

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 971 872**

(51) Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)  
**A61K 35/76** (2015.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2018 PCT/US2018/019992**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2018 WO18160582**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2018 E 18711202 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3589730**

---

(54) Título: **Vector de clado F de virus adenoasociado (AAV) y usos para el mismo**

(30) Prioridad:

**28.02.2017 US 201762464748 P**  
**27.11.2017 US 201762591002 P**  
**05.01.2018 US 201862614002 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.06.2024**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**WILSON, JAMES, M.;**  
**WANG, QIANG;**  
**GILES, APRIL y**  
**TURNER, KEVIN**

(74) Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

**Observaciones:**

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 971 872 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

Vector de clado F de virus adenoasociado (AAV) y usos para el mismo

**5 Declaración con respecto a la investigación o el desarrollo con fondos federales**

La presente solicitud contiene trabajos respaldados por la Agencia de Proyectos de Investigación Avanzada de Defensa (DARPA, por sus siglas en inglés) a tenor de W911NF-13-2-0036. El gobierno de los Estados Unidos puede tener determinados derechos sobre la presente invención.

**10 Antecedentes de la invención**

El virus adenoasociado (AAV, por sus siglas en inglés), un miembro de la familia de los parvovirus, es un virus pequeño no envuelto, icosaédrico, con genomas de ADN lineal monocatenario (ADNmC) de aproximadamente 4,7 kilobases (kb) de longitud. El genoma de tipo silvestre comprende repeticiones terminales invertidas (ITR, por sus siglas en inglés) en ambos extremos de la cadena de ADN y dos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés): rep y cap. Rep se compone de cuatro genes superpuestos que codifican proteínas rep necesarias para el ciclo de vida del AAV, y cap contiene secuencias de nucleótidos superpuestos de proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3, que se autoensamblan para formar una cápside de simetría icosaédrica.

20 AAV se asigna al género, *Dependovirus*, porque el virus se descubrió como contaminante en reservas de adenovirus purificadas. El ciclo de vida de AAV incluye una fase latente en la que los genomas de AAV, después de la infección, se integran específicamente en el sitio en los cromosomas del hospedador y una fase infecciosa en la que, después de la infección por adenovirus o por virus del herpes simple, los genomas integrados posteriormente se rescatan, replican y empaquetan en virus infecciosos. Las propiedades de no patogenia, el amplio intervalo de infectividad del hospedador, incluyendo las células que no se dividen, y la posible integración cromosómica específica en el sitio hacen que el AAV sea una herramienta atractiva para la transferencia de genes.

30 Se han descrito vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV, por sus siglas en inglés) derivados del parvovirus humano con replicación defectuosa como vehículos adecuados para el suministro de genes. Normalmente, los genes rep y el gen cap funcionales se eliminan del vector, dando como resultado un vector incompetente para la replicación. Estas funciones se proporcionan durante el sistema de producción de vectores, pero están ausentes en el vector final.

35 Hasta la fecha, se han producido varios AAV diferentes bien caracterizados y aislados de humanos o primates no humanos (NHP, por sus siglas en inglés). Se ha descubierto que los AAV de diferentes serotipos presentan diferentes eficiencias de transfección y presentan tropismo por diferentes células o tejidos. Se han descrito muchos clados de AAV diferentes en el documento WO 2005/033321, incluyendo el clado F, que en el mismo se identifica por tener solamente tres miembros, AAV9, AAVhu31 y AAVhu32.

40 Se proporciona un análisis estructural de AAV9 en M. A. DiMattia et al., J. Virol. (Junio de 2012) vol. 86 N.º 12 6947-6958. Este artículo publica que AAV9 tiene 60 copias (en total) de las tres proteínas variables (vp) codificadas por el gen cap y tienen secuencias superpuestas. Estas incluyen VP1 (87 kDa), VP2 (73 kDa) y VP3 (62 kDa), que están presentes en una relación prevista de 1:1:10, respectivamente. Toda la secuencia de VP3 está dentro de VP2 y toda la VP2 está dentro de VP1. VP1 tiene un dominio N-terminal único. Las coordenadas refinadas y los factores de estructura están disponibles con el N.º de registro 3UX1 de la base de datos RCSB PDB.

50 Se han modificado por ingeniería genética varias variantes diferentes de AAV9 para el desvió o el direccionamiento a diferentes tejidos. Véase, por ejemplo, N. Pulichería, "Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer", Molecular Therapy, Vol. 19, N.º 6, págs. 1070-1078 (junio de 2011)). También se ha publicado el desarrollo de variantes de AAV9 para suministrar genes a través de la barrera hematoencefálica. Véase, por ejemplo, B.E. Deverman et al., Nature Biotech, Vol. 34, N.º 2, págs. 204 - 211 (publicado en línea el 1 de febrero de 2016) y el comunicado de prensa de Caltech, A. Wetherston, [www.neurology-central.com/2016/02/10/successful-delivery-of-genes-through-the-blood-brain-barrier/](http://www.neurology-central.com/2016/02/10/successful-delivery-of-genes-through-the-blood-brain-barrier/), al que se accedió el 5 de octubre de 2016. Véanse, además, los documentos WO2015/164757, WO 2016/0492301 y US 8.734.809.

55 Lo que es deseable son construcciones a base de AAV para el suministro de moléculas heterólogas.

**Sumario de la invención**

60 Se describen secuencias de rep y cápside AAVhu68 novedosas, que son útiles en la fabricación y en vectores para el suministro de moléculas de ácido nucleico a las células hospedadoras.

65 En el presente documento se proporciona un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende una cápside AAVhu68 y un genoma de vector en la cápside AAVhu68, en donde (A) el genoma de vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV y

- entre las ITR una secuencia de ácido nucleico no de AAV que codifica un producto unido operativamente a secuencias que dirigen la expresión del producto en una célula diana de mamífero; y (8) la cápside AAVhu68 comprende proteínas vp1 de AAVhu68, proteínas vp2 de AAVhu68 y proteínas vp3 de AAVhu68 producidas a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde 5 las proteínas AAVhu68vp1 comprenden un ácido glutámico en la posición 67 y una valina en la posición 157 y las proteínas AAVhu68vp2 comprenden una valina en la posición 157 basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2.
- La cápside AAVhu68 puede comprender subpoblaciones de proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 10 de AAVhu68, en donde las subpoblaciones de las proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAV hu68 comprenden al menos del 50 % a 100 % de asparraginas (N) desamidadas en los pares asparragina - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, con respecto a los aminoácidos en SEQ ID NO: 2, en donde las asparraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido 15 aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos, según se determina usando espectrometría de masas.
- En el presente documento también se proporciona un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende 20 una cápside AAVhu68 y un genoma de vector en la cápside AAVhu68, en donde (A) el genoma de vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV y entre las ITR una secuencia de ácido nucleico no de AAV que codifica un producto unido operativamente a secuencias que dirigen la expresión del producto en una célula diana de mamífero; y (8) la cápside AAVhu68 comprende poblaciones heterogéneas de proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAVhu68,
- en donde las proteínas vp1 de AAVhu68 son los aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp1) que comprenden 25 un ácido glutámico en la posición 67 y una valina en la posición 157 y comprenden además subpoblaciones de proteínas vp1 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2,
- en donde las proteínas vp2 de AAVhu68 son los aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp2) que comprenden 30 una valina en la posición 157 y comprenden además subpoblaciones de proteínas vp2 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2, y
- en donde las proteínas vp3 de AAVhu68 son los aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp3), que comprenden 35 subpoblaciones de proteínas vp3 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2,
- en donde las subpoblaciones de las proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAV hu68 comprenden 40 al menos del 50 % a 100 % de asparraginas (N) desamidadas en los pares asparragina - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, con respecto a los aminoácidos en SEQ ID NO: 2, en donde las asparraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos, según se determina usando espectrometría de masas.
- Cuatro restos (N57, N329, N452, N512) presentan habitualmente altos niveles de desamidación. Los restos adicionales (N94, N253, N270, N304, N409, N477 y Q599) también muestran niveles de desamidación de hasta el ~20 % en diversos lotes.
- Las asparraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de 45 ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos. La glutamina o glutaminas desamidadas se pueden desamidar a ácido ( $\alpha$ )-glutámico, ácido  $\gamma$ -glutámico, un par de interconversión de ácido ( $\alpha$ )-glutámico/ácido  $\gamma$ -glutámico, o combinaciones de los mismos.
- En determinadas realizaciones, la cápside AAVhu68 comprende subpoblaciones que tienen uno o más de: (a) al 50 menos el 65 % de las asparraginas (N) en los pares asparragina - glicina ubicados en las posiciones 57 de las proteínas vp1 están desamidadas, según se determina mediante espectrometría de masas, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2; (b) al menos el 75 % de las N en los pares asparragina - glicina en la posición 329 55 de las proteínas vp1, v2 y vp3 están desamidadas, según se determina mediante espectrometría de masas, basándose en la numeración de restos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (c) al menos el 50 % de las N en los pares asparragina - glicina en la posición 452 de las proteínas vp1, v2 y vp3 están desamidadas, según se determina mediante espectrometría de masas, basándose en la numeración de restos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y/o (d) al menos el 75 % de las N en los pares asparragina - glicina en la posición 512 60 de las proteínas vp1, v2 y vp3 están desamidadas, según se determina mediante espectrometría de masas, basándose en la numeración de restos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la cápside hu68 comprende una subpoblación de vp1 en la que del 75 % al 100 % de las N en la posición 57 de las proteínas vp1 están desamidadas, según se determina usando espectrometría de masas. En determinadas realizaciones, la cápside hu68 comprende una subpoblación de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o 65 proteínas vp3 en las que del 75 % al 100 % de las N en la posición 329, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidadas según se determina usando espectrometría de masas. En determinadas realizaciones,

la cápside hu68 comprende una subpoblación de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o proteínas vp3 en las que del 75 % al 100 % de las N en la posición 452, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidadas según se determina usando espectrometría de masas. En determinadas realizaciones, la cápside hu68 comprende una subpoblación de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o proteínas vp3 en las que del 75 % al 100 % de las N en la posición 512, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidadas según se determina mediante espectrometría de masas. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas es SEQ ID NO: 1, o una secuencia de al menos el 80 % a al menos el 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En determinadas realizaciones, la secuencia es al menos del 80 % al 97 % idéntica a SEQ ID NO: 1. La cápside rAAVhu68 puede comprender además al menos una subpoblación de proteínas vp1, vp2 y/o vp3 que tienen modificaciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que comprenden al menos aproximadamente del 50 al 100 % de desamidación de al menos cuatro posiciones seleccionadas de una o más de N57, 329, 452, 512 o combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, la cápside hu68 comprende subpoblaciones de proteínas vp1, vp2 y/o vp3 que además comprenden del 1 % a aproximadamente el 40 % de desamidación de las asparraginas en al menos una o más de las posiciones N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709 o combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, la cápside hu68 comprende subpoblaciones de proteínas vp1, vp2 y/o vp3 que comprenden además una o más modificaciones seleccionadas de una o más modificaciones en uno o más de los siguientes: lisina acetilada, serina y/o treonina fosforilada, ácido aspártico isomerizado, triptófano y/o metionina oxidados o un aminoácido amidado según se determina mediante espectrometría de masas. La rAAVhu68 puede comprender aproximadamente 60 proteínas de la cápside totales en una relación de aproximadamente 1 proteína vp1 a aproximadamente 1 a 1,5 proteínas vp2 a 3 a 10 proteínas vp3. La cápside AAVhu68 puede comprender aproximadamente 60 proteínas de la cápside totales en una relación de aproximadamente 1 proteína vp1 a aproximadamente 1 proteína vp2 a 3 a 9 proteínas vp3. En determinadas realizaciones, el genoma de vector comprende secuencias ITR de AAV de una fuente de AAV distinta de AAVhu68.

En determinadas realizaciones, se proporciona una composición que comprende una población mixta de virus adenoasociado hu68 recombinante (rAAVhu68), en donde cada uno de los rAAVhu68 se selecciona independientemente de un rAAVhu68 como se describe en el presente documento. La cápside AAVhu68 promedio puede comprender aproximadamente 60 proteínas de la cápside totales en una relación de aproximadamente 1 proteína vp1 a aproximadamente 1 a 1,5 proteínas vp2 a 3 a 10 proteínas vp3. La cápside AAVhu68 promedio puede comprender aproximadamente 60 proteínas de la cápside totales en una relación de aproximadamente 1 proteína vp1 a aproximadamente 1 proteína vp2 a 3 a 6 proteínas vp3. En determinadas realizaciones, la composición se formula para el suministro intratecal y el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto para el suministro al sistema nervioso central. En determinadas realizaciones, la composición se formula para el suministro intravenoso. El genoma de vector puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-HER2. En determinadas realizaciones, la composición está formulada para el suministro intranasal o intramuscular. Una composición puede comprender al menos una reserva de vector rAAVhu68 y un portador, excipiente y/o conservante opcional. Se proporciona el uso de un rAAVhu68 o una composición como se define en las reivindicaciones para suministrar un producto génico deseado a un sujeto que lo necesite. Un rAAVhu68 como se define en las reivindicaciones se puede producir usando un sistema de producción de rAAV como se describe a continuación. El sistema de producción comprende: (a) una secuencia de ácido nucleico de la cápside AAVhu68 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) una molécula de ácido nucleico adecuada para el empaquetamiento en la cápside AAVhu68, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV y una secuencia de ácido nucleico no de AAV que codifica un producto génico unido operativamente a secuencias que dirigen la expresión del producto en una célula hospedadora; y (c) suficientes funciones rep de AAV y funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento de la molécula de ácido nucleico en la cápside AAVhu68 recombinante. La secuencia de ácido nucleico de (a) puede comprender al menos SEQ ID NO: 1, o una secuencia de al menos el 70 % a al menos el 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El sistema puede comprender además una secuencia de ácido nucleico de aproximadamente el nt 607 a aproximadamente el nt 2211 de SEQ ID NO: 1 que codifica la vp3 de AAVhu68 de aproximadamente el aa 203 a aproximadamente el aminoácido 736 de SEQ ID NO: 2. El sistema puede comprender células de riñón embrionario humanas 293 o un sistema de baculovirus.

Se describe un método para reducir la desamidación de una cápside AAVhu68, pero no se reivindica en el presente documento. El método comprende producir una cápside AAVhu68 a partir de una secuencia de ácido nucleico que contiene codones de vp de AAVhu68 modificados, comprendiendo la secuencia de ácido nucleico codones de glicina modificados independientemente en uno a tres de los pares arginina - glicina ubicados en la posición 58, 330, 453 y/o 513 en SEQ ID NO: 2, de manera que el codón modificado codifica un aminoácido distinto de la glicina. El método puede comprender producir una cápside AAVhu68 a partir de una secuencia de ácido nucleico que contiene codones de vp de AAVhu68 modificados, comprendiendo la secuencia de ácido nucleico codones de arginina modificados independientemente en uno a tres de los pares arginina - glicina ubicados en la posición 57, 329, 452 y/o 512 en SEQ ID NO: 2, de manera que el codón modificado codifica un aminoácido distinto de la arginina.

Cada codón modificado puede codificar un aminoácido diferente.

Dos o más codones modificados pueden codificar el mismo aminoácido. Una cápside AAVhu68 mutante como se describe en el presente documento puede contener una mutación en un par arginina - glicina, de manera que la glicina se cambia a una alanina o una serina. Una cápside AAVhu68 mutante puede contener uno, dos o tres 5 mutantes donde el AAVhu68 de referencia contiene de forma nativa cuatro pares NG. En determinadas realizaciones, una cápside AAVhu68 mutante contiene solamente una única mutación en un par NG. Una cápside de AAV mutante puede contener mutaciones en dos pares NG diferentes. Una cápside AAVhu68 mutante puede 10 contener una mutación en dos pares NG diferentes que se ubican en una ubicación estructuralmente separada en la cápside AAVhu68.

10 Es posible que la mutación no esté en la región exclusiva de VP1.

Una de las mutaciones puede estar en la región exclusiva de VP1. Una cápside AAVhu6 mutante puede no 15 contener modificaciones en los pares NG, pero puede contener mutaciones para minimizar o eliminar la desamidación en una o más asparraginas, o una glutamina, ubicadas fuera de un par NG.

Una partícula de AAVhu68 como se define en las reivindicaciones puede expresar un anticuerpo anti-HER2 útil 20 para el tratamiento y/o la profilaxis de cánceres HER2+.

20 Se describe una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína rep de AAVhu68 o un fragmento funcional de la misma bajo el control de secuencias de control reguladoras exógenas que dirigen la expresión de los mismos en una célula hospedadora, pero no se reivindica en el presente documento. La proteína rep puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o un fragmento funcional 25 de la misma.

25 Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

#### Breve descripción de los dibujos

30 La FIG 1 proporciona una alineación que muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside vp1 de AAVhu68 [SEQ ID NO: 16] (rotulada como hu.68.vp1 en la alineación), con AAV9 [SEQ ID NO: 6], AAVhu31 (rotulado hu.31 en alineación) [SEQ ID NO: 10] y AAVhu32 (rotulado hu.32 en alineación) [SEQ ID NO: 11]. En comparación con AAV9, AAVhu31 y AAVhu32, se encontraron dos mutaciones (A67E y A157V) críticas en AAVhu68 y marcadas con un círculo en la FIG.

35 Las FIG 2A-2C proporcionan una alineación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside vp1 de AAVhu68, con AAV9, AAVhu31 [SEQ ID NO: 12] y AAVhu32 [SEQ ID NO: 13].

Las FIG 3A-3B proporcionan gráficos que muestran los rendimientos de AAVhu.68 en comparación con los de AAV9. El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 2. n = 6. El valor de P se calculó y se muestra en las figuras.

40 La FIG 3A muestra los rendimientos de AAVhu.68 y AAV9 del lisado total. El valor de p se calculó como 0,4173 y se determinó que no era significativo.

La FIG 3B muestra los rendimientos de AAVhu.68 y AAV9 del sobrenadante del cultivo. El rendimiento de AAVhu.68 en el sobrenadante es significativamente mayor que el de AAV9 con un valor de p de 0,0003.

45 Las FIG 4A-4C proporcionan una tinción inmunohistoquímica de diversos órganos (corazón, hígado, pulmón y músculo) de ratones a los que se les administraron  $5 \times 10^{11}$  CG de AAVhu68.CB7.nLacZ. Las muestras se prepararon y se procesaron como se describe en el Ejemplo 3. Las muestras se contratiñeron mediante Eosina, mostradas en color rojo. Una tinción positiva para LacZ mostrada en color azul indica una transducción satisfactoria de AAVhu68.

50 La FIG 4A proporciona una tinción inmunohistoquímica de diversos órganos (corazón, hígado, pulmón y músculo) de ratones a los que se les administraron  $5 \times 10^{11}$  CG de AAVhu68.CB7.nLacZ por vía intravenosa (IV). Todos los órganos sometidos a ensayo demostraron transducción de AAVhu68, mientras que se observó un tropismo que favorecía al corazón y al hígado sobre los pulmones y los músculos.

55 La FIG 4B proporciona una tinción inmunohistoquímica de diversos órganos (corazón, hígado, pulmón y músculo) de ratones a los que se les administraron  $5 \times 10^{11}$  CG de AAVhu68.CB7.nLacZ por vía intramuscular (IM). El corazón, el hígado y el músculo demostraron una alta tasa de transducción de AAVhu68, mientras que no se observó transducción detectable en el pulmón.

60 La FIG 4C proporciona una tinción inmunohistoquímica de diversos órganos (corazón, hígado, pulmón y músculo) de ratones a los que se les administraron  $5 \times 10^{11}$  CG de AAVhu68.CB7.nLacZ por vía intranasal (IN). Se observó transducción dispersa en el corazón, el hígado, el músculo y el pulmón.

65 Las FIG 5A-5C proporcionan imágenes microscópicas fluorescentes de diversas regiones del cerebro (hipocampo, FIG 5A; corteza motora, FIG 5B; y cerebelo, FIG 5C) de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP o AAV9.GFP en dosis de  $1 \times 10^{10}$  CG o  $1 \times 10^{11}$  CG. Las muestras se prepararon y se procesaron como se describe en el Ejemplo 4. Una señal positiva de GFP mostrada en color verde indica una transducción satisfactoria de los vectores de AAV.

