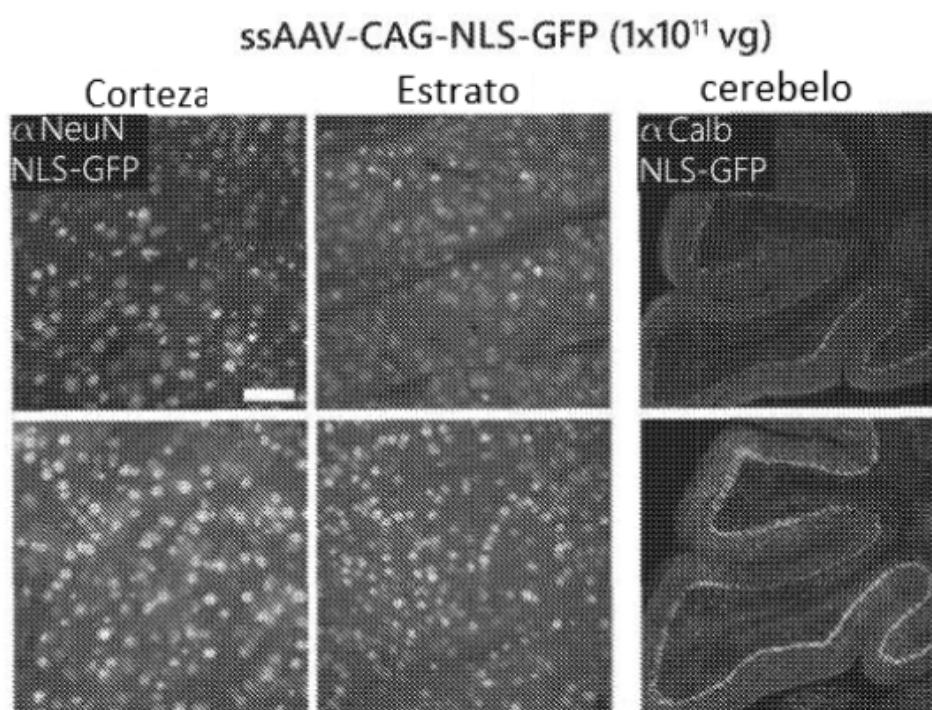


FIG. 24B

FIG. 24C

OPHP.B      OPHP.eB

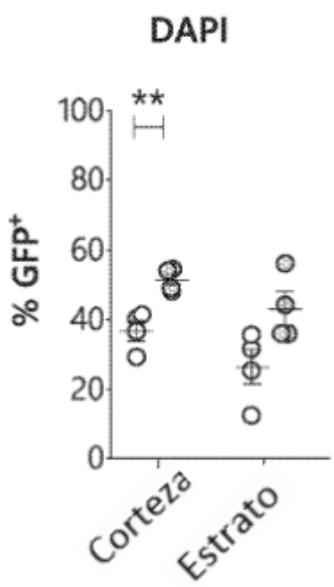


FIG. 24D

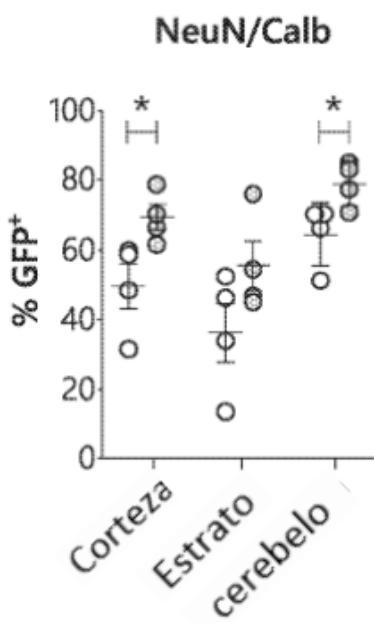