65 La FIG 5A proporciona imágenes microscópicas fluorescentes de portaobjetos de hipocampo de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP o AAV9.GFP a las dosis de  $1 \times 10^{10}$  CG o  $1 \times 10^{11}$  CG. Se proporcionaron

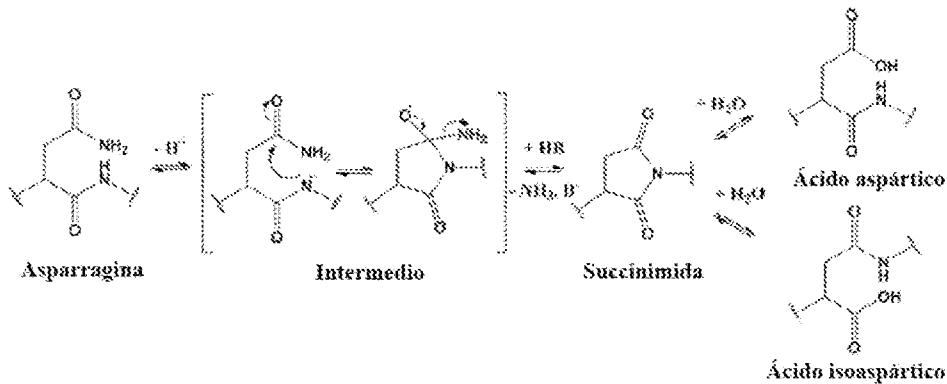
- como control negativo las muestras correspondientes de ratones sin tratar teñidas con colorante de ácido nucleico mostradas en color azul. La transducción de los vectores AAV se observó en todas las muestras sometidas a ensayo excepto en una de ratones inyectados con  $1\times10^{10}$  CG de AAV9.GFP.
- 5 La FIG 5B proporciona imágenes microscópicas fluorescentes de cortezas motoras de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP o AAV9.GFP a las dosis de  $1\times10^{10}$  CG o  $1\times10^{11}$  CG. Se observó una mejor transducción de AAVhu68.GFP en comparación con la de AAV9.
- 10 La FIG 5C proporciona imágenes microscópicas fluorescentes de portaobjetos de cerebelo de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP o AAV9.GFP a las dosis de  $1\times10^{10}$  CG o  $1\times10^{11}$  CG. Se observó una transducción satisfactoria de AAVhu68.GFP cuando a los ratones se les inyectaron  $1\times10^{11}$  CG del vector.
- 15 10 Las FIG 6A-6D proporcionan imágenes microscópicas de diversos órganos (hígado, riñón, corazón y páncreas) de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP por vía intravenosa. Las muestras se prepararon y se procesaron como se describe en el Ejemplo 4. Una señal positiva de GFP mostrada en color verde indica una transducción satisfactoria de dichos vectores de AAV. Se proporcionaron imágenes de campo claro mostradas en blanco y negro para la morfología de los órganos, mientras que el canal fluorescente de color rojo correspondiente se proporcionó como control negativo cuando correspondía.
- 20 15 La FIG 6A proporciona imágenes microscópicas de una sección de hígado representativa de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP por vía intravenosa. Se observó la señal positiva mostrada en color verde.
- 25 20 La FIG 6B proporciona imágenes microscópicas de una sección de riñón representativa de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP por vía intravenosa. Se observó la señal positiva mostrada en color verde.
- 30 25 La FIG 6C proporciona imágenes microscópicas de una sección de corazón representativa de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP por vía intravenosa. Se observó la señal positiva mostrada en color verde.
- 35 30 La FIG 6D proporciona imágenes microscópicas de una sección de páncreas representativa de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP por vía intravenosa. Se observó la señal positiva mostrada en color verde.
- 40 35 La FIG 7 es una imagen de un aparato para el suministro intracisternal, incluyendo una aguja introductora opcional para el método de inserción coaxial, que incluye una jeringa de vector de  $10\text{ cm}^3$ , una jeringa de descarga precargada de  $10\text{ cm}^3$ , un conjunto de extensión de conector en T, una aguja espinal de 22G x 12,7 cm (5"), una aguja introductora opcional de 18G x 8,89 cm (3,5").
- 45 40 Las FIG 8A-8B ilustran el rendimiento de producción para dos vectores AAVhu68 diferentes preparados a pequeña escala (FIG. 8A) y a escala muy grande (mega, FIG. 8B) en comparación con vectores que tienen cápsides diferentes. Los datos para las preparaciones de vectores a pequeña escala se generaron usando vectores que tenían una cápside AAVhu68, AAV9, AAV8 o AAV8triple y que tenían un genoma de vector que comprendía un promotor de citomegalovirus (CMV), una secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga y una poli A de SV40 (CMV.ffLuciferasa.SV40). Las preparaciones a mega escala se evaluaron usando vectores AAVhu68, AAV9, AAV8 o AAV8triple que tenían un genoma de vector que tenía un promotor de CMV, un intrón, una secuencia codificante de inmunoadhesina (201Ig IA) y una poli A de SV40.
- 50 45 La FIG 9 proporciona la pureza de producción para vectores AAVhu68 preparados a mega escala en comparación con vectores que tenían diferentes cápsides, incluyendo AAV8triple, AAV9 y AAV8. Las preparaciones se evaluaron usando vectores AAVhu68, AAV9, AAV8 o AAV8triple que tenían un genoma de vector que comprendía un promotor de CMV, un intrón, una secuencia codificante de inmunoadhesina (201Ig IA) y una poli A de SV40.
- 55 50 Las FIG 10A-10B proporcionan el nivel de expresión transgénica de vectores AAVhu68 en ratones RAG KO macho ( $n = 5/\text{grupo}$ ) inyectados por vía intramuscular con  $3\times10^{11}$  CG/ratón (FIG 10A) o  $3\times10^{10}$  CG/ratón (FIG 10B) del vector en comparación con el de vectores que tenían cápsides diferentes, incluyendo AAV8triple, AAV9 y AAV8. El transgén expresado por los vectores de rAAV es una secuencia codificante de inmunoadhesina (201Ig IA). El Experimento se realizó como se describe en detalle en el Ejemplo 8.
- 55 55 Las FIG 11A-11B proporcionan el nivel de expresión transgénica de vectores AAVhu68 en el hígado (FIG 11A) o en el músculo (FIG 11B) de ratones C57BL/6J macho ( $n = 5/\text{grupo}$ ) inyectados por vía intramuscular con  $3\times10^{11}$  CG/ratón de vector en comparación con el de vectores que tenían cápsides diferentes, incluyendo AAV8triple, AAV9 y AAV8. El transgén expresado por los vectores de rAAV es la luciferasa de luciérnaga. El Experimento se realizó como se describe en detalle en el Ejemplo 9.
- 55 60 La FIG 12 proporciona el nivel de expresión transgénica de vectores AAVhu68 en macacos cangrejeros machos y hembras inyectados por vía intramuscular con  $1\times10^{13}$  CG/kg de peso corporal del vector en comparación con el de vectores que tenían cápsides diferentes, incluyendo AAV8triple, AAV9 y AAV8. El transgén expresado por los vectores de rAAV es una secuencia codificante de inmunoadhesina (201Ig IA). El Experimento se realizó como se describe en detalle en el Ejemplo 10.

#### **Descripción detallada de la invención**

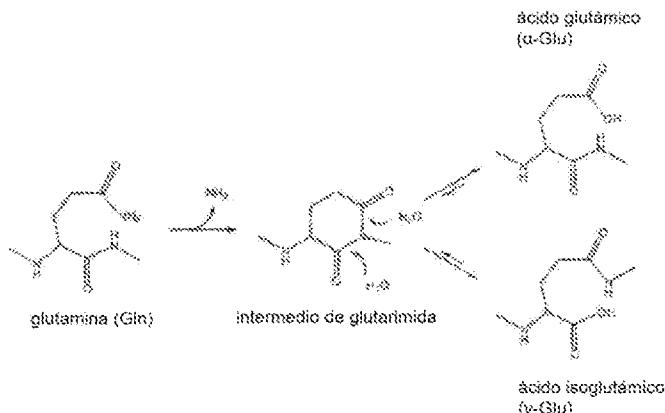
- 60 La divulgación técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la divulgación que no entran en el alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo.
- 65 En el presente documento se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de un virus adenoasociado (AAV) novedoso aislado como se define en las reivindicaciones, que en el presente documento se denomina AAVhu68, que está dentro del clado F. AAVhu68 (anteriormente denominado en el presente documento AAV3G2) varía de otro virus de Clado F AAV9 (SEQ ID NO: 5) en dos aminoácidos codificados en las posiciones

- 67 y 157 de vp1, SEQ ID NO: 2. Por el contrario, los otros AAV de Clado F (AAV9, hu31, hu31) tienen una Ala en la posición 67 y una Ala en la posición 157. Se proporcionan cápsides de AAVhu68 novedosas como se define en las reivindicaciones que tienen valina (Val o V) en la posición 157 basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2 y un ácido glutámico (Glu o E) en la posición 67. La relación de proteínas vp3 en la cápside AAVhu68 con respecto a las proteínas vp1 y vp2 puede ser menor que la descrita anteriormente para las cápsides de AAV9 y otros AAV de clado F.
- 5
- La cápside AAVhu68 puede estar compuesta por proteínas vp1 de AAVhu68, proteínas vp2 de AAVhu68 y proteínas vp3 de AAVhu68 en una relación de aproximadamente 1 vp1 : 1 a aproximadamente 1,5 vp2: a 3 a 10 aproximadamente 10 vp3. Una reserva de virus rAAVhu68 o una población de rAAVhu68 puede ser una composición que tiene un promedio de aproximadamente 60 proteínas vp1, vp2 y vp3 totales en la cápside AAVhu68, que están presentes en una relación promedio vp1:vp2:vp3 de aproximadamente 1: a aproximadamente 1: a aproximadamente 3 a 6. Estas cápsides de AAV descritas en el presente documento son útiles para generar vectores de AAV recombinante (rAAV) que proporcionan un buen rendimiento y/o eficiencia de empaquetamiento, 15 y proporcionan vectores de rAAV útiles para transducir varios tipos diferentes de células y tejidos. Dichos tipos de células y tejidos pueden incluir, sin limitación, pulmón, corazón, músculo, hígado, páncreas, riñón, cerebro, hipocampo, corteza motora, cerebelo, células epiteliales nasales, células del músculo cardíaco o cardiomiositos, hepatocitos, células endoteliales pulmonares, miocitos, células epiteliales pulmonares, células de islotes, células acinares, células renales y neuronas motoras.
- 20
- Un "AAV recombinante" o "rAAV" es una partícula vírica resistente a la ADNasa que contiene dos elementos, una cápside de AAV y un genoma de vector que contiene al menos secuencias no codificantes de AAV empaquetadas dentro de la cápside de AAV. A menos que se especifique de otro modo, esta expresión se puede usar indistintamente con la expresión "vector de rAAV". El rAAV es un "virus de replicación defectuosa" o "vector vírico", 25 ya que carece de cualquier gen rep de AAV funcional o gen cap de AAV funcional y no puede generar progenie. Las únicas secuencias de AAV pueden ser las secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV, normalmente ubicadas en los extremos 5' y 3' del genoma de vector con el fin de permitir que el gen y las secuencias reguladoras ubicadas entre las ITR se empaqueten dentro de la cápside de AAV.
- 30
- Como se usa en el presente documento, un "genoma de vector" se refiere a la secuencia de ácido nucleico empaquetada dentro de la cápside de rAAV que forma una partícula vírica. Una secuencia de ácido nucleico de este tipo contiene secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV. En los ejemplos del presente documento, un genoma de vector contiene, como mínimo, de 5' a 3', una ITR 5' de AAV, una o más secuencias codificantes y una ITR 3' de AAV. Se pueden seleccionar ITR de AAV2, de un AAV de origen distinto al de la 35 cápside, o ITR que no sean de longitud completa. Las ITR pueden ser de la misma fuente de AAV que el AAV que proporciona la función rep durante la producción o un AAV transcomplementario. Además, se pueden usar otras ITR. Además, el genoma de vector contiene secuencias reguladoras que dirigen la expresión de los productos génicos. Se analizan componentes adecuados de un genoma de vector con más detalle en el presente documento.
- 40
- Un rAAVhu68 se compone de una cápside AAVhu68 y un genoma de vector. Una cápside AAVhu68 es un conjunto de una población heterogénea de proteínas vp1, una población heterogénea de proteínas vp2 y una población heterogénea de proteínas vp3. Como se usa en el presente documento cuando se usa para referirse a proteínas de la cápside vp, el término "heterogéneo" o cualquier variación gramatical del mismo, se refiere a una población que consiste en elementos que no son iguales, por ejemplo, que tiene monómeros (proteínas) de vp1, vp2 o vp3 45 con diferentes secuencias de aminoácidos modificadas. La SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia de aminoácidos codificada de la proteína vp 1 de AAVhu68.
- 50
- La cápside AAVhu68 contiene subpoblaciones dentro de las proteínas vp1, dentro de las proteínas vp2 y dentro de las proteínas vp3 que tienen modificaciones de los restos de aminoácidos previstos en SEQ ID NO: 2. Estas subpoblaciones incluyen, como mínimo, determinados restos aspártica desamidada (N o Asn). Por ejemplo, determinadas subpoblaciones comprenden al menos una, dos, tres o cuatro posiciones de aspárticas (N) altamente desamidadas en pares aspártica - glicina en SEQ ID NO: 2 y que opcionalmente comprenden además otros aminoácidos desamidados, en donde la desamidación da como resultado un cambio de aminoácido y otras modificaciones opcionales. En determinadas realizaciones, las subpoblaciones de las proteínas vp1 de AAVhu68, 55 vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAV hu68 comprenden al menos del 50 % a 100 % de aspárticas (N) desamidadas en los pares aspártica - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, con respecto a los aminoácidos en SEQ ID NO: 2, en donde las aspárticas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos, según se determina usando espectrometría de masas. La SEQ ID NO: 14 proporciona una secuencia de aminoácidos de una cápside 60 AAVhu68 modificada, que ilustran posiciones que pueden tener algún porcentaje de aminoácidos desamidados o modificados de otro modo. Las diversas combinaciones de estas y otras modificaciones se describen en el presente documento.
- 65
- Como se usa en el presente documento, una "subpoblación" de proteínas vp se refiere a un grupo de proteínas vp que tiene al menos una característica definida en común y que consiste en al menos un miembro del grupo a menos de todos los miembros del grupo de referencia, a menos que se especifique de otro modo. Por ejemplo,

- una "subpoblación" de proteínas vp1 es al menos una (1) proteína vp1 y menos de todas las proteínas vp1 en una cápside de AAV ensamblada, a menos que se especifique de otro modo. Una "subpoblación" de proteínas vp3 puede ser de una (1) proteína vp3 a menos de todas las proteínas vp3 en una cápside de AAV ensamblada, a menos que se especifique de otro modo. Por ejemplo, las proteínas vp1 pueden ser una subpoblación de proteínas vp; las proteínas vp2 pueden ser una subpoblación separada de proteínas vp, y las vp3 son una subpoblación adicional de proteínas vp en una cápside de AAV ensamblada. En otro ejemplo, las proteínas vp1, vp2 y vp3 pueden contener subpoblaciones que tienen diferentes modificaciones, por ejemplo, al menos una, dos, tres o cuatro asparraginas altamente desamidadas, por ejemplo, en pares asparragina - glicina.
- 5      10     A menos que se especifique de otro modo, altamente desamidada se refiere a al menos el 50 % desamidadas, al menos el 60 % desamidadas, al menos el 65 % desamidadas, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, el 97 %, el 99 %, hasta aproximadamente el 100 % desamidadas en una posición de aminoácido de referencia, en comparación con la secuencia de aminoácidos prevista en la posición de aminoácido de referencia (por ejemplo, al menos el 80 % de las asparraginas en el aminoácido 57 de SEQ ID NO: 2 pueden estar desamidadas basándose en las proteínas vp1 totales o el 20 % de las asparraginas en el aminoácido 409 de SEQ ID NO: 2 pueden estar desamidadas basándose en las proteínas vp 1, vp2 y vp3 totales). Dichos porcentajes se pueden determinar usando técnicas de espectrometría de masas.
- 15      20     Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la desamidación de al menos restos altamente desamidados en las proteínas vp en la cápside AAVhu68 es principalmente de naturaleza no enzimática, estando causada por grupos funcionales dentro de la proteína de la cápside que desamidan las asparraginas seleccionadas y, en menor medida, restos glutamina. El ensamblaje eficiente de la cápside de la mayoría de las proteínas vp1 de desamidación indica que estos acontecimientos ocurren después del ensamblaje de la cápside o que la desamidación en monómeros individuales (vp 1, vp2 o vp3) es bien tolerada estructuralmente y en gran medida no afecta a la dinámica del ensamblaje. La desamidación extensa en la región exclusiva de VP1 (VP1-u) (~aa 1-137), que generalmente se considera ubicada internamente antes de la entrada celular, sugiere que la desamidación de VP puede ocurrir antes del ensamblaje de la cápside.
- 25      30     Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la desamidación de N puede ocurrir a través de que su átomo de nitrógeno de la cadena principal del resto C-terminal realiza un ataque nucleófilo al átomo de carbono del grupo amida de la cadena lateral de Asn. Se cree que se forma un resto de succinimida de anillo cerrado intermedio. El resto de succinimida después realiza una hidrólisis rápida para conducir al producto final ácido aspártico (Asp) o ácido isoaspártico (IsoAsp). Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la desamidación de la asparragina (N o Asn) conduce a un Asp o IsoAsp, que puede interconvertirse a través del intermedio succinimida, por ejemplo, como se ilustra a continuación.
- 35



- 40     Como se proporciona en el presente documento, cada N desamidada de SEQ ID NO: 2 puede ser independientemente ácido aspártico (Asp), ácido isoaspártico (isoAsp), aspartato y/o una combinación interconvertida de Asp e isoAsp, o combinaciones de los mismos. Puede haber presente cualquier relación adecuada de ácido  $\alpha$  e isoaspártico. Por ejemplo, la relación puede ser aspártico a isoaspártico de 10:1 a 1:10, aspártico:isoaspártico aproximadamente 50:50 o aspártico:isoaspártico aproximadamente 1:3 u otra relación seleccionada.
- 45     50     En determinadas realizaciones, una o más glutaminas (Q) en SEQ ID NO: 2 se desamidan a ácido glutámico (Glu), es decir, ácido  $\alpha$ -glutámico, ácido  $\gamma$ -glutámico (Glu) o una combinación de ácido  $\alpha$  y  $\gamma$ -glutámico, que puede interconvertirse a través de un intermedio glutaranimida común. Puede haber presente cualquier relación adecuada de ácido  $\alpha$  y  $\gamma$ -glutámico. Por ejemplo, la relación puede ser  $\alpha$  a  $\gamma$  de 10:1 a 1:10,  $\alpha$ : $\gamma$  aproximadamente 50:50, o  $\alpha$ : $\gamma$  aproximadamente 1:3, u otra relación seleccionada.



Por lo tanto, una cápside rAAVhu68 como se reivindica en el presente documento comprende una cápside AAVhu68 y un genoma de vector en la cápside AAVhu68, en donde (A) el genoma de vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV y entre las ITR una secuencia de ácido nucleico no de AAV que codifica un producto unido operativamente a secuencias que dirigen la expresión del producto en una célula diana de mamífero; y (8) la cápside AAVhu68 comprende proteínas vp1 de AAVhu68, proteínas vp2 de AAVhu68 y proteínas vp3 de AAVhu68 producidas a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde las proteínas AAVhu68vp1 comprenden un ácido glutámico en la posición 67 y una valina en la posición 157 y las proteínas AAVhu68vp2 comprenden una valina en la posición 157 basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2.

La cápside AAVhu68 puede comprender subpoblaciones de proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAVhu68, en donde las subpoblaciones de las proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAV hu68 comprenden al menos del 50 % a 100 % de asparraginas (N) desamidadas en los pares asparragina - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, con respecto a los aminoácidos en SEQ ID NO: 2, en donde las asparraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos, según se determina usando espectrometría de masas.

Como alternativa, la cápside AAVhu68 comprende poblaciones heterogéneas de proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAVhu68,

en donde las proteínas vp1 de AAVhu68 son los aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp1) que comprenden un ácido glutámico en la posición 67 y una valina en la posición 157 y comprenden además subpoblaciones de proteínas vp1 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2,

en donde las proteínas vp2 de AAVhu68 son los aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp2) que comprenden una valina en la posición 157 y comprenden además subpoblaciones de proteínas vp2 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2, y

en donde las proteínas vp3 de AAVhu68 son los aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp3), que comprenden subpoblaciones de proteínas vp3 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2,

en donde las subpoblaciones de las proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAV hu68 comprenden al menos del 50 % a 100 % de asparraginas (N) desamidadas en los pares asparragina - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, con respecto a los aminoácidos en SEQ ID NO: 2, en donde las asparraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos, según se determina usando espectrometría de masas.

La cápside rAAVhu68 puede incluir subpoblaciones dentro de la cápside rAAVhu68 de proteínas vp1, vp2 y/o vp3 con aminoácidos desamidados, incluyendo, como mínimo, al menos una subpoblación que comprende al menos una asparragina altamente desamidada. Además, otras modificaciones pueden incluir la isomerización, particularmente en posiciones seleccionadas de restos ácido aspártico (D o Asp). Otras modificaciones también pueden incluir una amidación en una posición de Asp.

Una cápside AAVhu68 puede contener subpoblaciones de vp1, vp2 y vp3 que tienen de al menos 4 a al menos aproximadamente 25 posiciones de restos de aminoácidos desamidados, de los cuales al menos del 1 al 10 % están desamidados en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada de SEQ ID NO: 2. La mayoría de éstos pueden ser restos N. Sin embargo, los restos Q también pueden estar desamidados.