FIG. 24E

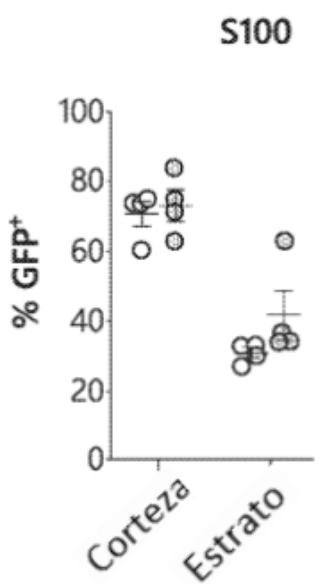


FIG. 24F

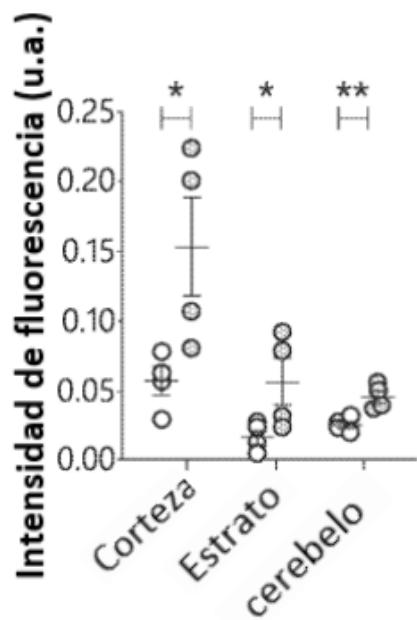


FIG. 24G

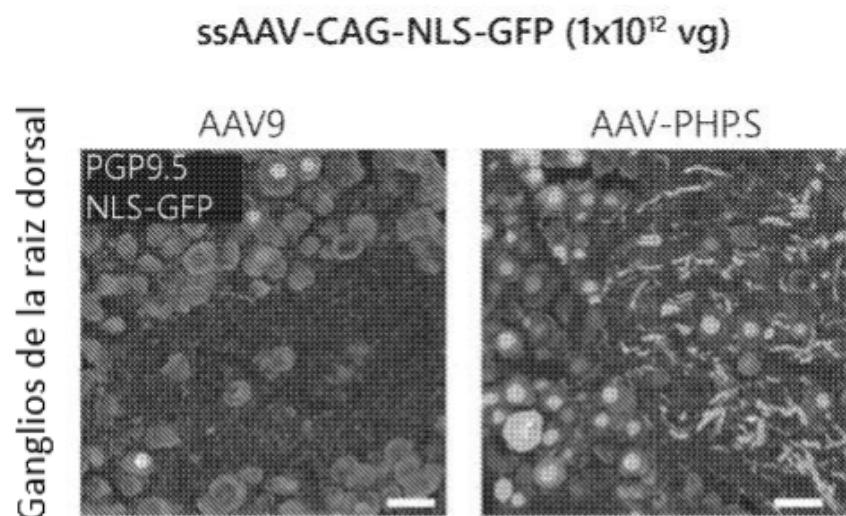