- Las proteínas vp1, vp2 y vp3 de AAVhu68 normalmente se expresan como variantes de corte y empalme alternativas codificadas por la misma secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de vp1 de longitud completa de SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 1 a 736). Opcionalmente, la secuencia que codifica vp1 se usa sola para expresar las proteínas vp1, vp2 y vp3. Como alternativa, esta secuencia puede coexpresarse con una o más secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de vp3 de AAVhu68 de SEQ ID NO: 2 (aproximadamente los aa 203 a 736) sin la región exclusiva de vp1 (aproximadamente el aa 1 a aproximadamente el aa 137) y/o las regiones exclusivas de vp2 (aproximadamente el aa 1 a aproximadamente el aa 202), o una cadena complementaria a las mismas, el ARNm o ARNt correspondiente (aproximadamente el nt 607 a aproximadamente el nt 2211 de SEQ ID NO: 1), o una secuencia al menos el 70 % a al menos el 99 % (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica los aa 203 a 736 de SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, o como alternativa, la secuencia que codifica vp1 y/o la secuencia que codifica vp2 se pueden coexpresar con la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de vp2 de AAVhu68 de SEQ ID NO: 2 (aproximadamente los aa 138 a 736) sin la región exclusiva de vp1 (aproximadamente los aa 1 a aproximadamente 137), o una cadena complementaria a la misma, el ARNm o ARNt correspondiente (nt 412 a 22121 de SEQ ID NO: 1) o una secuencia al menos el 70 % a al menos el 99 % (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica aproximadamente los aa 138 a 736 de SEQ ID NO: 2.
- Como se describe en el presente documento, un rAAVhu68 tiene una cápside rAAVhu68 producida en un sistema de producción que expresa cápsides de un ácido nucleico de AAVhu68 que codifica la secuencia de aminoácidos de vp1 de SEQ ID NO: 2, y opcionalmente secuencias de ácido nucleico adicionales, por ejemplo, que codifican una proteína vp 3 sin las regiones exclusivas de vp 1 y/o vp2. El rAAVhu68 resultante de la producción usando una vp1 de secuencia de ácido nucleico única produce poblaciones heterogéneas de proteínas vp1, proteínas vp2 y proteínas vp3. Más en particular, la cápside AAVhu68 contiene subpoblaciones dentro de las proteínas vp1, dentro de las proteínas vp2 y dentro de las proteínas vp3 que tienen modificaciones de los restos de aminoácidos previstos en SEQ ID NO: 2. Estas subpoblaciones incluyen, como mínimo, restos asparragina desamidada (N o Asn). Por ejemplo, las asparraginas en los pares asparragina - glicina están altamente desamidadas.
- En determinadas realizaciones, las subpoblaciones de las proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAV hu68 comprenden al menos del 50 % a 100 % de asparraginas (N) desamidadas en los pares asparragina - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, con respecto a los aminoácidos en SEQ ID NO: 2, en donde las asparraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos, según se determina usando espectrometría de masas.
- La secuencia de ácido nucleico de vp1 de AAVhu68 puede tener la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una cadena complementaria a la misma, por ejemplo, el ARNm o ARNt correspondiente.
- Las proteínas vp2 y/o vp3 se pueden expresar adicionalmente o como alternativa a partir de secuencias de ácidos nucleicos diferentes de las de vp1, por ejemplo, para alterar la relación de las proteínas vp en un sistema de expresión seleccionado. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de vp3 de AAVhu68 de SEQ ID NO: 2 (aproximadamente los aa 203 a 736) sin la región exclusiva de vp1 (aproximadamente el aa 1 a aproximadamente el aa 137) y/o las regiones exclusivas de vp2 (aproximadamente el aa 1 a aproximadamente el aa 202), o una cadena complementaria a la misma, el ARNm o ARNt correspondiente (aproximadamente el nt 607 a aproximadamente el nt 2211 de SEQ ID NO: 1) se puede seleccionar para su uso en la producción de cápsides de AAVhu68.
- Una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de vp2 de AAVhu68 de SEQ ID NO: 2 (aproximadamente los aa 138 a 736) sin la región exclusiva de vp1 (aproximadamente el aa 1 a aproximadamente 137), o una cadena complementaria a la misma, el ARNm o ARNt correspondiente (los nt 412 a 2211 de SEQ ID NO: 1) se puede seleccionar para su uso en la producción de cápsides de AAVhu68.
- Sin embargo, se pueden seleccionar otras secuencias de ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 para su uso en la producción de cápsides de rAAVhu68. La secuencia de ácido nucleico puede tener la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos el 70 % al 99 % idéntica, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 %, idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica SEQ ID NO: 2. La secuencia de ácido nucleico puede tener la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos el 70 % al 99 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 %, idéntica a aproximadamente el nt 412 a aproximadamente el nt 2211 de SEQ ID NO: 1 que codifica la proteína de la cápside vp2 (aproximadamente los aa 138 a 736) de SEQ ID NO: 2. La secuencia de ácido nucleico puede tener la secuencia de ácido nucleico de aproximadamente el nt 607 a aproximadamente el nt 2211 de SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos el 70 % al 99 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 %, idéntica a los nt SEQ ID NO: 1 que codifica la proteína de la cápside vp3 (aproximadamente los aa 203 a 736) de SEQ ID NO: 2.

Está dentro de la experiencia en la técnica diseñar secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen esta cápside AAVhu68, incluyendo ADN (genómico o ADNc) o ARN (por ejemplo, ARNm).

- 5 La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside vp1 de AAVhu68 se proporciona en SEQ ID NO: 1. Véanse, además, las FIG 1B-1D.

Los codones de dichas secuencias de ácidos nucleicos se pueden optimizarse para la expresión en un sistema seleccionado (es decir, tipo celular) y se pueden diseñar mediante diversos métodos. Esta optimización se puede 10 realizar usando métodos que están disponibles en línea (por ejemplo, GeneArt), métodos publicados o una empresa que proporcione servicios de optimización de codones, por ejemplo, DNA2.0 (Menlo Park, CA). Se describe un método de optimización de codones, por ejemplo, en la Publicación de Patente Internacional de EE.UU. N.º WO 2015/012924.

15 Véase también, por ejemplo, Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2014/0032186 y Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2006/0136184. De manera adecuada, se modifica toda la longitud del marco de lectura abierto (ORF) del producto. Sin embargo, en algunas realizaciones, solo se puede alterar un fragmento del ORF. Mediante el uso de uno de estos métodos, se pueden aplicar las frecuencias a cualquier secuencia polipeptídica dada y producir un fragmento de ácido nucleico de una región codificante con codones optimizados que codifica el polipéptido.

20 Existen varias opciones disponibles para realizar los cambios reales en los codones o para sintetizar las regiones codificantes con codones optimizados diseñadas como se describe en el presente documento. Dichas modificaciones o síntesis se pueden realizar usando manipulaciones de biología molecular convencionales y de rutina bien conocidas por los expertos en la materia. En un enfoque, mediante métodos convencionales se sintetiza una serie de pares de oligonucleótidos complementarios de 80-90 nucleótidos cada uno de longitud y que abarcan

25 la longitud de la secuencia deseada. Estos pares oligonucleótidos se sintetizan de manera que, tras la hibridación, forman fragmentos bicatenarios de 80-90 pares de bases, que contiene extremos cohesivos, por ejemplo, cada oligonucleótido del par se sintetiza para extender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más bases más allá de la región que es complementaria al otro oligonucleótido del par. Los extremos monocatenarios de cada par de oligonucleótidos se diseñan para hibridarse con el extremo monocatenario de otro par de oligonucleótidos. Se deja que los pares de

30 oligonucleótidos se hibriden, y después se permite que aproximadamente de cinco a seis de estos fragmentos bicatenarios se hibriden entre sí a través de los extremos monocatenarios cohesivos, y después se ligan entre sí y se clonian en un vector de clonación bacteriano convencional, por ejemplo, un vector TOPO® disponible en Invitrogen Corporation, Carlsbad, California. Después, la construcción se secuencia mediante métodos convencionales. Se preparan varias de estas construcciones consisten en 5 a 6 fragmentos de 80 a 90 pares de

35 bases ligados entre sí, es decir, fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases, de manera que toda la secuencia deseada esté representada en una serie de construcciones de plásmidos. Después, los insertos de estos plásmidos se cortan con enzimas de restricción adecuadas y se ligan entre sí para formar la construcción final. Después, la construcción final se clona en un vector de clonación bacteriano convencional y se secuencia. Métodos adicionales resultarán inmediatamente evidentes para el experto en la materia. Además, la síntesis génica

40 está disponible en el mercado.

La asparragina (N) en los pares N-G en las proteínas vp1, vp2 y vp3 de AAVhu68 puede estar altamente desamidada. Una cápside AAVhu68 puede contener subpoblaciones de proteínas de la cápside vp1, vp2 y/o vp3 de AAV que tienen al menos cuatro posiciones de asparragina (N) en las proteínas de la cápside AAVhu68 que están altamente desamidadas.

45 Aproximadamente del 20 al 50 % de los pares N-N (excluyendo los tripletes N-N-N) pueden mostrar desamidación. La primera N puede estar desamidada. La segunda N puede estar desamidada. La desamidación puede estar entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 25 % de desamidación. La desamidación en la Q en la posición 259 de SEQ ID NO: 2 es de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 42 % de las proteínas de la cápside vp1, vp2 y vp3 de AAVhu68 de una proteína de AAVhu68.

50 La cápside rAAVhu68 se puede caracterizar además por una amidación en D297 de las proteínas vp1, vp2 y vp3. De aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 75 % de las D en la posición 297 de las proteínas vp1, vp2 y/o vp3 en una cápside AAVhu68 pueden estar amidadas, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2.

55 En determinadas realizaciones, al menos un Asp en la vp1, vp2 y/o vp3 de la cápside se isomeriza a D-Asp. Dichos isómeros generalmente están presentes en una cantidad inferior a aproximadamente el 1 % del Asp en una o más de las posiciones de restos 97, 107, 384, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2.

60 Un rAAVhu68 puede tener una cápside AAVhu68 que tiene proteínas vp1, vp2 y vp3 que tienen subpoblaciones que comprenden combinaciones de uno, dos, tres, cuatro o más restos desamidados en las posiciones expuestas en la tabla a continuación. La desamidación en el rAAV se puede determinar usando espectrometría de masas.

65 La cromatografía en línea se puede realizar con una columna Acclaim PepMap y un sistema de RSLC Thermo UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a un Q Exactive HF con una fuente NanoFlex (Thermo Fisher

Scientific). Los datos de EM se obtienen usando un método top 20 dependiente de los datos para el Q Exactive HF, eligiendo dinámicamente los iones precursores más abundantes aún no secuenciados de las exploraciones del estudio (200-2000 m/z). La secuenciación se realiza a través de fragmentación por disociación por colisión de mayor energía con un valor objetivo de iones 1e5 determinado con control de ganancia automático predictivo y se realizó un aislamiento de precursores con una ventana de 4 m/z. Las exploraciones topográficas se obtuvieron con una resolución de 120.000 a m/z 200. La resolución de los espectros de HCD se puede establecer en 30.000 a m/z 200 con un tiempo máximo de inyección de iones de 50 ms y una energía de colisión normalizada de 30. El nivel de RF de la lente S se puede establecer en 50, para proporcionar una transmisión óptima de la región m/z ocupada por los péptidos del producto de digestión. Los iones precursores se pueden excluir de la selección de fragmentación con estados de carga únicos, no asignados, o de seis o más. Se puede usar el software BioPharma Finder 1.0 (Thermo Fischer Scientific) para el análisis de los datos obtenidos. Para el cartografiado de péptidos, las búsquedas se realizan usando una base de datos FASTA de proteínas de entrada única con la carbamidometilación establecida como una modificación fija; y la oxidación, la desamidación y la fosforilación establecidas como modificaciones variables, una precisión de masa de 10 ppm, una especificidad de proteasa alta y un nivel de confianza de 0,8 para los espectros de EM/EM. Los ejemplos de proteasas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, tripsina o quimotripsina. La identificación espectrométrica de masas de péptidos desamidados es relativamente sencilla, ya que la desamidación suma a la masa de la molécula intacta +0,984 Da (la diferencia de masa entre los grupos -OH y -NH<sub>2</sub>). El porcentaje de desamidación de un péptido particular se determina como área en masa del péptido desamidado dividida por la suma del área de los péptidos desamidados y nativos.

Considerando el número de posibles sitios de desamidación, las especies isobáricas que están desamidadas en sitios diferentes pueden migrar conjuntamente en un único pico. En consecuencia, se pueden usar iones fragmentados que se originan a partir de péptidos con múltiples sitios de desamidación potenciales para ubicar o diferenciar múltiples sitios de desamidación. En estos casos, las intensidades relativas dentro de los patrones de isótopos observados se pueden usar para determinar específicamente la abundancia relativa de los diferentes isómeros peptídicos desamidados. Este método supone que la eficiencia de fragmentación para todas las especies isoméricas es la misma e independiente del sitio de desamidación. Un experto en la materia entenderá que se pueden usar varias variaciones de estos métodos ilustrativos. Por ejemplo, los especlómetros de masas adecuados pueden incluir, por ejemplo, un especlómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (QTOF), tal como un Waters Xevo o Agilent 6530 o un instrumento orbitrap, tal como el Orbitrap Fusion o el Orbitrap Velos (Thermo Fisher). Los sistemas de cromatografía de líquidos adecuados incluyen, por ejemplo, el sistema de UPLC Acquity de Waters o los sistemas Agilent (serie 1100 o 1200). El software de análisis de datos adecuado puede incluir, por ejemplo, MassLynx (Waters), Pinpoint y Pepfinder (Thermo Fischer Scientific), Mascot (Matrix Science), Peaks DB (Bioinformatics Solutions). Se pueden describir otras técnicas más, por ejemplo, en X. Jin et al., Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, N.º 5, págs. 255-267, publicado en línea el 16 de junio de 2017.

35

Desamidación basada en AAVHu68 previsto [SEQ ID NO: 2]	% de Promedio basado en proteínas VP1/VP2/VP3 en la cápside AAVhu68	
Resto desamidado + 1 (AA vecino)	Amplio intervalo de porcentajes (%)	Intervalos estrechos (%)
N57 (N-G)	del 78 al 100 %	de 80 a 100, de 85 a 97
N66 (N-E)	de 0 a 5	0, de 1 a 5
N94 (N-H)	de 0 a 15,	0, de 1 a 15, de 5 a 12, 8
N113 (N-L)	de 0 a 2	0, de 1 a 2
-N253 (N-N)	de 10 a 25	de 15 a 22
Q259 (Q-I)	de 8 a 42	de 10 a 40, de 20 a 35
-N270 (N-D)	de 12 a 30	de 15 a 28
-N304 (N-N) (posición 303 también N)	de 0 a 5	de 1 a 4
N319 (N-I)	de 0 a 5	0, de 1 a 5, de 1 a 3
N329 * (N-G)*(posición 328 también N)	de 65 a 100	de 70 a 95, de 85 a 95, de 80 a 100, de 85 a 100,
N336 (N-N)	de 0 a 100	0, de 1 a 10, de 25 a 100, de 30 a 100, de 30 a 95
-N409 (N-N)	de 15 a 30	de 20 a 25
N452 (N-G)	de 75 a 100	de 80 a 100, de 90 a 100, de 95 a 100,
N477 (N-Y)	de 0 a 8	0, de 1 a 5

N512 (N-G)	de 65 a 100	de 70 a 95, de 85 a 95, de 80 a 100, de 85 a 100,
-N515 (N-S)	de 0 a 25	0, de 1 a 10, de 5 a 25, de 15 a 25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	de 1 a 20	de 2 a 20, de 5 a 15
N628 (N-F)	de 0 a 10	0, de 1 a 10, de 2 a 8
N651 (N-T)	de 0 a 3	0, de 1 a 3
N663 (N-K)	de 0 a 5	0, de 1 a 5, de 2 a 4
N709 (N-N)	de 0 a 25	0,1 a 22, de 15 a 25
N735	de 0 a 40	0. de 1 a 35, de 5 a 50, de 20 a 35

La cápside AAVhu68 puede caracterizarse, por tener proteínas de la cápside en las que al menos el 45 % de los restos N están desamidados en al menos una de las posiciones N57, N329, N452 y/o N512 basándose en la numeración de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Al menos aproximadamente el 60 %, al menos

5 aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos el 90 % de los restos N en una o más de estas posiciones N-G (es decir, N57, N329, N452 y/o N512, basándose en la numeración de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2) pueden estar desamidados. Una cápside AAVhu68 se puede caracterizar adicionalmente por tener una población de proteínas en la que de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 % de los restos N tienen desamidaciones en una o más de las posiciones: N94, N253, N270, N304, N409, N477 10 y/o Q599, basándose en la numeración de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El AAVhu68 puede comprender al menos una subpoblación de proteínas vp1, vp2 y/o vp3 que están desamidadas en una o más de las posiciones N35, N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, N735, basándose en 15 la numeración de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o combinaciones de la misma. En determinadas realizaciones, las proteínas de la cápside también pueden tener uno o más aminoácidos amidados.

Se observan otras modificaciones más, la mayoría de las cuales no dan como resultado la conversión de un aminoácido en un resto de aminoácido diferente. Opcionalmente, al menos una Lys en la vp1, vp2 y vp3 de la cápside está acetilada. Opcionalmente, al menos un Asp en la vp1, vp2 y/o vp3 de la cápside se isomeriza a D-Asp. Opcionalmente, al menos una S (Ser, Serina) en la vp1, vp2 y/o vp3 de la cápside está fosforilada. Opcionalmente, al menos una T (Thr, Treonina) en la vp1, vp2 y/o vp3 de la cápside está fosforilada. Opcionalmente, al menos un W (trp, triptófano) en la vp1, vp2 y/o vp3 de la cápside está oxidado. Opcionalmente, al menos una M (Met, Metionina) en la vp1, vp2 y/o vp3 de la cápside está oxidada.

25 Las proteínas de la cápside pueden tener una o más fosforilaciones. Por ejemplo, determinadas proteínas de la cápside vp1 pueden estar fosforiladas en la posición 149.

Una cápside AAVhu68 puede comprender una población heterogénea de proteínas vp1 que son el producto de 30 una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde las proteínas vp1 comprenden un ácido glutámico (Glu) en la posición 67 y una valina (Val) en la posición 157; una población heterogénea de proteínas vp2 que comprende una valina (Val) en la posición 157; y una población heterogénea de proteínas vp3. La cápside AAVhu68 puede contener al menos una subpoblación en la que al menos el 65 % de las asparraginas (N) en los pares asparragina - glicina ubicadas en la posición 57 de las proteínas 35 vp1 y al menos el 70 % de las asparraginas (N) en los pares asparragina - glicina en las posiciones 329, 452 y/o 512 de las proteínas vp1, v2 y vp3 están desamidadas, basándose en la numeración de restos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde la desamidación da como resultado un cambio de aminoácido.

40 Como se analiza con más detalle en el presente documento, las asparraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, el rAAVhu68 se caracteriza además por uno o más de: (a) cada una de las proteínas vp2 es independientemente el producto de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos la proteína vp2 de SEQ ID NO: 2; (b) cada una de las proteínas vp3 es independientemente el producto de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos la proteína vp3 de

45 SEQ ID NO: 2; (c) la secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas vp1 es SEQ ID NO: 1, o una secuencia al menos el 70 % a al menos el 99 % (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, esa secuencia se usa sola para expresar las proteínas vp1, vp2 y 50 vp3. Como alternativa, esta secuencia puede coexpresarse con una o más secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de vp3 de AAVhu68 de SEQ ID NO: 2 (aproximadamente los aa 203 a 736)

sin la región exclusiva de vp1 (aproximadamente el aa 1 a aproximadamente el aa 137) y/o las regiones exclusivas de vp2 (aproximadamente el aa 1 a aproximadamente el aa 202), o una cadena complementaria a las mismas, el ARNm o ARNt correspondiente (aproximadamente el nt 607 a aproximadamente el nt 2211 de SEQ ID NO: 1), o una secuencia al menos el 70 % a al menos el 99 % (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica los aa 203

5 a 736 de SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, o como alternativa, la secuencia que codifica vp1 y/o la secuencia que codifica vp2 se pueden coexpresar con la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de vp2 de AAVhu68 de SEQ ID NO: 2 (aproximadamente los aa 138 a 736) sin la región exclusiva de vp1 (aproximadamente los aa 1 a aproximadamente 137), o una cadena complementaria a la misma, el ARNm o ARNt correspondiente (nt 412 a 2211 de SEQ ID NO: 1) o una secuencia al menos el 70 % a al menos el 99 % (por ejemplo, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica aproximadamente los aa 138 a 736 de SEQ ID NO: 2.

10 Adicionalmente o como alternativa, la cápside rAAVhu68 puede comprender al menos una subpoblación de proteínas vp1, vp2 y/o vp3 que están desamidadas en una o más de las posiciones N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N512, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, o combinaciones de las mismas, según se determina usando espectrometría de masas; (e) la cápside rAAVhu68 puede comprender una subpoblación de proteínas vp1, vp2 y/o vp3 que comprenden del 1 % al 20 % de desamidación en una o más de

15 las posiciones N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, o combinaciones de las mismas, según se determina usando espectrometría de masas; (f) la cápside rAAVhu68 puede comprender una subpoblación de vp1 en la que del 65 % al 100 % de las N en la posición 57 de las proteínas

20 vp1, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidadas según se determina mediante espectrometría de masas; (g) la cápside rAAVhu68 puede comprender una subpoblación de proteínas vp1 en la que del 75 % al 100 % de las N en la posición 57 de las proteínas vp1 basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2 están desamidadas, según se determina mediante espectrometría de masas; (h), la cápside rAAVhu68 comprende una subpoblación de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o proteínas vp3 en las que del 80 % al 100 % de las N en la posición 329, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidadas según se determina

25 mediante espectrometría de masas; (i) la cápside rAAVhu68 puede comprender una subpoblación de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o proteínas vp3 en las que del 80 % al 100 % de las N en la posición 452, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidadas según se determina mediante espectrometría de masas; (j) la cápside rAAVhu68 puede comprender una subpoblación de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o proteínas vp3 en las que del 80 % al 100 % de las N en la posición 512, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidadas según se determina mediante espectrometría de masas; (k) el rAAV puede comprender

30 aproximadamente 60 proteínas de la cápside totales en una relación de aproximadamente 1 proteína vp1 a aproximadamente 1 a 1,5 proteínas vp2 a 3 a 10 proteínas vp3; (l) el rAAV comprende aproximadamente 60 proteínas de la cápside totales en una relación de aproximadamente 1 proteína vp1 a aproximadamente 1 proteína vp2 a 3 a 9 proteínas vp3.

35 40 Como se usa en el presente documento, "secuencia de aminoácidos codificada" se refiere al aminoácido que se predice basándose en la traducción de un codón de ADN conocido de una secuencia de ácido nucleico de referencia que se traduce a un aminoácido. La siguiente tabla ilustra codones de ADN y veinte aminoácidos comunes, que muestran tanto el código de una sola letra (SLC) como el código de tres letras (3LC).

Aminoácido	SLC	3LC	Codones de ADN
Isoleucina	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Leucina	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valina	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Fenilalanina	F	Phe	TTT, TTC
Metionina	M	Met	ATG
Cisteína	C	Cys	TGT, TGC
Alanina	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Glicina	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
Prolina	P	Pro	CCT, CCC, AAC, CCG
Treonina	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
Serina	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC, TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC

Tirosina	Y	Tyr	TAT, TAC
Triptófano	W	Tip	TGG
Glutamina	Q	Gln	CAA, CAG
Asparragina	N	Asn	AAT, AAC
Histidina	H	His	CAT, CAC
Ácido glutámico	E	Glu	GAA, GAG
Ácido aspártico	D	Asp	GAT, GAC
Lisina	K	Lys	AAA, AAG
Arginina	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Codones de parada	Parada		TAA, TAG, TGA

Las cápsides de AAVhu68 pueden ser útiles. Por ejemplo, dichas cápsides se pueden usar para generar anticuerpos monoclonales y/o generar reactivos útiles en ensayos para controlar los niveles de concentración de AAVhu68 en pacientes con terapia génica. Los expertos en la materia conocen técnicas para generar anticuerpos anti-AAVhu68 útiles, marcar dichos anticuerpos o cápsides vacías, y formatos de ensayo adecuados.

Se divulga, pero no se reivindica en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 %, que codifica la secuencia de aminoácidos de vp1 de SEQ ID NO: 2 con una modificación (por ejemplo, aminoácido desamidado) como se describe en el presente documento. Una secuencia de aminoácidos de vp1 no reivindicada en el presente documento se reproduce en SEQ ID NO: 14.

Como se usa en el presente documento, el término "clado" en lo que se refiere a grupos de AAV se refiere a un grupo de AAV que están relacionados filogenéticamente entre sí según se determina usando un algoritmo de Unión de Vecinos mediante un valor de arranque de al menos el 75 % (de al menos 1000 réplicas) y una medición de la distancia de corrección de Poisson no superior a 0,05, basándose en la alineación de la secuencia de aminoácidos de vp1 de AAV. El algoritmo de Unión de Vecinos se ha descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, M. Nei y S. Kumar, Molecular Evolution and Phylogenetics (Oxford University Press, Nueva York (2000). Existen programas informáticos disponibles que se pueden usar para implementar este algoritmo. Por ejemplo, el programa MEGA v2.1 implementa el método de Nei-Gojobori modificado. Usando estas técnicas y programas informáticos, y la secuencia de una proteína de la cápside vp1 de AAV, un experto en la materia puede determinar fácilmente si un AAV seleccionado está contenido en uno de los clados identificados en el presente documento, en otro clado o está fuera de estos clados. Véase, por ejemplo, G Gao, et al., J Virol, junio de 2004; 78(10): 6381-6388, que identifica los Clados A, B, C, D, E y F, y proporciona secuencias de ácidos nucleicos de AAV novedosos, Números de Registro de GenBank AY530553 a AY530629. Véase, además, el documento WO 2005/033321.

El rAAV reivindicado puede producirse usando una molécula modificada por ingeniería genética que comprende una secuencia espaciadora entre la secuencia codificante de vp1 de AAVhu68 y las secuencias codificantes de rep de AAVhu68. Esta secuencia codificante es: atgacttaaaccaggt, SEQ ID NO: 9. La secuencia codificante para rep52 de AAVhu68 se reproduce en SEQ ID NO: 3. La secuencia de la proteína rep52 se reproduce en SEQ ID NO: 4.

En una comparación entre AAVhu68 y AAVrh10, se ha descubierto que AAVhu68 proporciona una mejor eficiencia de transducción que AAVrh10 a dosis bajas (por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^9$  CG) después de la administración intracerebroventricular. En una comparación adicional entre AAVhu68 y AAV9, se ha descubierto que AAVhu68 proporciona una mejor eficiencia de transducción que AAV9 en el cerebelo, la corteza motora y el hipocampo del cerebro (por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CG) después de la administración intracerebroventricular.

Un vector AAVhu68 puede comprender un genoma de vector que expresa un anticuerpo dirigido contra un receptor HER2. Un vector de este tipo es útil en el tratamiento y/o la prevención de cánceres.

Como se usa en el presente documento, una "cápside AAV9" es una cápside de AAV autoensamblada compuesta por múltiples proteínas vp de AAV9. Las proteínas vp de AAV9 se expresan normalmente como variantes de corte y empalme alternativas codificadas por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5 o una secuencia al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 99 % de la misma, que codifica la secuencia de aminoácidos de vp1 de SEQ ID NO: 6 (registro de GenBank: AAS99264). Estas variantes de corte y empalme dan como resultado proteínas de diferente longitud de SEQ ID NO: 6. La "cápside AAV9" incluye un AAV que tiene una secuencia de aminoácidos

que es el 99 % idéntica a AAS99264 o el 99 % idéntica a SEQ ID NO: 6. Véase, también el documento US7906111 y el documento WO 2005/033321. Como se usan en el presente documento, las "variantes de AAV9" incluyen las descritas en, por ejemplo, los documentos WO2016/049230, US 8.927.514, US 2015/0344911 y US 8.734.809.

- 5 Se han descrito métodos de generación de la cápside, secuencias codificantes de la misma y métodos para la producción de vectores víricos de rAAV. Véase, por ejemplo, Gao, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) y el documento US 2013/0045186A1.
- 10 La expresión "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se refiere a un ácido nucleico, o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinea de forma óptima con inserciones o supresiones de nucleótidos adecuadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 95 al 99 % de las secuencias alineadas. Preferentemente, la homología es sobre una secuencia de longitud completa, o un marco de lectura abierto de la misma, u otro fragmento adecuado que tiene al menos 15 nucleótidos de longitud. En el presente documento se describen ejemplos de fragmentos adecuados.
- 15 Las expresiones "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje idéntico" en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos se refieren a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean por correspondencia máxima. La longitud de la comparación de identidad de secuencias puede ser sobre la longitud completa del genoma, se desea la longitud completa de una secuencia codificante de un gen, o un fragmento de al menos aproximadamente 500 a 5000 nucleótidos. Sin embargo, también se puede desear la identidad entre fragmentos más pequeños, por ejemplo, de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, por lo general al menos aproximadamente de 20 a 24 nucleótidos, al menos aproximadamente de 28 a 32 nucleótidos, al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos. De forma similar, el "porcentaje de identidad de secuencia" se puede determinar fácilmente para secuencias de aminoácidos, en toda la longitud de una proteína, o un fragmento de la misma. De manera adecuada, un fragmento tiene al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud y puede tener hasta aproximadamente 700 aminoácidos. En el presente documento se describen ejemplos de fragmentos adecuados.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- La expresión "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se refiere a aminoácidos o fragmentos de los mismos, indica que, cuando se alinea de forma óptima con inserciones o supresiones de aminoácidos adecuadas con otro aminoácido (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de aminoácidos en al menos aproximadamente el 95 al 99 % de las secuencias alineadas. Preferentemente, la homología es sobre la secuencia de longitud completa, o una proteína de la misma, por ejemplo, una proteína cap, una proteína rep, o un fragmento de la misma que tiene al menos 8 aminoácidos o, más deseablemente, al menos 15 aminoácidos de longitud. En el presente documento se describen ejemplos de fragmentos adecuados.
- Por la expresión "altamente conservado" se entiende al menos el 80 % de identidad, preferentemente al menos el 90 % de identidad y, más preferentemente, más del 97 % de identidad. La identidad la determina fácilmente un experto en la materia recurriendo a algoritmos y programas informáticos conocidos por los expertos en la materia.
- Generalmente, cuando se hace referencia a la "identidad", "homología" o "similitud" entre dos virus adenoasociados diferentes, la "identidad", "homología" o "similitud" se determina con referencia a secuencias "alineadas". Las secuencias "alineadas" o "alineaciones" se refieren a múltiples secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de proteínas (aminoácidos), que contienen con frecuencia correcciones para bases o aminoácidos ausentes o adicionales en comparación con una secuencia de referencia. En los ejemplos, las alineaciones de AAV se realizan usando las secuencias de AAV9 publicadas como punto de referencia. Las alineaciones se realizan usando cualquiera de diversos programas de alineación de múltiples secuencias disponibles pública o en el mercado. Los ejemplos de dichos programas incluyen, "Clustal Omega", "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "MAP" y "MEME", a los que se puede acceder a través de servidores web en Internet. Los expertos en la materia conocen otras fuentes para dichos programas. Como alternativa, también se usan las utilidades Vector NTI. También hay varios algoritmos conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos, incluyendo los contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden comparar usando Fasta™, un programa en GCG Versión 6.1. Fasta™ proporciona alineaciones y un porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y búsqueda. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico se puede determinar usando Fasta™ con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) como se proporciona en GCG Versión 6.1. También hay disponibles múltiples programas de alineación de secuencias para secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" y "Match-Box". Generalmente, cualquiera de estos programas se usa con la configuración por defecto, aunque un experto en la materia puede modificar estos ajustes según sea necesario. Como alternativa, un experto en la materia puede utilizar otro algoritmo o programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad o alineación que proporcionan los algoritmos y programas a los que se ha hecho referencia. Véase, por ejemplo, J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

## I. Vectores de rAAV

Como se ha indicado anteriormente, las proteínas y secuencias de AAVhu68 novedosas son útiles en la producción de rAAV, y también son útiles en vectores de AAV recombinantes que pueden ser vectores de suministro antisentido, vectores de terapia génica o vectores de vacuna.

Las secuencias genómicas que se empaquetan en una cápside de AAV y se suministran a una célula hospedadora normalmente se componen de, como mínimo, un transgén y sus secuencias reguladoras, y repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. Tanto el AAV monocatenario como el AAV autocomplementario (sc) están incluidos en el rAAV. El transgén es una secuencia que codifica un ácido nucleico, heteróloga a las secuencias del vector, que codifica un polipéptido, proteína, molécula de ARN funcional (por ejemplo, miARN, inhibidor de miARN) u otro producto génico, de interés. La secuencia codificante de ácido nucleico está unida operativamente a componentes reguladores de una manera que permita la transcripción, traducción y/o expresión del transgén en una célula de un tejido diana.

Las secuencias de AAV del vector comprenden normalmente las secuencias 5' y 3' de repeticiones terminales invertidas que actúan en cis (véase, por ejemplo, B. J. Carter, en "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, págs. 155 168 (1990)). Las secuencias de ITR tienen aproximadamente 145 pb de longitud. Preferentemente, sustancialmente se usan las secuencias completas que codifican las ITR en la molécula, aunque es permisible algún grado de modificación menor de estas secuencias. La capacidad de modificar estas secuencias de ITR está dentro de experiencia de la técnica. (Véanse, por ejemplo, textos tales como Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989); y K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Un ejemplo de una molécula de este tipo empleada en la presente invención es un plásmido "que actúa en cis" que contiene el transgén, en el que la secuencia transgénica seleccionada y los elementos reguladores asociados están flanqueados por las secuencias de ITR de AAV 5' y 3'. Las ITR pueden ser de un AAV diferente al que suministra una cápside. Las secuencias de ITR pueden ser de AAV2. Se ha descrito una versión acortada de la ITR 5', denominada ΔITR, en la que se suprime la secuencia D y el sitio de resolución terminal (trs). Se pueden usar las ITR 5' y 3' de AAV de longitud completa. Sin embargo, se pueden seleccionar ITR de otras fuentes de AAV. Cuando la fuente de las ITR es de AAV2 y la cápside de AAV es de otra fuente de AAV, el vector resultante puede denominarse pseudotipado. Sin embargo, pueden ser adecuadas otras configuraciones de estos elementos.

Además de los elementos principales identificados anteriormente para el vector de AAV recombinante, el vector también incluye elementos de control convencionales necesarios que están unidos operativamente al transgén de una manera que permite su transcripción, su traducción y/o su expresión en una célula transfecada con el vector o infectada con el virus producido mediante la invención. Como se usa en el presente documento, las secuencias "unidas operativamente" incluyen las secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a distancia para controlar el gen de interés.

Los elementos de control reguladores normalmente contienen una secuencia promotora como parte de las secuencias de control de la expresión, por ejemplo, ubicadas entre la secuencia de ITR 5' seleccionada y la secuencia codificante. En los vectores descritos en el presente documento pueden utilizarse promotores constitutivos, promotores regulables [véanse, por ejemplo, los documentos WO 2011/126808 y WO 2013/04943], promotores específicos de tejido o un promotor que responda a señales fisiológicas. El promotor o promotores pueden seleccionarse de diferentes fuentes, por ejemplo, potenciador/promotor inmediato-temprano de citomegalovirus humano (CMV), el potenciador/promotor temprano de SV40, el promotor de polimovirus de JC, promotores de la proteína básica de mielina (MBP) o la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), promotor asociado a la latencia (LAP) del virus del herpes simple (HSV-1), promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rouse (VSR), promotor específico de neuronas (NSE), promotor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), hSYN, promotor de la hormona concentradora de melanina (MCH), CBA, promotor de metaloproteína de matriz (MPP) y el promotor de beta-actina de pollo. Además de un promotor, un vector puede contener una o más secuencias adecuadas de inicio, terminación y potenciación de la transcripción, señales de procesamiento del ARNm eficientes tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación (polyA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático, por ejemplo, WPRE; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. Un ejemplo de un potenciador adecuado es el potenciador de CMV. Otros potenciadores adecuados incluyen aquellos que son adecuados para indicaciones deseadas del tejido diana.

El casete de expresión puede comprender uno o más potenciadores de la expresión. El casete de expresión puede contener dos o más potenciadores de la expresión. Estos potenciadores pueden ser iguales o pueden diferir entre sí. Por ejemplo, un potenciador puede incluir un potenciador temprano inmediato de CMV. Este potenciador puede estar presente en dos copias que están ubicadas adyacentes entre sí. Como alternativa, las copias dobles del potenciador pueden estar separadas por una o más secuencias. El casete de expresión puede contener además un intrón, por ejemplo, el intrón de beta-actina de pollo. Otros intrones adecuados incluyen los conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como se describen en el documento WO 2011/126808. Los ejemplos de secuencias de

poliA adecuadas incluyen, por ejemplo, SV40, SV50, hormona de crecimiento bovina (bGH), hormona de crecimiento humana y poliA sintéticas. Opcionalmente, pueden seleccionarse una o más secuencias para estabilizar el ARNm. Un ejemplo de dicha secuencia es una secuencia de WPRE modificada, que puede modificarse por ingeniería genética en dirección 5' de la secuencia de poliA y en dirección 3' de la secuencia codificante [véase, por ejemplo, MA Zanta-Boussif, et al., Gene Therapy (2009) 16: 605-619.

5 Estos rAAV son particularmente adecuados para el suministro de genes con fines terapéuticos y para inmunización, incluyendo la inducción de inmunidad protectora. Además, las composiciones de la invención también se pueden usar para la producción de un producto génico deseado *in vitro*. Para la producción *in vitro*, se puede obtener un 10 producto deseado (por ejemplo, una proteína) a partir de un cultivo deseado después de la transfección de células hospedadoras con un rAAV que contiene la molécula que codifica el producto deseado y cultivar el cultivo celular en condiciones que permiten la expresión. Después, el producto expresado se puede purificar y aislar, según se desee. Los expertos en la materia conocen técnicas adecuadas de transfección, cultivo celular, purificación y 15 aislamiento.

15 15 Un rAAV o composición como se proporciona en el presente documento puede no contener un anticuerpo anti-gripe o una construcción de inmunoglobulina. Un rAAV o composición como se proporciona en el presente documento puede no contener una secuencia codificante de SMN.

20 Productos génicos y genes terapéuticos

Los productos útiles codificados por el transgén incluyen una diversidad de productos génicos que reemplazan un 25 gen defectuoso o deficiente, inactivan o "desactivan" o "atenúan" o reducen la expresión de un gen que se expresa a un nivel indeseablemente alto, o suprimir un producto génico que tiene un efecto terapéutico deseado. En la mayoría de los casos, la terapia será "terapia génica somática", es decir, transferencia de genes a una célula del 30 cuerpo que no produce espermatozoides ni óvulos. Los transgenes pueden expresar proteínas que tienen la secuencia de secuencias humanas nativas. Sin embargo, también se pueden expresar proteínas sintéticas. Dichas proteínas pueden estar destinadas al tratamiento de seres humanos o diseñadas para el tratamiento de animales, incluyendo animales de compañía tales como poblaciones caninas o felinas, o para el tratamiento de ganado u otros animales que entran en contacto con poblaciones humanas.

35 Los ejemplos de productos génicos adecuados pueden incluir aquellos asociados a hipercolesterolemia familiar, distrofia muscular, fibrosis quística y enfermedades raras o huérfanas. Los ejemplos de dichas enfermedades raras pueden incluir atrofia muscular espinal (AME), enfermedad de Huntington, síndrome de Rett (por ejemplo, proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2); UniProtKB - P51608), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), distrofia muscular de tipo Duchenne, ataxia de Friedreich (por ejemplo, frataxina), programulina (PRGN) (asociada a degeneraciones cerebrales no relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo, demencia frontotemporal (DFT), afasia progresiva no fluida (APNF) y demencia semántica), entre otros. Véase, por ejemplo, [www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search\\_List.php](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php); [rarediseases.info.nih.gov/diseases](http://rarediseases.info.nih.gov/diseases).

40 40 Los ejemplos de genes adecuados pueden incluir, por ejemplo, hormonas y factores de crecimiento y diferenciación, incluyendo, sin limitación, insulina, glucagón, péptido similar al glucagón -1 (GLP1), hormona del crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO) (incluyendo, por ejemplo, epo humana, canina o felina), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factores neutróficos incluyendo, por ejemplo, factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor ácido de crecimiento de fibroblastos (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento insulínico I y II (IGF-I e IGF-II), uno cualquiera de la superfamilia α del factor de crecimiento transformante, incluyendo TGFα, activinas, inhibinas o cualquiera de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) BMP 1-15, uno cualquiera de la familia del factor de diferenciación de heregluina/heuregluina/ARIA/neu (NDF) de los factores de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la estirpe de células gliales (GDNF), neurturina, agrina, una cualquiera 50 de la familia de semaforinas/collapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, sonic hedgehog y tirosina hidroxilasa.

60 60 Otros productos transgénicos útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario incluyendo, sin limitación, citocinas y linfocinas tales como trombopoietina (TPO), interleucinas (IL) IL-1 a IL-36 (incluyendo, por ejemplo, interleucinas humanas IL-1, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31, IL-35), proteína quimioatrayente de monocitos, factor inhibidor de la leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, ligando Fas, factores α y β de necrosis tumoral, interferones α, β y γ, factor de células madre, ligando de flk-2/flt3. Los productos génicos producidos por el sistema inmunitario también son útiles en la invención. Estos incluyen, sin limitaciones, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas químéricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos T químéricos, receptores de linfocitos T monocatenarios, moléculas de MHC de clase I y clase II, así

como inmunoglobulinas y moléculas de MHC modificadas por ingeniería genética. Por ejemplo, los anticuerpos rAAV pueden diseñarse para suministrar anticuerpos caninos o felinos, por ejemplo, tales como anti-IgE, anti-IL31, anti-CD20, anti-NGF, anti-GnRH. Los productos génicos útiles también incluyen proteínas reguladoras del complemento tales como proteínas reguladoras del complemento, proteína cofactor de membrana (MCP), factor acelerador de la descomposición (DAF), CR1, CF2, CD59 e inhibidor de la esterasa C1 (C1-INH).

Otros productos génicos útiles más incluyen uno cualquiera de los receptores para las hormonas, factores de crecimiento, citocinas, linfoцитas, proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. La invención abarca los receptores para la regulación del colesterol y/o la modulación de los lípidos, incluyendo el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), el receptor de lipoproteínas de alta densidad (HDL), el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y los receptores neutralizantes. La invención también abarca productos génicos tales como miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas, incluyendo receptores de glucocorticoides y receptores de estrógenos, receptores de vitamina D y otros receptores nucleares. Además, los productos génicos útiles incluyen factores de transcripción tales como *as jun*, *fos*, *max*, *mad*, factor de respuesta de suero (SRF), AP-1, AP2, *myb*, MyoD y miogenina, proteínas que contienen caja ETS, TFE3, E2F, ATF 1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas de unión a caja CCAAT, factor de regulación de interferón (IRF-1), proteína tumoral de Wilms, proteína de unión a ETS, STAT, proteínas de unión a caja GATA, por ejemplo, GATA-3 y la familia forkhead de proteínas de hélice alada.