FIG. 25A

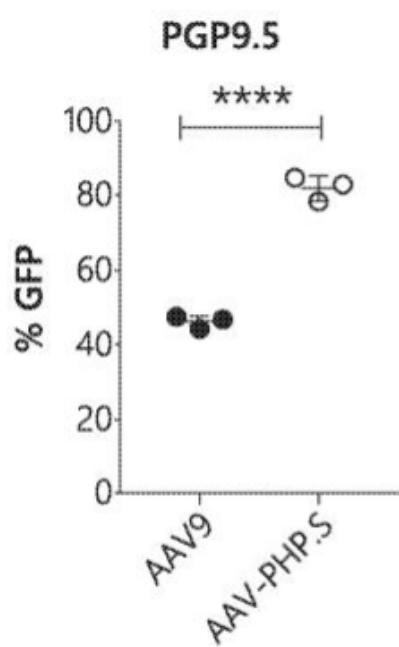


FIG. 25B

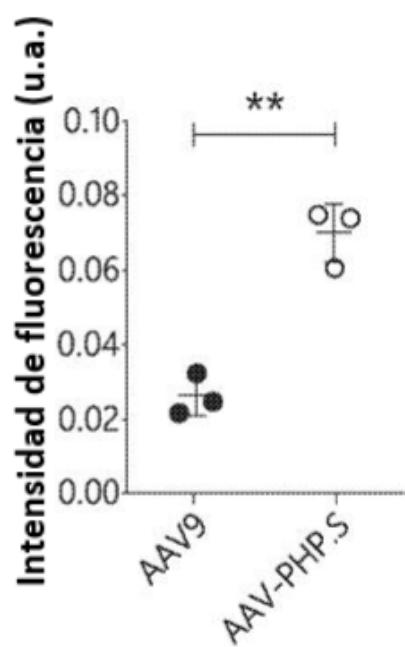


FIG. 25C

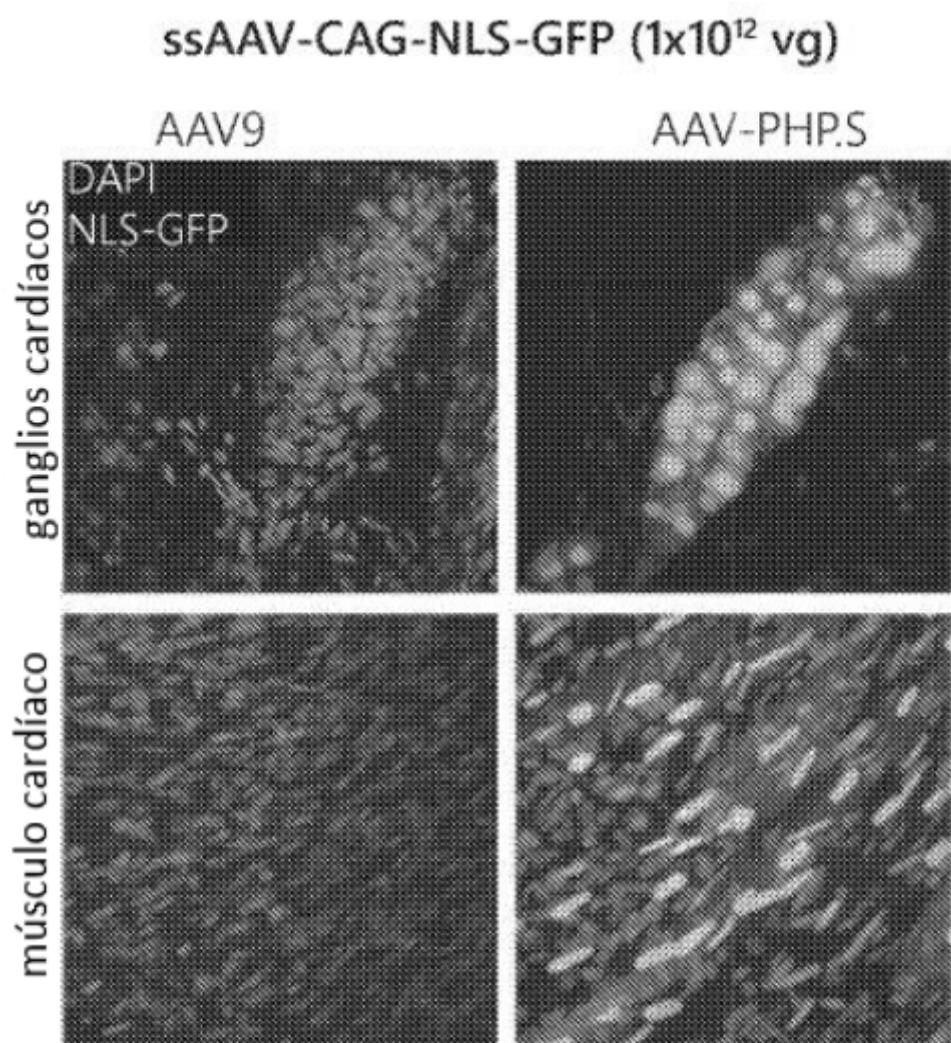


FIG. 25D