Otros productos génicos útiles incluyen, carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamolasa (OTC), arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa (ASL) para el tratamiento de la deficiencia de arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, alfafetoproteína de macaco de la India (AFP), gonadotropina coriónica de macaco de la India (CG), glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, cistatina beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-CoA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvato carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa cinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, una secuencia reguladora transmembrana de fibrosis quística (CFTR) y un producto genético de distrofina [por ejemplo, una mini o micro distrofina]. Otros productos génicos útiles más incluyen enzimas tales como las que pueden ser útiles en la terapia de reemplazo enzimático, que es útil en una diversidad de afecciones que son el resultado de una actividad deficiente de la enzima. Por ejemplo, las enzimas que contienen manosa-6-fosfato pueden utilizarse en terapias para enfermedades por almacenamiento lisosómico (por ejemplo, un gen adecuado incluye el que codifica la β-glucuronidasa (GUSB)).

El rAAV se puede usar en sistemas de edición génica, sistema que puede implicar un rAAV o la coadministración de múltiples reservas de rAAV. Por ejemplo, el rAAV puede modificarse por ingeniería genética para suministrar SpCas9, SaCas9, ARCUS, Cpf1 y otras construcciones de edición génica adecuadas.

Otros productos génicos útiles más incluyen los utilizados para el tratamiento de la hemofilia, incluyendo la hemofilia B (incluyendo el Factor IX) y la hemofilia A (incluyendo el Factor VIII y sus variantes, tales como la cadena ligera y cadena pesada del heterodímero y con el dominio B suprimido; Patente de EE.UU. N.º 6200560 y Patente de EE.UU. N.º 6221349). El minigén puede comprender los primeros 57 pares de bases de la cadena pesada del Factor VIII que codifica la secuencia señal de 10 aminoácidos, así como la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (hGH). El minigén puede comprender además los dominios A1 y A2, así como 5 aminoácidos del extremo N-terminal del dominio B y/u 85 aminoácidos del extremo C-terminal del dominio B, así como los dominios A3, C1 y C2.

Los ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del Factor VIII pueden proporcionarse en un único minigén separado por 42 ácidos nucleicos que codifican 14 aminoácidos del dominio B [Patente de EE.UU. N.º 6.200.560].

Otros productos génicos útiles incluyen polipéptidos de origen no natural, tales como polipéptidos químicos o híbridos que tienen una secuencia de aminoácidos de origen no natural que contiene inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, las inmunoglobulinas modificadas por ingeniería genética monocatenarias podrían ser útiles en determinados pacientes inmunocomprometidos. Otros tipos de secuencias génicas de origen no natural incluyen moléculas antisentido y ácidos nucleicos catalíticos, tales como ribozimas, que podrían usarse para reducir la sobreexpresión de una diana.

La reducción y/o modulación de la expresión de un gen es particularmente deseable para el tratamiento de afecciones hiperproliferativas caracterizadas por células en hiperproliferación, como son los cánceres y la psoriasis. Los polipéptidos diana incluyen aquellos polipéptidos que se producen exclusivamente o a niveles más altos en células hiperproliferativas en comparación con las células normales. Los antígenos diana incluyen polipéptidos codificados por oncogenes tales como *myb*, *myc*, *fyn*, y el gen de translocación *bcr/abl*, *ras*, *src*, *P53*, *neu*, *trk* y *EGFR*. Además de los productos oncogénicos como antígenos diana, los polipéptidos diana para tratamientos antineoplásicos y pautas protectoras incluyen regiones variables de anticuerpos producidos por linfomas de células B y regiones variables de receptores de linfocitos T de linfomas de linfocitos T que también pueden usarse como antígenos diana para enfermedades autoinmunitarias. Se pueden usar otros polipéptidos asociados a tumores

como polipéptidos diana tales como polipéptidos que se encuentran a niveles más altos en células tumorales que incluyen el polipéptido reconocido por el anticuerpo monoclonal 17-1A y los polipéptidos de unión a folato.

5 Otros polipéptidos y proteínas terapéuticos adecuados incluyen aquellos que pueden ser útiles para tratar individuos que padecen enfermedades y trastornos autoinmunitarios al conferir una respuesta inmunitaria protectora de base amplia contra dianas que se asocian a la autoinmunidad, incluyendo los receptores celulares y las células que producen anticuerpos "autodirigidos". Las enfermedades autoinmunitarias mediadas por linfocitos T incluyen artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), síndrome de Sjögren, sarcoidosis, diabetes mellitus insulinodependiente (DMID), tiroiditis autoinmunitaria, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, esclerodermia, 10 polimiositis, dermatomiositis, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por receptores de linfocitos T (TCR) que se unen a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada a enfermedades autoinmunitarias.

15 Otros genes ilustrativos que pueden suministrarse a través del rAAV incluyen, sin limitación, glucosa-6-fosfatasa, asociada a la enfermedad o deficiencia por almacenamiento de glucógeno de tipo 1A (GSD1), fosfoenolpiruvato-carboxicinasa (PEPCK), asociada a la deficiencia de PEPCK; cinasa de tipo 5 dependiente de ciclina (CDKL5), también conocida como serina/treonina cinasa 9 (STK9) asociada a convulsiones y al deterioro grave del desarrollo neurológico; galactosa-1 fosfato uridil transferasa, asociada a la galactosemia; fenilalanina hidroxilasa, asociado a la fenilcetonuria (PKU); alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, asociada a la enfermedad de la orina de jarabe de arce; fumarilacetoadetato hidrolasa, asociada a la tirosinemia de tipo 1; metilmalonil-CoA mutasa, asociada a la acidemia metilmalónica; acil CoA deshidrogenasa de cadena media, asociada a la deficiencia de acetil CoA de cadena media; ornitina transcarbamila (OTC), asociada a la deficiencia de ornitina transcarbamila; ácido argininosuccínico sintetasa (ASS1), asociada a la citrulinemia; deficiencia de lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT); una acidemia metilmalónica (AMM); enfermedad de Niemann-Pick, de tipo C1); 20 acidemia propiónica (AP); proteína del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), asociada a la hipercolesterolemia familiar (HF); UDP-glucuronosiltransferasa, asociada a la enfermedad de Crigler-Najjar; adenosina desaminasa, asociada a la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave; hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, asociada a la gota y al síndrome de Lesch-Nyan; biotimida, asociada a la deficiencia de biotimida; alfa-galactosidasa A (a-Gal A) asociada a la enfermedad de Fabry; ATP7B asociado a la enfermedad 25 de Wilson; beta-glucocerebrosidasa, asociada a la enfermedad de Gaucher de tipo 2 y 3; proteína de membrana de peroxisoma de 70 kDa, asociada al síndrome de Zellweger; arilsulfatasa A (ARSA) asociada a la leucodistrofia metacromática, enzima galactocerebrosidasa (GALC) asociada a la enfermedad de Krabbe, alfa-glucosidasa (GAA) asociada a la enfermedad de Pompe; gen de la esfingomielinasa (SMPD1) asociado a la enfermedad de Nieman Pick de tipo A; argininosuccinato sintasa asociada a la citrulinemia de tipo II de inicio en la edad adulta (CTLN2); carbamoil-fosfato sintasa 1 (CPS1) asociada a trastornos del ciclo de la urea; proteína de supervivencia de la neurona motora (SMN), asociada a la atrofia muscular espinal; ceramidasa asociada a la lipogranulomatosis de Farber; b-hexosaminidasa asociada a la gangliosidosis GM2 y las enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff; aspartilglucosaminidasa asociada a la aspartilglucosaminuria; a-fucosidasa asociada a la fucosidosis; a-manosidasa asociada a la alfa-manosidosis; porfobilinógeno desaminasa, asociada a la porfiria aguda intermitente (PAI); alfa-1 antitripsina para el tratamiento de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (enfisema); eritropoyetina para el 30 tratamiento de la anemia debida a talasemia o a insuficiencia renal; factor de crecimiento endotelial vascular, angiopoyetina-1 y factor de crecimiento de fibroblastos para el tratamiento de enfermedades isquémicas; inhibidor de la vía de la trombomodulina y del factor tisular para el tratamiento de vasos sanguíneos ocluidos como se observa en, por ejemplo, atherosclerosis, trombosis o embolias; descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) y tirosina hidroxilasa (TH) para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; el receptor beta adrenérgico, antisentido o una forma mutante de, fosfolambán, adenosina trifosfata-2 del retículo sarco(endo)plásmico. (SERCA2) y la adenil ciclase cardíaca para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva; un gen supresor de tumores tal como p53 para el tratamiento de diversos cánceres; una citocina tal como una de las diversas interleucinas para el tratamiento de cánceres y trastornos inflamatorios e inmunitarios; distrofina o minidistrofina y 35 utrofina o miniutrofina para el tratamiento de distrofias musculares; e, insulina o GLP-1 para el tratamiento de la diabetes.

40 Los genes y enfermedades adicionales de interés incluyen, por ejemplo, enfermedades relacionadas con el gen de la distonina, tales como la neuropatía sensorial y autonómica hereditaria de tipo VI (el gen DST codifica la distonina; pueden ser necesarios vectores de AAV duales debido al tamaño de la proteína (-7570 aa); enfermedades relacionadas con SCN9A, en las que los mutantes de pérdida de función provocan incapacidad para sentir dolor y los mutantes de ganancia de función provocan afecciones dolorosas, tales como la eritromelagia. Otra afección es Charcot-Marie-Tooth de tipo 1F y 2E debido a mutaciones en el gen NEFL (cadena ligera de neurofilamento) caracterizada por una neuropatía periférica motora y sensorial progresiva con expresión clínica y 45 electrofisiológica variable.

45 El rAAV descrito en el presente documento se puede usar en el tratamiento de trastornos de mucopolisacaridosis (MPS). Dicho rAAV puede contener una secuencia de ácido nucleico que codifica α-L-iduronidasa (IDUA) para tratar la MPS I (síndromes de Hurler, Hurler-Scheie y Scheie); una secuencia de ácido nucleico que codifica iduronato-2-sulfatasa (IDS) para tratar la MPS II (síndrome de Hunter); una secuencia de ácido nucleico que codifica la sulfamidasa (SGSH) para tratar la MPSIII A, B, C y D (síndrome de Sanfilippo); una secuencia de ácido 50

nucleico que codifica la N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) para tratar la MPS IV A y B (síndrome de Morquio); una secuencia de ácido nucleico que codifica la arilsulfatasa B (ARSB) para tratar la MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy); una secuencia de ácido nucleico que codifica hialuronidasa para tratar la MPSI IX (deficiencia de hialuronidasa) y una secuencia de ácido nucleico que codifica beta-glucuronidasa para tratar la MPS VII (síndrome de Sly).

#### 5 Transgenes inmunógenos

10 Puede usarse un vector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un producto génico asociado al cáncer (por ejemplo, supresores de tumores) para tratar el cáncer, administrando un rAAV que alberga el vector de rAAV a un sujeto que tiene el cáncer.

15 Un vector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un pequeño ácido nucleico de interferencia (por ejemplo, ARNhp, miARN) que inhibe la expresión de un producto génico asociado al cáncer (por ejemplo, oncogenes) se puede usar para tratar el cáncer, administrando un rAAV que alberga el vector de rAAV a un sujeto que tiene el cáncer. Un vector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un producto génico asociado al cáncer (o un ARN funcional que inhibe la expresión de un gen asociado al cáncer) se puede usar con fines de investigación, por ejemplo, para estudiar el cáncer o identificar terapias que traten el cáncer. La siguiente es una lista no limitante de genes de ejemplo que se sabe que se asocian al desarrollo de cáncer (por ejemplo, oncogenes y supresores de tumores): AARS, ABCB1, ABCC4, ABI2, ABL1, ABL2, ACK1, ACP2, ACY1, ADSL, AK1, AKR1C2, AKT1, ALB, ANPEP, ANXA5, ANXA7, AP2M1, APC, ARHGAP5, ARHGEF5, ARID4A, ASNS, ATF4, ATM, ATP5B, ATP5O, AXL, BARD1, BAX, BCL2, BHLHB2, BLMH, BRAF, BRCA1, BRCA2, BTK, CANX, CAP1, CAPN1, CAPNS1, CAV1, CBFB, CBLB, CCL2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCT5, CCYR61, CD24, CD44, CD59, CDC20, CDC25, CDC25A, CDC25B, CDC2L5, CDK10, CDK4, CDK5, CDK9, CDKL1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2D, CEBPG, CENPC1, CGRRF1, CHAF1A, CIB1, CKMT1, CLK1, CLK2, CLK3, CLNS1A, CLTC, COL1A1, COL6A3, COX6C, COX7A2, CRAT, CRHR1, CSF1R, CSK, CSNK1G2, CTNNA1, CTNNB1, CTPS, CTSC, CTSD, CUL1, CYR61, DCC, DCN, DDX10, DEK, DHCR7, DHRS2, DHX8, DLG3, DVL1, DVL3, E2F1, E2F3, E2F5, EGFR, EGR1, EIF5, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ETV1, ETV3, ETV6, F2R, FASTK, FBN1, FBN2, FES, FGFR1, FGR, FKBP8, FN1, FOS, FOSL1, FOSL2, FOXG1A, FOXO1A, FRAP1, FRZB, FTL, FZD2, FZD5, FZD9, G22P1, GAS6, GCN5L2, GDF15, GNA13, GNAS, GNB2, GNB2L1, GPR39, GRB2, GSK3A, GSPT1, GTF2I, HDAC1, HDGF, HMMR, HPRT1, HRB, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPB1, HSPH1, HYAL1, HYOU1, ICAM1, ID1, ID2, IDUA, IER3, IFITM1, IGF1R, IGF2R, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IL1B, ILK, ING1, IRF3, ITGA3, ITGA6, ITGB4, JAK1, JARID1A, JUN, JUNB, JUND, K-ALPHA-1, KIT, KITLG, KLK10, KPNA2, KRAS2, KRT18, KRT2A, KRT9, LAMB1, LAMP2, LCK, LCN2, LEP, LITAF, LRPAP1, LTF, LYN, LZTR1, MADH1, MAP2K2, MAP3K8, MAPK12, MAPK13, MAPKAPK3, MAPRE1, MARS, MAS1, MCC, MCM2, MCM4, MDM2, MDM4, MET, MGST1, MICB, MLLT3, MME, MMP1, MMP14, MMP17, MMP2, MNDA, MSH2, MSH6, MT3, MYB, MYBL1, MYBL2, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYL9, MYLK, NEO1, NF1, NF2, NFKB1, NFKB2, NFSF7, NID, NINE, NMBR, NME1, NME2, NME3, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, NPM1, NQO1, NR1D1, NR2F1, NR2F6, NRAS, NRG1, NSEP1, OSM, PA2G4, PABPC1, PCNA, PCTK1, PCTK2, PCTK3, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDPK1, PEA15, PFDN4, PFDN5, PGAM1, PHB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG, PIM1, PKM2, PKMYT1, PLK2, PPARD, PPARG, PPIH, PPP1CA, PPP2R5A, PRDX2, PRDX4, PRKAR1A, PRKCBP1, PRNP, PRSS15, PSMA1, PTCH, PTEN, PTGS1, PTMA, PTN, PTPRN, RAB5A, RAC1, RAD50, RAF1, RALBP1, RAP1A, RARA, RARB, RASGRF1, RB1, RBBP4, RBL2, REA, REL, RELA, RELB, RET, RFC2, RGS19, RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RIPK1, RPN2, RPS6KB1, RRM1, SARS, SELENBP1, SEMA3C, SEMA4D, SEPP1, SERPINH1, SFN, SFPQ, SFRS7, SHB, SHH, SIAH2, SIVA, SIVA TP53, SKI, SKIL, SLC16A1, SLC20A1, SMO, esfingomielina fosfodiesterasa 1 (SMPD1), SNAI2, SND1, SNRBP2, SOCS1, SOCS3, SOD1, SORT1, SPINT2, SPRY2, SRC, SRPX, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, STC1, TAF1, TBL3, TBRG4, TCF1, TCF7L2, TFAP2C, TFDP1, TFDP2, TGFA, TGFB1, TGFB1I, TGFB2R, TGFB3, THBS1, TIE, TIMP1, TIMP3, TJP1, TK1, TLE1, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF6, TNFSF7, TNK1, TOB1, TP53, TP53BP2, TP53BP1, TP5313, TP73, 50 TPBG, TPT1, TRADD, TRAM1, TRRAP, TSG101, TUFM, TXNRD1, TYRO3, UBC, UBE2L6, UCHL1, USP7, VDAC1, VEGF, VHL, VIL2, WEE1, WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WT1, XRCC1, YES1, YWHAZ, ZAP70 y ZNF9.

55 Un vector de rAAV puede comprender como transgén, un ácido nucleico que codifica una proteína o ARN funcional que modula la apoptosis. La siguiente es una lista no limitante de genes asociados a la apoptosis y ácidos nucleicos que codifican los productos de estos genes y sus homólogos y que codifican ácidos nucleicos de interferencia pequeños (por ejemplo, ARNhp, miARN) que inhiben la expresión de estos genes y sus homólogos son útiles como transgenes: RPS27A, ABL1, AKT1, APAF1, BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAK1, BAX, BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L2, BCLAF1, BFAR, BID, BIK, NAIP, BIRC2, BIRC3, 60 XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BOK, BRAF, CARD10, CARD11, CARD11, NLRC4, CARD14, NOD2, NOD1, CARD6, CARDS, CARDS, CASP1, CASP10, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR, CIDEA, CIDEDE, CRADD, DAPK1, DAPK2, DFFB, FADD, GADD45A, GDNF, HRK, IGF1R, LTA, LTBR, MCL1, NOL3, PYCARD, RIPK1, RIPK2, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF14, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF18, 65 CD40LG, FASLG, CD70, TNFSF8, TNFSF9, TP53, TP53BP2, TP73, TP63, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3,

TRAF4 y TRAF5.

Los productos génicos útiles también incluyen miARN. Los miARN y otros ácidos nucleicos de interferencia pequeños regulan la expresión génica a través de la escisión/degradación del transcripto de ARN diana o la represión traduccional del ARN mensajero (ARNm) diana. Los miARN se expresan de forma nativa, normalmente como 19-25 productos finales de ARN no traducido. Los miARN presentan su actividad a través de interacciones específicas de secuencia con las regiones 3' no traducidas (UTR) de los ARNm diana. Estos miARN expresados endógenamente forman precursores en horquilla que posteriormente se procesan en un dúplex de miARN y, posteriormente, en una molécula de miARN monocatenario "maduro". Este miARN maduro guía un complejo de múltiples proteínas, miRISC, que identifica el sitio diana, por ejemplo, en las regiones UTR 3', de ARNm diana basándose en su complementariedad con el miARN maduro.

La siguiente lista no limitante de genes de miARN y sus homólogos, son útiles como genes o como dianas para ácidos nucleicos de interferencia pequeños codificados por genes (por ejemplo, esponjas de miARN, oligonucleótidos antisentido, ARN TuD): hsa-let-7a, hsa-let-7a\*, hsa-let-7b, hsa-let-7b\*, hsa-let-7c, hsa-let-7c\*, hsa-let-7d, hsa-let-7d\*, hsa-let-7e, hsa-let-7e\*, hsa-let-7f, hsa-let-7f-1\*, hsa-let-7f-2\*, hsa-let-7g, hsa-let-7g\*, hsa-let-71, hsa-let-71\*, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-100\*, hsa-miR-101, hsa-miR-101\*, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-105\*, hsa-miR-106a, hsa-miR-106a\*, hsa-miR-106b, hsa-miR-106b\*, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10a\*, hsa-miR-10b, hsa-miR-10b\*, hsa-miR-1178, hsa-miR-1179, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185, hsa-miR-1197, hsa-miR-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1204, hsa-miR-1205, hsa-miR-1206, hsa-miR-1207-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1208, hsa-miR-122, hsa-miR-122\*, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1226, hsa-miR-1226\*, hsa-miR-1227, hsa-miR-1228, hsa-miR-1228\*, hsa-miR-1229, hsa-miR-1231, hsa-miR-1233, hsa-miR-1234, hsa-miR-1236, hsa-miR-1237, hsa-miR-1238, hsa-miR-124, hsa-miR-124\*, hsa-miR-1243, hsa-miR-1244, hsa-miR-1245, hsa-miR-1246, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1249, hsa-miR-1250, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1254, hsa-miR-1255a, hsa-miR-1255b, hsa-miR-1256, hsa-miR-1257, hsa-miR-1258, hsa-miR-1259, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-125b-1\*, hsa-miR-125b-2\*, hsa-miR-126, hsa-miR-126\*, hsa-miR-1260, hsa-miR-1261, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1264, hsa-miR-1265, hsa-miR-1266, hsa-miR-1267, hsa-miR-1268, hsa-miR-1269, hsa-miR-1270, hsa-miR-1271, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-1274a, hsa-miR-1274b, hsa-miR-1275, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-1279, hsa-miR-1280, hsa-miR-1281, hsa-miR-1282, hsa-miR-1283, hsa-miR-1284, hsa-miR-1285, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-1288, hsa-miR-1289, hsa-miR-129\*, hsa-miR-1290, hsa-miR-1291, hsa-miR-1292, hsa-miR-1293, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-1294, hsa-miR-1295, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-1297, hsa-miR-1298, hsa-miR-1299, hsa-miR-1300, hsa-miR-1301, hsa-miR-1302, hsa-miR-1303, hsa-miR-1304, hsa-miR-1305, hsa-miR-1306, hsa-miR-1307, hsa-miR-1308, hsa-miR-130a, hsa-miR-130a\*, hsa-miR-130b, hsa-miR-130b\*, hsa-miR-132, hsa-miR-132\*, hsa-miR-1321, hsa-miR-1322, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135a\*, hsa-miR-135b, hsa-miR-135b\*, hsa-miR-136, hsa-miR-136\*, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-138-1\*, hsa-miR-138-2\*, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-141\*, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-143\*, hsa-miR-144, hsa-miR-144\*, hsa-miR-145, hsa-miR-145\*, hsa-miR-146a, hsa-miR-146a\*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a, hsa-miR-148a\*, hsa-miR-148b, hsa-miR-148b\*, hsa-miR-149, hsa-miR-149\*, hsa-miR-150, hsa-miR-150\*, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154\*, hsa-miR-155, hsa-miR-155\*, hsa-miR-15a, hsa-miR-15a\*, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b\*, hsa-miR-16, hsa-miR-16-1\*, hsa-miR-16-2\*, hsa-miR-17, hsa-miR-17\*, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a\*, hsa-miR-181a-2\*, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181c\*, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182\*, hsa-miR-1825, hsa-miR-1826, hsa-miR-1827, hsa-miR-183, hsa-miR-183\*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-185\*, hsa-miR-186, hsa-miR-186\*, hsa-miR-187, hsa-miR-187\*, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a\*, hsa-miR-18b, hsa-miR-18b\*, hsa-miR-190, hsa-miR-190b, hsa-miR-191, hsa-miR-191\*, hsa-miR-192, hsa-miR-192\*, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-193b\*, hsa-miR-194, hsa-miR-194\*, hsa-miR-195, hsa-miR-195\*, hsa-miR-196a, hsa-miR-196a\*, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19a\*, hsa-miR-19b, hsa-miR-19b-1\*, hsa-miR-19b-2\*, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a\*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200b\*, hsa-miR-200c, hsa-miR-200c\*, hsa-miR-202, hsa-miR-202\*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20a\*, hsa-miR-20b, hsa-miR-20b\*, hsa-miR-21, hsa-miR-21\*, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-214\*, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-218-1\*, hsa-miR-218-2\*, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-22\*, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-221\*, hsa-miR-222, hsa-miR-222\*, hsa-miR-223, hsa-miR-223\*, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23a\*, hsa-miR-23b, hsa-miR-23b\*, hsa-miR-24, hsa-miR-24-1\*, hsa-miR-24-2\*, hsa-miR-25, hsa-miR-25\*, hsa-miR-26a, hsa-miR-26a-1\*, hsa-miR-26a-2\*, hsa-miR-26b, hsa-miR-26b\*, hsa-miR-27a, hsa-miR-27a\*, hsa-miR-27b, hsa-miR-27b\*, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29a\*, hsa-miR-29b, hsa-miR-296-1\*, hsa-miR-296-2\*, hsa-miR-29c, hsa-miR-29c\*, hsa-miR-300, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a, hsa-miR-302a\*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b\*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c\*, hsa-miR-302d, hsa-miR-302d\*, hsa-miR-302e, hsa-miR-302f, hsa-miR-30a, hsa-miR-30a\*, hsa-miR-30b, hsa-miR-30b\*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30c-1\*, hsa-miR-30c-2\*, hsa-miR-30d, hsa-miR-30d\*, hsa-miR-30e, hsa-miR-30e\*, hsa-

miR-31, hsa-miR-31\*, hsa-miR-32, hsa-miR-32\*, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d,  
 5 hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328,  
 hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335\*,  
 hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-  
 33a, hsa-miR-33a\*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b\*, hsa-miR-340, hsa-miR-340\*, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p,  
 hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a\*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b\*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-  
 34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363\*, hsa-  
 10 miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367\*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-  
 371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373\*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a\*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b\*,  
 15 hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a\*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c, hsa-miR-377, hsa-miR-377\*, hsa-  
 miR-378, hsa-miR-378\*, hsa-miR-379, hsa-miR-379\*, hsa-miR-380, hsa-miR-380\*, hsa-miR-381, hsa-miR-382,  
 hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411\*, hsa-  
 20 miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424\*, hsa-miR-  
 425, hsa-miR-425\*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431\*, hsa-miR-432, hsa-miR-432\*, hsa-miR-433, hsa-  
 25 miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451,  
 hsa-miR-452, hsa-miR-452\*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454\*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-  
 483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-  
 30 miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-miR-488\*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-  
 491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493\*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496,  
 35 hsa-miR-497, hsa-miR-497\*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500\*, hsa-  
 miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-  
 40 miR-505\*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p,  
 hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-  
 45 5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-  
 516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517\*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-  
 518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c\*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-  
 50 miR-518e\*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f\*, hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d,  
 hsa-miR-519e, hsa-miR-519e\*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-  
 520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-  
 55 522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-  
 526b\*, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-541, hsa-miR-541\*, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-  
 542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-545\*, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-  
 548b-3p, hsa-miR-5486-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-  
 548e, hsa-miR-548f, hsa-miR-548g, hsa-miR-548h, hsa-miR-548i, hsa-miR-548j, hsa-miR-548k, hsa-miR-548l,  
 60 hsa-miR-548m, hsa-miR-548n, hsa-miR-548o, hsa-miR-548p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-550\*, hsa-  
 miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-551b\*, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-  
 3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-  
 65 miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-  
 miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-  
 miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-  
 584, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-589\*, hsa-miR-590-3p, hsa-  
 miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-593\*, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597,  
 hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605,  
 hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613,  
 hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-616\*, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-  
 70 miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-624\*, hsa-miR-625,  
 hsa-miR-625\*, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-629\*, hsa-miR-  
 75 630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-  
 638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-  
 646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-  
 654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660,  
 hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-663b, hsa-miR-664, hsa-miR-664\*, hsa-miR-665, hsa-miR-  
 668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675, hsa-miR-7, hsa-miR-708, hsa-miR-708\*, hsa-miR-7-1\*, hsa-  
 miR-7-2\*, hsa-miR-720, hsa-miR-744, hsa-miR-744\*, hsa-miR-758, hsa-miR-760, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-  
 80 miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-  
 5p, hsa-miR-802, hsa-miR-873, hsa-miR-874, hsa-miR-875-3p, hsa-miR-875-5p, hsa-miR-876-3p, hsa-miR-876-  
 5p, hsa-miR-877, hsa-miR-877\*, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-  
 887, hsa-miR-888, hsa-miR-888\*, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-892a, hsa-  
 85 miR-892b, hsa-miR-9, hsa-miR-9\*, hsa-miR-920, hsa-miR-921, hsa-miR-922, hsa-miR-923, hsa-miR-924, hsa-  
 miR-92a, hsa-miR-92a-1\*, hsa-miR-92a-2\*, hsa-miR-92b, hsa-miR-92b\*, hsa-miR-93, hsa-miR-93\*, hsa-miR-933,  
 hsa-miR-934, hsa-miR-935, hsa-miR-936, hsa-miR-937, hsa-miR-938, hsa-miR-939, hsa-miR-940, hsa-miR-941,  
 hsa-miR-942, hsa-miR-943, hsa-miR-944, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-96\*, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-  
 90 miR-99a\*, hsa-miR-99b y hsa-miR-99b\*. Por ejemplo, puede ser de interés el miARN dirigido al marco de lectura  
 95 abierta 72 (C9orf72) del cromosoma 8, que expresa la superóxido dismutasa (SOD1), asociada a la esclerosis  
 lateral amiotrófica (ELA).

Un miARN inhibe la función de los ARNm a los que se dirige y, como resultado, inhibe la expresión de los polipéptidos codificados por los ARNm. Por lo tanto, bloquear (parcial o totalmente) la actividad del miARN (por ejemplo, silenciar el miARN) puede inducir eficazmente, o restablecer, la expresión de un polipéptido cuya expresión está inhibida (desreprimir el polipéptido).

- 5 La desrepresión de polipéptidos codificados por dianas de ARNm de un miARN se puede lograr inhibiendo la actividad de miARN en las células a través de una cualquiera de una diversidad de métodos. Por ejemplo, el bloqueo de la actividad de un miARN se puede lograr mediante hibridación con un pequeño ácido nucleico de interferencia (por ejemplo, oligonucleótido antisentido, esponja de miARN, ARN TuD) que es complementario, o 10 sustancialmente complementario a, el miARN, bloqueando de este modo la interacción del miARN con su ARNm diana. Como se usa en el presente documento, un pequeño ácido nucleico de interferencia que es sustancialmente complementario a un miARN es aquel que es capaz de hibridarse con un miARN y bloquear la actividad del miARN.
- 15 Un ácido nucleico de interferencia pequeño que es sustancialmente complementario a un miARN puede ser un ácido nucleico de interferencia pequeño que es complementario al miARN en todas menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 bases. Un "inhibidor de miARN" es un agente que bloquea la función, expresión y/o procesamiento de miARN. Por ejemplo, estas moléculas incluyen, pero sin limitación, microARN antisentido específico, esponjas de microARN, ARN señuelo resistentes (ARN TuD) y oligonucleótidos de microARN (oligonucleótidos cortos de horquilla bicatenarios) que inhiben la interacción de los miARN con un complejo Drosha.
- 20 20 Otros genes útiles más pueden incluir aquellos que codifican inmunoglobulinas que confieren inmunidad pasiva a un patógeno. Una "molécula de inmunoglobulina" es una proteína que contiene las porciones inmunológicamente activas de una cadena pesada de inmunoglobulina y cadena ligera de inmunoglobulina acopladas covalentemente entre sí y capaces de combinarse específicamente con un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina son de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se pueden usar indistintamente en el presente documento.
- 25 30 Una "cadena pesada de inmunoglobulina" es un polipéptido que contiene al menos una porción del dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina y al menos una porción de una región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina o al menos una porción de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Por lo tanto, la cadena pesada derivada de inmunoglobulina tiene regiones significativas de homología de secuencia de aminoácidos con un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. Por ejemplo, la cadena pesada en un fragmento de Fab es una cadena pesada derivada de inmunoglobulina.
- 35 40 Una "cadena ligera de inmunoglobulina" es un polipéptido que contiene al menos una porción del dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina y al menos una porción de la región variable o al menos una porción de una región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina. Por lo tanto, la cadena ligera derivada de inmunoglobulina tiene regiones significativas de homología de aminoácidos con un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina.
- 45 Una "inmunoadhesina" es una molécula química, similar a un anticuerpo que combina el dominio funcional de una proteína de unión, por lo general un receptor, ligando o molécula de adhesión celular, con dominios constantes de inmunoglobulina, por lo general que incluyen las regiones bisagra y Fc.
- 50 55 Un "fragmento de unión a antígeno (Fab)" es una región en un anticuerpo que se une a antígenos. Se compone de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada y ligera.
- 60 65 La construcción antipatógena se selecciona basándose en el agente causante (patógeno) de la enfermedad contra la que se busca protección. Estos patógenos pueden ser de origen vírico, bacteriano o fúngico, y se puede usar para prevenir infección en seres humanos contra enfermedades humanas, o en mamíferos no humanos u otros animales para prevenir enfermedades veterinarias.
- 70 El rAAV puede incluir genes que codifican anticuerpos y, en particular, anticuerpos neutralizantes contra un patógeno vírico. Dichos anticuerpos antivíricos pueden incluir anticuerpos anti-gripe dirigidos contra uno o más de Gripe A, Gripe B y Gripe C. Los virus de tipo A son los patógenos humanos más virulentos. Los serotipos de gripe A que se han asociado a pandemias incluyen, H1N1, que provocó la gripe española en 1918 y la gripe porcina en 2009; H2N2, que provocó la gripe asiática en 1957; H3N2, que provocó la gripe de Hong Kong en 1968; HSN1, que provocó la gripe aviar en 2004; H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3; y H10N7. Otros virus patógenos diana incluyen, arenavirus (incluyendo funina, machupo y Lassa), filovirus (incluyendo Marburg y Ébola), hantavirus, picornavirus (incluyendo rinovirus, ecovirus), coronavirus, paramixovirus, morbillivirus, virus sincicial respiratorio, togavirus, virus coxsackie, virus JC, parvovirus B19, paragripe, adenovirus, reovirus, variola (*Variola major* (Viruela)) y *Vaccinia* (Viruela vacunal) de la familia de los poxvirus y varicela-zóster (pseudorrabia). Las fiebres hemorrágicas víricas son causadas por miembros de la familia de los arenavirus (fiebre de Lassa) (familia que también se asocia a la coriomeningitis linfocítica (CML)), filovirus (virus del ébola) y hantavirus (puremala). Los miembros de picornavirus (una subfamilia de rinovirus), se asocian al resfriado común en seres humanos. La familia

coronavirus, que incluye una serie de virus no humanos, tales como el virus de la bronquitis infecciosa (aves de corral), el virus gastroenterítico transmisible porcino (cerdo), el virus de encefalomielitis por hemaglutinatina porcina (cerdo), virus de peritonitis infecciosa felina (gatos), coronavirus entérico felino (gato), coronavirus canino (perro). Los coronavirus respiratorios humanos, supuestamente se han asociado al resfriado común, a la hepatitis no A, B o C y el síndrome respiratorio agudo repentino (SRRA). La familia de paramixovirus incluye el Virus paragripal de Tipo 1, el Virus paragripal de Tipo 3, el Virus paragripal de Tipo 3 bovino, rubulavirus (virus de las paperas, el Virus paragripal de Tipo 2, el Virus paragripal de Tipo 4, el virus de la enfermedad de Newcastle (pollos), peste bovina, morbillivirus, que incluye sarampión y moquillo canino y neumovirus, que incluye el virus respiratorio sincitial (VRS).

5 La familia de parvovirus el parvovirus felino (enteritis felina), el panleucovirus felino, el parvovirus canino y el parvovirus porcino. La familia adenovirus incluye los virus (EX, AD7, DRA, O.B.) que provocan enfermedades respiratorias. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, se puede modificar por ingeniería genética un vector de rAAV como se describe en el presente documento para expresar un anticuerpo anti-ébola, por ejemplo, 2G4, 4G7, 13C6, un anticuerpo anti-gripe, por ejemplo, FI6, CR8033 y anticuerpo anti-VRS, por ejemplo, palivizumab, motavizumab.

10 15 También se puede seleccionar una construcción de anticuerpo neutralizante contra un patógeno bacteriano para su uso en la presente invención. La construcción de anticuerpo neutralizante se puede dirigir contra las propias bacterias. La construcción de anticuerpo neutralizante se puede dirigir contra una toxina producida por las bacterias. Los ejemplos de patógenos bacterianos transmitidos por el aire incluyen, por ejemplo, *Neisseria meningitidis* (meningitis), *Klebsiella pneumonia* (neumonía), *Pseudomonas aeruginosa* (neumonía), *Pseudomonas pseudomallei* (neumonía), *Pseudomonas mallei* (neumonía), *Acinetobacter* (neumonía), *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella lacunata*, *Alkaligenes*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus influenzae* (gripe), *Haemophilus parainfluenzae*, *Bordetella pertussis* (tosferina), *Francisella tularensis* (neumonía/fiebre), *Legionella pneumonia* (enfermedad de los legionarios), *Chlamydia psittaci* (neumonía), *Chlamydia pneumoniae* (neumonía), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis (TB)), *Mycobacterium kansasii* (TB), *Mycobacterium avium* (neumonía), *Nocardia asteroides* (neumonía), *Bacillus anthracis* (ántrax), *Staphylococcus aureus* (neumonía), *Streptococcus pyogenes* (fiebre escarlatina), *Streptococcus pneumoniae* (neumonía), *Corynebacteria diphtheriae* (difteria), *Mycoplasma pneumoniae* (neumonía).

20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 El rAAV puede incluir genes que codifican anticuerpos y, en particular, anticuerpos neutralizantes contra un patógeno bacteriano tal como el agente causante del ántrax, una toxina producida por *Bacillus anthracis*. Se han descrito anticuerpos neutralizantes contra el agente protector (PA), uno de los tres péptidos que forman el toxoide. Los otros dos polipéptidos consisten en factor letal (LF) y factor de edema (EF). Se ha descrito que los anticuerpos neutralizantes anti-PA son eficaces en la inmunización pasiva contra el ántrax. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.442.373; R. Sawada-Hirai et al., J Immune Based Ther Vaccines. 2004; 2: 5. (en línea el 12 de mayo de 2004). Aún se han descrito y/o pueden generarse otros anticuerpos neutralizantes anti-toxina antráctica. De forma similar, pueden usarse anticuerpos neutralizantes contra otras bacterias y/o toxinas bacterianas para generar una construcción antipatógena suministrada por AAV como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos contra enfermedades infecciosas que pueden ser causadas por parásitos o por hongos, incluyendo, por ejemplo, especies de *Aspergillus*, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor plumbeus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, especies de *Penicillium*, *Micropolysporae*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Alternaria alternate*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y especies de *Stachybotrys*.

El rAAV puede incluir genes que codifican anticuerpos, y particularmente anticuerpos neutralizantes, contra factores patógenos de enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), GBA-Parkinson, artritis reumatoide (AR), síndrome del intestino irritable (SII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cánceres, tumores, esclerosis sistémica, asma y otras enfermedades. Dichos anticuerpos pueden ser, sin limitación, , por ejemplo, alfa-sinucleína, anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (anti-VEGF), , anti-VEGFA, anti-PD-1, anti-PDL1, anti-CTLA-4, anti-TNF-alfa, anti-IL-17, anti-IL-23, anti-IL-21, anti-IL-6, anti-receptor de IL-6, anti-IL-5, anti-IL-7, anti-Factor XII, anti-IL-2, anti-HIV, anti-IgE, anti-receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1), anti-notch 2/3, anti-notch 1, anti-OX40, anti-tirosina cinasa 3 receptora de erb-b2 (ErbB3), anti-ErbB2, antígeno de maduración de células anti-beta, estimulador de linfocitos anti-B, anti-CD20, anti-HER2, anti-factor estimulante de colonas de granulocitos y macrófagos, anti-oncostatina M (OSM), anti-proteína del gen 3 de activación antilinfocitos (LAG3), anti-CCL20, anti-componente P de amiloide de suero (SAP), anti-inhibidor de prolil hidroxilasa, anti-CD38, anti-glicoproteína IIb/IIIa, anti-CD52, anti-CD30, anti-IL-1beta, anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico, anti-CD25, anti-ligando de RANK, anti-proteína C5 del sistema del complemento, anti-CD11a, anti-receptor de CD3, anti-integrina alfa-4 (α4), anti-proteína F de VRS y anti-integrina α<sub>4</sub>β<sub>7</sub>. Aún otros patógenos y enfermedades resultarán evidentes para un experto en la materia. Otros anticuerpos adecuados pueden incluir aquellos útiles para tratar la enfermedad de Alzheimer, tales como, por ejemplo, anti-beta-amiloide (por ejemplo, crenezumab, solanezumab, aducanumab), anti-fibrilla beta-amiloide, anti-placas de beta-amiloide, anti-tau, un bapineuzamab, entre otros. Otros anticuerpos adecuados para tratar una diversidad de indicaciones incluyen los descritos, por ejemplo, en el documento PCT/US2016/058968, presentado el 27 de octubre de 2016, publicado como documento WO 2017/075119A1.

## II. Producción de vectores de rAAV

Para su uso en la producción de un vector vírico de AAV (por ejemplo, un AAV recombinante(r)), los casetes de expresión pueden transportarse en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, que se suministra a una célula hospedadora de empaquetamiento. Los plásmidos útiles en la presente invención se pueden modificar por ingeniería genética de manera que sean adecuados para replicación y empaquetamiento. *in vitro* en células procarióticas, células de insecto, células de mamífero, entre otros. Las técnicas de transfección y empaquetamiento de células hospedadoras adecuadas son conocidas y/o pueden ser diseñadas fácilmente por un experto en la materia.

En la técnica se conocen métodos para generar y aislar AAV adecuados para su uso como vectores. Véase, en general, por ejemplo, Grieger y Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications", Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning *et al.*, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology", J. Gene Med. 10:717-733; y las referencias que se citan a continuación. Para empaquetar un gen en viriones, las ITR son los únicos componentes de AAV necesarios en *cis* en la misma construcción que la molécula de ácido nucleico que contiene el casete o casetes de expresión. Los genes cap y rep pueden suministrarse en *trans*.

Los casetes de expresión descritos en el presente documento se pueden modificar por ingeniería genética en un elemento genético (por ejemplo, un plásmido lanzadera) que transfiere las secuencias de la construcción de inmunoglobulina transportadas en la misma a una célula hospedador de empaquetamiento para producir un vector vírico.

El elemento genético seleccionado se puede suministrar a una célula de empaquetamiento de AAV mediante cualquier método adecuado, incluyendo transfección, electroporación, suministro en liposomas, técnicas de fusión de membranas, microgránulos recubiertos con ADN de alta velocidad, infección vírica o fusión de protoplastos. También se pueden fabricar células de empaquetamiento de AAV estables. Como alternativa, los casetes de expresión pueden usarse para generar un vector vírico distinto de AAV, o para la producción de mezclas de anticuerpos *in vitro*. Los métodos utilizados para crear dichas construcciones son conocidos por los expertos en la manipulación de ácido nucleico e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas de síntesis. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green y Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

La expresión "intermedio de AAV" o "intermedio de vector de AAV" se refiere a una cápside de rAAV ensamblada que carece de las secuencias genómicas deseadas empaquetadas en la misma. También puede denominarse cápside "vacía". Dicha cápside puede no contener secuencias genómicas detectables de un casete de expresión, o sólo secuencias genómicas parcialmente empaquetadas que son insuficientes para lograr la expresión del producto génico. Estas cápsides vacías no son funcionales para transferir el gen de interés a una célula hospedadora.

El virus recombinante adenoasociado (AAV) descrito en el presente documento puede generarse usando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, el documento WO 2003/042397; el documento WO 2005/033321, el documento WO 2006/110689; el documento US 7588772 B2. Un método de este tipo implica cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside de AAV; un gen rep funcional; un casete de expresión compuesto por, como mínimo, repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y un transgén; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del casete de expresión en la proteína de la cápside de AAV. Se han descrito métodos de generación de la cápside, secuencias codificantes para la misma y métodos para la producción de vectores víricos de rAAV. Véase, por ejemplo, Gao, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (10), 6081-6086 (2003) y el documento US 2013/0045186A1. Se puede producir un AAVhu68 recombinante usando un cultivo celular de producción como se describe a continuación. Un cultivo celular de este tipo contiene un ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 2, que expresa la proteína de la cápside AAVhu68 en la célula hospedadora; una molécula de ácido nucleico adecuada para el empaquetamiento en la cápside AAVhu68, es decir, un genoma de vector que contiene ITR de AAV y una secuencia de ácido nucleico no de AAV que codifica un producto génico unido operativamente a secuencias que dirigen la expresión del producto en una célula hospedadora; y suficientes funciones rep de AAV y funciones auxiliares de adenovirus para permitir el empaquetamiento de la molécula de ácido nucleico en la cápside AAVhu68 recombinante. El cultivo celular puede estar compuesto por células de mamífero (por ejemplo, células de riñón embrionario humano 293, entre otras) o células de insecto (por ejemplo, baculovirus).

Opcionalmente, las funciones rep son proporcionadas por un AAV distinto de hu68. Al menos partes de las funciones rep pueden ser de AAVhu68. Véase, por ejemplo, las secuencias rep codifican las proteínas rep de SEQ ID NO: 4, y fragmentos funcionales de las mismas. La rep de AAV puede estar codificada por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3. La proteína rep puede ser una proteína rep heteróloga distinta de AAVhu68rep, por ejemplo, pero sin limitación, proteína rep de AAV1, proteína rep de AAV2, proteína rep de AAV3, proteína rep de AAV4, proteína rep de AAV5, proteína rep de AAV6, proteína rep de AAV7, proteína rep de AAV8; o repetición 78, rep 68, rep 52, rep 40, rep68/78 y rep40/52; o un fragmento de las mismas; u otra fuente. Opcionalmente, las

secuencias rep y cap están en el mismo elemento genético en el cultivo celular. Puede haber un espaciador entre la secuencia rep y el gen cap. Opcionalmente, el espaciador es atgactaaaccagg, SEQ ID NO: 9. Cualquiera de estas secuencias de AAVu68 o cápside de AAV mutante puede estar bajo el control de secuencias de control reguladoras exógenas que dirigen la expresión de las mismas en una célula hospedadora.

- 5 Los vectores de terapia génica pueden fabricarse en un cultivo celular adecuado (por ejemplo, células HEK 293). Los métodos para fabricar los vectores de terapia génica descritos en el presente documento incluyen métodos bien conocidos en la técnica, como la generación de ADN plasmídico utilizado para la producción de vectores de terapia génica, generación de los vectores, y purificación de los vectores. El vector de terapia génica puede ser un vector de AAV y los plásmidos generados pueden ser un plásmido cis de AAV que codifica el genoma de AAV y el gen de interés, un trans-plásmido de AAV que contiene genes rep y cap de AAV, y un plásmido auxiliar de adenovirus. El proceso de generación de vectores puede incluir etapas de método tales como el inicio del cultivo celular, pase de células, siembra de células, transfección de células con el ADN plasmídico, cambio de medio postransfección a medio sin suero, y recogida de células y medios de cultivo que contienen vectores. Las células que contienen vectores recogidas y los medios de cultivo se denominan en el presente documento recogida de células en bruto. En otro sistema más, los vectores de terapia génica se introducen en células de insectos mediante infección con vectores a base de baculovirus. Para revisiones de estos sistemas de producción, véase, en general, por ejemplo, Zhang *et al.*, 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production", Human Gene Therapy 20:922-929.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- También se describen métodos de fabricación y uso de estos y otros sistemas de producción de AAV en las siguientes Patentes de EE.UU.: 5.139.941; 5.741.683; 6.057.152; 6.204.059; 6.268.213; 6.491.907; 6.660.514; 6.951.753; 7.094.604; 7.172.893; 7.201.898; 7.229.823; y 7.439.065.
- Posteriormente, la recogida de células en bruto puede someterse a etapas del método tales como la concentración de la recogida de vectores, diafiltración de la recogida de vectores, microfluidización de la recogida de vectores, digestión con nucleasas de la recogida de vectores, filtración de intermedio microfluidizado, purificación en crudo mediante cromatografía, purificación en crudo por ultracentrifugación, intercambio de tampón por filtración de flujo tangencial, y/o formulación y filtración para preparar el vector a granel.
- Se usa una purificación por cromatografía de afinidad en dos etapas a alta concentración de sal seguida de una cromatografía con resina de intercambio aniónico para purificar el producto farmacológico vector y eliminar las cápsides vacías. Estos métodos se describen con más detalle en la Solicitud de Patente de Internacional N.º PCT/US2016/065970, presentada el 9 de diciembre de 2016 y sus documentos de prioridad, la Solicitud de Patente de EE.UU. 62/322.071, presentada el 13 de abril de 2016 y 62/226.357, presentada el 11 de diciembre de 2015 y titulado "Método de purificación escalable para AAV9", métodos de purificación para AAV8, Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US2016/065976, presentada el 9 de diciembre de 2016, y sus documentos de prioridad Solicitud de patente de EE.UU. N.º 62/322.098, presentada el 13 de abril de 2016 y 62/266.341, presentada el 11 de diciembre de 2015, y rh10, Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US16/66013, presentada el 9 de diciembre de 2016 y sus documentos de prioridad, la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 62/3220.55, presentada el 13 de abril de 2016 y 62/266.347, titulada "Método de purificación escalable para AAVrh10", también presentada el 11 de diciembre de 2015, y para AAV1, Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/US2016/065974, presentada el 9 de diciembre de 2016, y sus documentos de prioridad Solicitud de patente de EE.UU. N.º 62/322.083, presentada el 13 de abril de 2016 y 62/26.351, para "Método de purificación escalable para AAV1", presentada el 11 de diciembre de 2015.
- Para calcular el contenido de partículas vacías y llenas, los volúmenes de las bandas de VP3 para una muestra seleccionada (por ejemplo, en los ejemplos del presente documento, una preparación purificada por gradiente de yodixanol donde 4 de CG = 4 de partículas) se trazan contra las partículas de CG cargadas. La ecuación lineal resultante ( $y = mx+c$ ) se utiliza para calcular el número de partículas en los volúmenes de banda de los picos del artículo de ensayo. El número de partículas (pt) por cada 20  $\mu$ l cargadas se multiplica entonces por 50 para proporcionar las partículas (pt)/ml. El valor de pt/ml dividido por el valor de CG/ml proporciona la relación entre las partículas y las copias de genoma (pt(CG)). Pt/ml-CG/ml proporciona el valor de pt vacías/ml. Las pt vacías/ml, divididas entre las pt/ml y  $\times 100$  proporciona el porcentaje de partículas vacías.
- Generalmente, se conocen métodos de análisis de cápsides vacías y partículas de vectores de AAV con genomas empaquetados. Véase, por ejemplo, Grimm *et al.*, Gene Therapy (1999) 6:1322-1330; Sommer *et al.*, Molec. Ther. (2003) 7:122-128. Para analizar las cápsides desnaturalizadas, los métodos incluyen someter la reserva de AAV tratada a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, que consiste en cualquier gel capaz de separar las tres proteínas de la cápside, por ejemplo, un gel de gradiente que contenga un 3-8 % de acetato de Tris en el tampón, después correr el gel hasta que se separa el material de la muestra y transferir el gel sobre membranas de nailon o nitrocelulosa, preferentemente nailon. Posteriormente se usan anticuerpos dirigidos contra la cápside del AAV como anticuerpos primarios que se unen a proteínas de la cápside desnaturalizadas, preferentemente un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cápside del AAV, mucho más preferentemente, el anticuerpo monoclonal B1 dirigido contra AAV-2 (Wobus *et al.*, J. Virol. (2000) 74:9281-9293). Despues se usa un anticuerpo secundario,

uno que se une al anticuerpo primario y contiene un medio para detectar la unión con el anticuerpo primario, más preferentemente un anticuerpo anti-IgG que contiene una molécula de detección unida covalentemente a él, mucho más preferentemente un anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón unido covalentemente a peroxidasa de rábano picante. Se usa un método de detección de la unión para determinar semicuantitativamente la unión entre los anticuerpos primarios y secundarios, preferentemente un método de detección capaz de detectar las emisiones de isótopos radiactivos, radiación electromagnética o cambios colorimétricos, preferentemente un kit de detección por quimioluminiscencia. Por ejemplo, para la SDS-PAGE, se pueden tomar muestras de las fracciones de la columna y calentarlas en tampón de carga SDS-PAGE que contenga agente reductor (por ejemplo, DTT), y las proteínas de la cápside se resuelven en geles de poliacrilamida de gradiente precolados (por ejemplo, Novex). La tinción con plata se puede realizar usando SilverXpress (Invitrogen, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante u otro método de tinción adecuado, es decir, tinciones SYPRO ruby o coomassie. La concentración de genomas de vectores AAV (vg) en las fracciones de la columna puede medirse mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Las muestras se diluyen y se digieren con DNasa I (u otra nucleasa adecuada) para retirar el ADN exógeno. Despues de la inactivación de la nucleasa, las muestras se diluyen y amplifican adicionalmente usando cebadores y una sonda fluorogénica TaqMan™ específica para la secuencia de ADN entre los cebadores. El número de ciclos necesarios para alcanzar un nivel definido de fluorescencia (ciclo umbral, Ct) se mide para cada muestra en un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems Prism 7700. El ADN plasmídico que contiene secuencias idénticas a las del vector AAV se emplea para generar una curva patrón en la reacción Q-PCR. Los valores del ciclo umbral (Ct) obtenidos de las muestras se usan para determinar el título del genoma de vector normalizándolo con el valor de Ct de la curva patrón del plásmido. También pueden usarse ensayos de punto final basados en la PCR digital.

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

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

En resumen, el método para separar partículas de rAAVhu68 que tienen secuencias genómicas empaquetadas de intermedios de AAVhu68 de genoma deficiente implica someter una suspensión que comprende partículas víricas de AAVhu68 recombinantes e intermedios de cápside AAVhu689 a cromatografía de líquidos de rendimiento rápido, en donde las partículas víricas de AAVhu68 y los intermedios de AAVhu68 se unen a una resina de intercambio aniónico fuerte equilibrada a un pH de 10,2 y se someten a un gradiente salino mientras se controla la absorbancia en el ultravioleta del eluido a aproximadamente 260 y aproximadamente 280. Aunque es menos óptimo para rAAV9hu68, el pH puede estar en el intervalo de aproximadamente 10,0 a 10,4. En este método, las cápsides completas de AAVhu68 se recogen de una fracción que se eluye cuando la relación de A260/A280 alcanza un punto de inflexión. En un ejemplo, para la etapa de Cromatografía de afinidad, el producto diafiltrado se puede aplicar a una resina de afinidad Capture Select™ Poros- AAV2/9 (Life Technologies) que captura eficientemente el serotipo AAV2/hu68. En estas condiciones iónicas, un porcentaje significativo de ADN celular residual y proteínas fluyen a través de la columna, mientras que las partículas de AAV se capturan de eficientemente.

### III. Composiciones y usos

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden una población mixta de virus adenoasociado recombinante hu68 (rAAVhu68), en donde cada uno de los rAAVhu68 se selecciona independientemente de un rAAV como se define en el presente documento y un portador, excipiente y/o conservante opcional. Una reserva de rAAV se refiere a una pluralidad de vectores de rAAV que son iguales, por ejemplo, tal como en las cantidades que se describen a continuación en el análisis de concentraciones y unidades de dosificación.

- Como se usa en el presente documento, "portador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes de retraso de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. En la
- 5 técnica se conoce bien el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas. Además, en las composiciones pueden incorporarse principios activos complementarios. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones alérgicas o reacciones adversas similares cuando se administran a un hospedador. Pueden usarse vehículos de suministro tales como liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la
- 10 introducción de las composiciones de la presente invención en células hospedadoras adecuadas. En particular, los genomas de vector administrados por el vector de rAAV se pueden formular para el suministro tanto encapsulados en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similares.
- Una composición puede incluir una formulación final adecuada para su suministro a un sujeto, por ejemplo, es una suspensión líquida acuosa tamponada a un pH y una concentración de sal fisiológicamente compatibles. Opcionalmente, hay presentes uno o más tensioactivos en la formulación. La composición puede transportarse en forma de un concentrado que se diluye para su administración a un sujeto. La composición puede liofilizarse y reconstituirse en el momento de la administración.
- 20 Un tensioactivo adecuado, o una combinación de tensioactivos, se puede seleccionar de tensioactivos no iónicos que no sean tóxicos. Se puede seleccionar un tensioactivo de copolímero de bloques difuncional que termine en grupos hidroxilo primarios, por ejemplo, tal como Pluronic® F68 [BASF], también conocido como Poloxámero 188, que tiene un pH neutro, tiene un peso molecular promedio de 8400. Se pueden seleccionar otros tensioactivos y otros poloxámeros, es decir, copolímeros tribloque no iónicos compuestos por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (polí(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (polí(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (hidroxiestearato de Macrogol-15), LABRASOL (glicérido polioxi caprílico), polioxil-10-oleiléter, TWEEN (ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitano), etanol y polietilenglicol. La formulación puede contener un poloxámero. Estos copolímeros se nombran comúnmente con la letra "P" (de poloxámero) seguida de tres dígitos: los primeros dos dígitos × 100 proporcionan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno y el último dígito × 10 proporciona el porcentaje de contenido de polioxietileno. En una realización, se selecciona Poloxámero 188. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente el 0,0005 % a aproximadamente el 0,001 % de la suspensión.
- 35 Los vectores se administran en cantidades suficientes para transfectar las células y proporcionar niveles suficientes de transferencia y expresión génica para proporcionar un beneficio terapéutico sin efectos adversos indebidos, o con efectos fisiológicos médica mente aceptables, que se pueden determinar por los expertos en las materias médicas. Las vías de administración convencional y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, el suministro directo a un órgano deseado (por ejemplo, el hígado (opcionalmente a través de la arteria hepática), pulmón, corazón, ojo, riñón), la vía oral, por inhalación, intranasal, intratecal, intratraqueal, intraarterial, intraocular, 40 intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica y otras vías parenterales de administración. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea.
- 45 Las dosificaciones del vector vírico dependerán principalmente de factores tales como la afección a tratar, la edad, el peso y la salud del paciente y, por lo tanto, pueden variar entre los pacientes. Por ejemplo, una dosificación de un ser humano terapéuticamente eficaz del vector vírico está generalmente en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 1000 microlitros a aproximadamente 100 ml de solución que contiene concentraciones de aproximadamente  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{16}$  genomas de vector vírico. La dosificación se ajustará para equilibrar el beneficio terapéutico frente a cualquier efecto secundario y dichas dosificaciones pueden variar dependiendo de la aplicación terapéutica para la que se emplea el vector recombinante. Los niveles de expresión del producto transgénico se
- 50 pueden controlar para determinar la frecuencia de dosificación que da como resultado vectores víricos, preferentemente vectores de AAV que contienen el minigén. Opcionalmente, pueden utilizarse pautas de dosificación similares a las descritas con fines terapéuticos para la inmunización usando las composiciones de la invención.
- 55 Las composiciones de virus de replicación defectuosa se pueden formular en unidades de dosificación para contener una cantidad de virus de replicación defectuosa que se encuentre en el intervalo de aproximadamente  $1,0 \times 10^9$  CG a aproximadamente  $1,0 \times 10^{16}$  CG (para tratar a un sujeto medio de 70 kg de peso corporal) incluyendo todos los números enteros o cantidades fraccionarias dentro del intervalo y, preferentemente, de  $1,0 \times 10^{12}$  CG a  $1,0 \times 10^{14}$  CG para un paciente humano. Las composiciones pueden formularse para contener al menos  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ , o  $9 \times 10^9$  CG por dosis, incluyendo todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo. Las composiciones pueden formularse para contener al menos  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ , o  $9 \times 10^{10}$  CG por dosis, incluyendo todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo.
- 60 65 Las composiciones pueden formularse para contener al menos  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ , o  $9 \times 10^{11}$  CG por dosis, incluyendo todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo.

Las composiciones pueden formularse para contener al menos  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ , o  $9 \times 10^{12}$  CG por dosis, incluyendo todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo.

- 5 Las composiciones pueden formularse para contener al menos  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  
 7 $\times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ , o  $9 \times 10^{13}$  CG por dosis, incluyendo todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo.  
 Las composiciones pueden formularse para contener al menos  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  
 7 $\times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ , o  $9 \times 10^{14}$  CG por dosis, incluyendo todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo.  
 Las composiciones pueden formularse para contener al menos  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  
 7 $\times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$ , o  $9 \times 10^{15}$  CG por dosis, incluyendo todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo.
- 10 Para la aplicación en seres humanos, la dosis puede variar de  $1 \times 10^{10}$  a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  CG por dosis,  
 incluyendo todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo.

Estas dosis anteriores pueden administrarse en una diversidad de volúmenes de formulación de portador,  
 excipiente o tampón, que varían de aproximadamente 25 a aproximadamente 1000 microlitros, o volúmenes  
 superiores, incluyendo todos los números dentro del intervalo, dependiendo del tamaño del área a tratar, el título  
 vírico utilizado, la vía de administración y el efecto deseado del método.

15 El volumen del portador, excipiente o tampón puede ser de al menos aproximadamente 25 µl. El volumen puede  
 ser de aproximadamente 50 µl. El volumen puede ser de aproximadamente 75 µl. El volumen puede ser de  
 20 aproximadamente 100 µl. El volumen puede ser de aproximadamente 125 µl. El volumen puede ser de  
 aproximadamente 150 µl.

25 El volumen puede ser de aproximadamente 175 µl. El volumen puede ser de aproximadamente 200 µl. El volumen  
 puede ser de aproximadamente 225 µl. El volumen puede ser de aproximadamente 250 µl. El volumen puede ser  
 de aproximadamente 275 µl.

30 El volumen puede ser de aproximadamente 300 µl. El volumen puede ser de aproximadamente 325 µl. El volumen  
 puede ser de aproximadamente 350 µl.

35 El volumen puede ser de aproximadamente 375 µl. El volumen puede ser de aproximadamente 400 µl.  
 El volumen puede ser de aproximadamente 450 µl. El volumen puede ser de aproximadamente 500 µl. El volumen  
 puede ser de aproximadamente 550 µl.

40 El volumen puede ser de aproximadamente 600 µl. El volumen puede ser de aproximadamente 650 µl.  
 El volumen puede ser de aproximadamente 700 µl. El volumen puede ser de entre aproximadamente 700 y 1000 µl.

45 La dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^9$  CG/g de masa de cerebro a aproximadamente  
 1 $\times 10^{12}$  CG/g de masa de cerebro. La dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente  $3 \times 10^{10}$  CG/g de masa  
 de cerebro a aproximadamente  $3 \times 10^{11}$  CG/g de masa de cerebro.

50 La dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  CG/g de masa de cerebro a aproximadamente  
 1,85 $\times 10^{11}$  CG/g de masa de cerebro.

55 Las construcciones víricas se pueden suministrar en dosis de al menos aproximadamente  $1 \times 10^9$  CG a  
 aproximadamente  $1 \times 10^{15}$ , o de aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  a  $5 \times 10^{13}$  CG. Un experto en la materia puede  
 determinar los volúmenes adecuados para el suministro de estas dosis y concentraciones. Por ejemplo, se pueden  
 seleccionar volúmenes de aproximadamente 1 µl a 150 ml, seleccionándose los volúmenes más altos para adultos.  
 Normalmente, para recién nacidos un volumen adecuado es de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente  
 10 ml, para bebés mayores, se pueden seleccionar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 15 ml. Para  
 niños pequeños, se puede seleccionar un volumen de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 20 ml. Para  
 niños, se pueden seleccionar volúmenes de hasta aproximadamente 30 ml. Para preadolescentes y adolescentes,  
 se pueden seleccionar volúmenes de hasta aproximadamente 50 ml. En otras realizaciones más, un paciente  
 puede recibir una administración intratecal en un volumen seleccionado de aproximadamente 5 ml a  
 aproximadamente 15 ml, o de aproximadamente 7,5 ml a aproximadamente 10 ml. Se pueden determinar otros  
 volúmenes y dosificaciones adecuados. La dosificación se ajustará para equilibrar el beneficio terapéutico frente a  
 cualquier efecto secundario y dichas dosificaciones pueden variar dependiendo de la aplicación terapéutica para  
 la que se emplea el vector recombinante.

60 Los vectores recombinantes descritos anteriormente pueden administrarse a células hospedadoras de acuerdo  
 con métodos publicados. Los rAAV, preferentemente suspendidos en un portador fisiológicamente compatible,  
 pueden administrarse a un paciente mamífero humano o no humano.

65 Para la administración a un paciente humano, el rAAV se suspende adecuadamente en una solución acuosa que  
 contiene solución salina, un tensioactivo y una sal o mezcla de sales fisiológicamente compatibles. De manera

adeuada, la formulación se ajusta a un pH fisiológicamente aceptable, por ejemplo, en el intervalo de pH de 6 a 9, o pH de 6,5 a 7,5, pH de 7,0 a 7,7 o pH de 7,2 a 7,8. Como el pH del líquido cefalorraquídeo es de aproximadamente 7,28 a aproximadamente 7,32, para el suministro intratecal, puede desearse un pH dentro de este intervalo; mientras que para el suministro intravenoso, puede desearse un pH de aproximadamente 6,8 a 5 aproximadamente 7,2. Sin embargo, pueden seleccionarse otros pH dentro de los intervalos más amplios y estos subintervalos para otra vía de suministro

La composición puede incluir un portador, diluyente, excipiente y/o adyuvante. Un experto en la materia puede 10 seleccionar fácilmente transportadores adecuados a la vista de la indicación a la que se dirige el virus de transferencia. Por ejemplo, un portador adecuado incluye solución salina, que se puede formular con una diversidad de soluciones tamponantes (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Otros portadores de 15 ejemplo incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y agua. El tampón/portador debe incluir un componente que evite que el rAAV, se pegue al tubo de infusión, pero que no interfiera con la actividad de unión de rAAV *in vivo*. Un tensioactivo 20 adecuado, o una combinación de tensioactivos, se puede seleccionar de tensioactivos no iónicos que no sean tóxicos. Se puede seleccionar un tensioactivo de copolímero de bloques difuncional que termine en grupos hidroxilo primarios, por ejemplo, tal como Pluronic® F68 [BASF], también conocido como Poloxámero 188, que tiene un pH neutro, tiene un peso molecular promedio de 8400. Se pueden seleccionar otros tensioactivos y otros poloxámeros, es decir, copolímeros tribloque no iónicos compuestos por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno 25 (poli(óxido de propileno)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (hidroxiestearato de Macrogol-15), LABRASOL (glicérido polioxi caprílico), polioxil oleil éter, TWEEN (ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitano), etanol y polietilenglicol. La formulación puede contener un poloxámero. Estos copolímeros se nombran comúnmente con la letra "P" (de poloxámero) seguida de tres dígitos: 30 los primeros dos dígitos × 100 proporcionan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno y el último dígito × 10 proporciona el porcentaje de contenido de polioxietileno. En una realización, se selecciona Poloxámero 188. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente el 0,0005 % a 35 aproximadamente el 0,001 % de la suspensión. En un ejemplo, la formulación puede contener, por ejemplo, solución salina tamponada que comprende uno o más de cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, dextrosa, sulfato de magnesio (por ejemplo, sulfato de magnesio ·7H<sub>2</sub>O), cloruro de potasio, cloruro de calcio (por ejemplo, cloruro de calcio ·2H<sub>2</sub>O), fosfato dibásico de sodio y mezclas de los mismos, en agua. De manera adecuada, para el 40 suministro intratecal, la osmolaridad está dentro de un intervalo compatible con el líquido cefalorraquídeo (por ejemplo, de aproximadamente 275 a aproximadamente 290); véase, por ejemplo, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview. Opcionalmente, para el suministro intratecal, se puede usar un diluyente disponible en el mercado como agente de suspensión, o en combinación con otro agente de suspensión y otros excipientes opcionales. Véase, por ejemplo, solución Elliotts B® [Lukare Medical]. La formulación 45 puede contener uno o más potenciadores de la permeación. Los ejemplos de potenciadores de la permeación adecuados pueden incluir, por ejemplo, manitol, glicocolato de sodio, taurocolato de sodio, desoxicolato de sodio, salicilato de sodio, caprilato de sodio, caprato de sodio, laurilsulfato de sodio, polioxietileno-9-lauril éter o EDTA.

Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además del rAAV y el portador o portadores, otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes o estabilizantes químicos. Los conservantes de ejemplo adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, parabenos, etil-vainillina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Los estabilizantes químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se ha definido anteriormente. De manera adecuada, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una cantidad eficaz de uno o más AAV suspendidos en un portador farmacéuticamente adecuado y/o mezclados con excipientes adecuados diseñados para su suministro al sujeto a través de inyección, bomba osmótica, catéter intratecal, o para su suministro mediante otro dispositivo o vía. En un ejemplo, la composición se formula para su suministro intratecal.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "suministro intratecal" o "administración intratecal" se 55 refieren a una vía de administración de fármacos a través de una inyección en el canal espinal, más concretamente en el espacio subaracnoidal para que llegue al líquido cefalorraquídeo (LCR). El suministro intratecal puede incluir punción lumbar, punción intraventricular (incluyendo intracerebroventricular (ICV)), suboccipital/intracisternal y/o C1-2. Por ejemplo, se puede introducir material para su difusión por todo el espacio subaracnoidal por medio de punción lumbar. En otro ejemplo, la inyección puede ser en la cisterna magna.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "suministro intracisternal" o "administración intracisternal" se 60 refieren a una vía de administración de fármacos directamente en el líquido cefalorraquídeo de la cisterna magna cerebelomedular, más específicamente a través de una punción suboccipital o mediante inyección directa en la cisterna magna o a través de un tubo colocado permanentemente.

## IV. Aparato y método para el suministro de una composición farmacéutica al líquido cefalorraquídeo

Los vectores proporcionados en el presente documento se pueden administrar por vía intratecal a través del método y/o el dispositivo proporcionado en esta sección y descrito con más detalle en la FIG 7. Como alternativa, se pueden seleccionar otros dispositivos y métodos.

- 5 El método comprende las etapas de hacer avanzar una aguja espinal dentro de la cisterna magna de un paciente, conectar un tramo de tubo flexible a un conector proximal de la aguja espinal y un puerto de salida de una válvula a un extremo proximal del tubo flexible, y después de dichas etapas de avance y conexión y después de permitir que el tubo se autocebe con el líquido cefalorraquídeo del paciente, conectar un primer recipiente que contiene una cantidad de solución isotónica a un puerto de entrada de descarga de la válvula y posteriormente conectar un segundo recipiente que contiene una cantidad de una composición farmacéutica a un puerto de entrada de vector de la válvula. Después de conectar el primer y el segundo recipiente a la válvula, se abre un camino para el flujo de fluido entre el puerto de entrada de vector y el puerto de salida de la válvula y la composición farmacéutica se inyecta en el paciente a través de la aguja espinal, y después de inyectar la composición farmacéutica, se abre un camino para el flujo de fluido a través del puerto de entrada de descarga y el puerto de salida de la válvula y la solución isotónica se inyecta en la aguja espinal para lavar la composición farmacéutica en el paciente.
- 10
- 15

En el presente documento se describe, pero no se reivindica, un dispositivo para el suministro intracisternal de una composición farmacéutica. El dispositivo incluye un primer recipiente que contiene una cantidad de una composición farmacéutica, un segundo recipiente que contiene una solución isotónica y una aguja espinal a través de la cual se puede expulsar la composición farmacéutica desde el dispositivo directamente al líquido cefalorraquídeo dentro de la cisterna magna de un paciente. El dispositivo incluye además una válvula que tiene un primer puerto de entrada interconectado al primer recipiente, un segundo puerto de entrada interconectado al segundo recipiente, un puerto de salida interconectado a la aguja espinal y un cierre luer para controlar el flujo de la composición farmacéutica y la solución isotónica a través de la aguja espinal.

20

25

Como se usa en el presente documento, la expresión tomografía computarizada (TC) se refiere a la radiografía en la que un ordenador construye una imagen tridimensional de una estructura corporal a partir de una serie de imágenes transversales planas realizadas a lo largo de un eje.

30 El aparato o dispositivo médico 10 como se muestra en la FIG 7 incluye uno o más recipientes, 12 y 14, interconectados a través de una válvula 16. Los recipientes, 12 y 14, proporcionan una fuente nueva de una composición farmacéutica, fármaco, vector o sustancia similar y una fuente nueva de una solución isotónica tal como solución salina, respectivamente. Los recipientes, 12 y 14, pueden ser cualquier forma de dispositivo médico que permita la inyección de fluidos en un paciente.

35

A modo de ejemplo, cada recipiente, 12 y 14, puede proporcionarse en forma de una jeringa, cánula o similar. Por ejemplo, en el aparato o dispositivo médico ilustrado, el recipiente 12 se proporciona como una jeringa separada que contiene una cantidad de una composición farmacéutica y se denomina en el presente documento "jeringa de vector". Meramente con fines de ejemplo, el recipiente 12 puede contener aproximadamente 10 cm<sup>3</sup> de una composición farmacéutica o similar.

40

Análogamente, el recipiente 14 se puede proporcionar en forma de una jeringa separada, cánula o similar que contiene una cantidad de solución salina y puede denominarse "jeringa de descarga". Meramente con fines de ejemplo, el recipiente 14 puede contener aproximadamente 10 cm<sup>3</sup> de una solución salina.

45

Como alternativa, los recipientes 12 y 14 se pueden proporcionar en formas distintas de las jeringas y se pueden integrar en un único dispositivo, tal como un dispositivo de inyección médica integrado que tiene un par de cámaras separadas, una para la composición farmacéutica y otra para la solución salina. Además, el tamaño de las cámaras o recipientes puede proporcionarse según sea necesario para contener una cantidad deseada de fluido.

50

En el aparato o dispositivo médico ilustrado, la válvula 16 se proporciona en forma de una llave de paso de 4 vías que tiene un cierre 18 luer macho giratorio. La válvula 16 interconecta los recipientes 12 y 14 (es decir, la jeringa de vector y la jeringa de descarga en el aparato o dispositivo médico ilustrado), y el cierre luer macho giratorio permite cerrar o abrir un camino a través de la válvula 16 que se ha de cerrar o abrir para cada uno de los recipientes 12 y 14. De esta manera, el camino a través de la válvula 16 puede estar cerrado tanto para la jeringa de vector como para la jeringa de descarga o puede estar abierto para una seleccionada de entre la jeringa de vector y la jeringa de descarga. Como alternativa a una llave de paso de 4 vías, la válvula puede ser una llave de paso de 3 vías o un dispositivo de control de fluido.

55

60 En el aparato o dispositivo médico ilustrado, la válvula 16 está conectada a un extremo de una longitud de tubo de extensión 20 o conducto similar para fluido. El tubo 20 se puede seleccionar basándose en una longitud o volumen interno deseados. Meramente a modo de ejemplo, el tubo puede tener aproximadamente de 15,24 cm a 17,78 cm (de 6 a 7 pulgadas) de longitud.

65 En el aparato o dispositivo médico ilustrado, un extremo opuesto 22 del tubo 12 está conectado a un conjunto 24 de extensión de conector en T que, a su vez, está conectado a una aguja espinal 26. A modo de ejemplo, la aguja

26 puede ser una aguja espinal de 12,7 cm (cinco pulgadas) de calibre 22 o 25. Además, como opción, la aguja espinal 26 puede estar conectada a una aguja introductora 28, tal como una aguja introductora de 8,89 cm (tres pulgadas y media), calibre 18.

- 5 Durante el uso, la aguja espinal 26 y/o la aguja introductora 28 opcional pueden avanzar en el interior de un paciente hacia la cisterna magna. Después del avance de la aguja, se pueden obtener imágenes de tomografía computarizada (TC) que permiten la visualización de la aguja 26 y/o 28 y los tejidos blandos pertinentes (por ejemplo, músculos paraespinales, hueso, tronco encefálico y médula espinal). La colocación correcta de la aguja se confirma mediante la observación del líquido cefalorraquídeo (LCR) en el centro de la aguja y la visualización de la punta de la aguja dentro de la cisterna magna. Después de eso, el tubo de extensión 20 relativamente corto se puede unir a la aguja espinal 26 insertada, y la llave de paso 16 de 4 vías se puede unir después al extremo opuesto del tubo 20.

- 10 15 Se permite que el conjunto anterior se "autocebe" con el LCR del paciente. Después de eso, la jeringa de descarga con solución salina normal precargada 14 se une a un puerto de entrada de descarga de la llave de paso 16 de 4 vías y después la jeringa 12 de vector que contiene una composición farmacéutica se une a un puerto de entrada de vector de la llave de paso 16 de 4 vías. Después de eso, el puerto de salida de la llave de paso 16 se abre a la jeringa 12 de vector, y el contenido de la jeringa de vector puede inyectarse lentamente a través de la válvula 16 y el aparato ensamblado y en el paciente durante un período de tiempo. Meramente con fines de ejemplo, este período de tiempo puede ser de aproximadamente 1-2 minutos y/o cualquier otro tiempo que deseé.

- 20 25 30 Después de inyectar el contenido de la jeringa 12 de vector, el cierre giratorio 18 de la llave de paso 16 se gira a una segunda posición de manera que la llave de paso 16 y el conjunto de aguja puedan lavarse con una cantidad deseada de solución salina normal usando la jeringa 14 de descarga precargada adjunta. Meramente a modo de ejemplo, se pueden usar de 1 a 2 cm<sup>3</sup> de solución salina normal; aunque se pueden usar cantidades mayores o menores según sea necesario. La solución salina normal garantiza que toda o la mayor parte de la composición farmacéutica se fuerce a inyectarse a través del dispositivo ensamblado y en el paciente y de modo que poco o nada de la composición farmacéutica permanezca en el dispositivo ensamblado.

- 35 40 45 50 55 60 Después de lavar el dispositivo ensamblado con la solución salina, el dispositivo ensamblado en su totalidad, incluyendo la aguja o agujas, el tubo de extensión, la llave de paso y las jeringas se retiran lentamente del sujeto y se colocan en una bandeja quirúrgica para desecharlas en un recipiente para desechos con riesgo biológico o en un recipiente duro (para la aguja o agujas).

- 30 35 40 45 50 55 60 Un investigador principal puede realizar un proceso de selección que, en última instancia, puede conducir a un procedimiento intracisternal (IC). El investigador principal puede describir el proceso, procedimiento, el procedimiento de administración en sí y todos los riesgos potenciales de seguridad con el fin de que el sujeto (o el cuidador designado) esté totalmente informado. Se obtienen o realizan la historia clínica, la medicación simultánea, la exploración física, las constantes vitales, el electrocardiograma (ECG) y los resultados de los ensayos de laboratorio y se proporcionan al neurorradiólogo, neurocirujano y anestesiólogo para su uso en la evaluación de cribado de la elegibilidad del sujeto para el procedimiento IC.

- Para dar tiempo suficiente para revisar la elegibilidad, se pueden realizar los siguientes procedimientos en cualquier momento entre la primera visita de cribado y hasta una semana antes de una visita de estudio. Por ejemplo, el "Día 0", se pueden obtener imágenes de resonancia magnética (IRM) de cabeza y cuello con y sin gadolinio (es decir, eGFR > 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>). Además de IRM de cabeza/cuello, el investigador puede determinar la necesidad de realizar una evaluación adicional del cuello a través de estudios de flexión/extensión. El protocolo de IRM puede incluir imágenes de protocolo de T1, T2, DTI, FLAIR y CINE.

- 50 55 60 Además, se puede obtener ARM/MRV de cabeza/cuello según el protocolo institucional (es decir, los sujetos con antecedentes de operaciones intra/transdurales se pueden excluir o pueden necesitar ensayos adicionales (por ejemplo, cisternografía con radionucleótidos)) que permitan una evaluación adecuada del flujo del LCR y la identificación del posible bloqueo o falta de comunicación entre los espacios del LCR.
- El neurorradiólogo, el neurocirujano y el anestesiólogo en última instancia analizan y determinan la elegibilidad de cada sujeto para los procedimientos IC basándose en toda la información disponible (exploraciones, historial médico, examen físico, analíticas, etc.). También se puede obtener una evaluación preoperatoria de anestesia del "Día -28" al "Día 1" que proporciona una evaluación detallada de las vías respiratorias, el intervalo de movimiento del cuello (acortado/engrosado) y de la cabeza (grado de flexión del cuello), teniendo en cuenta las necesidades fisiológicas especiales de un sujeto con MPS.

- 65 Antes de un procedimiento IC, la Sala de TC confirmará que los siguientes equipos y medicamentos estén presentes: Kit de punción lumbar (PL) para adultos (suministrado por institución); Aguja espinal BD (Becton Dickinson) de calibre 22 o 25 x 7,62 - 17,78 c, (3 - 7") (bisel Quincke); Aguja introductora coaxial, utilizada a discreción del intervencionista (para la introducción de la aguja espinal); Llave de paso de calibre pequeño de 4 vías con cierre luer macho giratorio (Rotativo); Juego de extensión de conector en T (tubo) con adaptador de cierre

- luer hembra, longitud aproximada de 17,02 cm (6,7 pulgadas); Omnipaque 180 (iohexol), para la administración intratecal; Contraste yodado para la administración intravenosa (IV); Solución inyectable de lidocaína al 1 % (si no se suministra en el kit de PL para adultos); Jeringa de descarga precargada con 10 cm<sup>3</sup> de solución salina normal (estéril); Uno o más marcadores radiopacos; Equipo de preparación quirúrgica/maquinilla de afeitar;
- 5 Almohadas/sopores para permitir el posicionamiento adecuado del sujeto intubado; Equipo de intubación endotraqueal, máquina de anestesia general y ventilador mecánico; Equipo de control neurofisiológico intraoperatorio (CNIO) (y personal necesario); y jeringa de 10 cm<sup>3</sup> que contiene vector; preparada y transportada a la sala de TC/quirófano (Q) de acuerdo con el Manual de farmacia independiente.
- 10 El Consentimiento Informado para el procedimiento se confirma y documenta dentro de la historia clínica y/o expediente del estudio. Se obtiene un consentimiento separado para el procedimiento del personal de radiología y anestesiología según los requisitos institucionales. El sujeto tiene un acceso intravenoso colocado dentro de la unidad de atención hospitalaria adecuada de acuerdo con las directrices institucionales (por ejemplo, dos sitios de acceso IV). Los líquidos intravenosos se administran a criterio del anestesiólogo. A criterio del anestesiólogo y según las directrices institucionales, el sujeto puede ser inducido y sometido a intubación endotraqueal con administración de anestesia general en una unidad de atención al paciente adecuada, área de espera o la sala de procedimientos quirúrgicos/TC.
- 15 Se realiza una punción lumbar, en primer lugar para extraer 5 cm<sup>3</sup> de líquido cefalorraquídeo (LCR) y posteriormente inyectar contraste (Omnipaque 180) por vía intratecal para ayudar a la visualización de la cisterna magna. Se pueden realizar maniobras adecuadas de posicionamiento del sujeto para facilitar la difusión del contraste hacia la cisterna magna.
- 20 Se fija al sujeto un equipo de control neurofisiológico intraoperatorio (CNIO). El sujeto se coloca sobre la mesa del escáner de TC en decúbito prono o lateral. Debe haber personal adecuado presente para garantizar la seguridad del sujeto durante el transporte y posicionamiento. Si se considera adecuado, el sujeto puede colocarse de una manera que proporcione flexión del cuello hasta el grado que se determine que es seguro durante la evaluación preoperatoria y con señales normales del monitor neurofisiológico documentadas después del posicionamiento.
- 25 Se puede confirmar que el siguiente personal esté presente e identificado en el sitio: Intervencionista/neurocirujano que realiza el procedimiento; Anestesiólogo y uno o más técnicos respiratorios; Enfermeras y asistentes médicos; Técnicos de TC (o quirófano); Técnico en Neurofisiología; y Coordinador de Sala. Se puede completar un "tiempo muerto" según el protocolo de la Comisión Conjunta/hospital para verificar el sujeto, procedimiento, sitio, posicionamiento correctos y la presencia de todo el equipo necesario en la sala. El investigador principal del sitio podrá después confirmar con el personal que puede proceder con la preparación del sujeto.
- 30 La piel del sujeto debajo de la base del cráneo se afeita según corresponda. Se realizan imágenes de exploración por TC, seguido de una TC de planificación previa al procedimiento con contraste IV, si el intervencionista lo considera necesario para ubicar la ubicación objetivo y obtener imágenes de la vasculatura. Una vez identificado el sitio objetivo (cisterna magna) y planificada la trayectoria de la aguja, la piel se prepara y se cubre usando una técnica estéril según las directrices institucionales. Se coloca un marcador radiopaco en la ubicación de la piel objetivo según lo indique el intervencionista. La piel debajo del marcador se anestesia a través de infiltración con lidocaína al 1 %. Después se hace avanzar una aguja espinal de 22G o 25G hacia la cisterna magna, con la opción de usar una aguja introductora coaxial.
- 35 40 Despues del avance de la aguja, se obtienen imágenes de TC usando el espesor de corte de TC más fino posible usando equipo institucional (idejalmente ≤ 2,5 mm). Se obtienen imágenes de TC en serie usando la dosis de radiación más baja posible que permita una visualización adecuada de la aguja y los tejidos blandos pertinentes (por ejemplo, músculos paraespinales, hueso, tronco encefálico y médula espinal). La colocación correcta de la aguja se confirma mediante la observación del LCR en el centro de la aguja y la visualización de la punta de la aguja dentro de la cisterna magna.
- 45 50 55 El intervencionista confirma que la jeringa de vector está colocada cerca de, pero fuera del campo estéril. Antes de manipular o administrar la composición farmacéutica en la jeringa de vector, el personal que asiste al procedimiento dentro del campo estéril se pone guantes, mascarilla y protección ocular.
- 60 65 El tubo de extensión se conecta a la aguja espinal insertada, que después se conecta a la llave de paso de 4 vías. Una vez que este aparato se "autoceba" con el LCR del sujeto, la jeringa de descarga con solución salina normal precargada de 10 cm<sup>3</sup> se conecta a un puerto de entrada de descarga de la llave de paso de 4 vías. Después se proporciona la jeringa de vector al intervencionista y se conecta a un puerto de entrada de vector en la llave de paso de 4 vías.
- Después de abrir el puerto de salida de la llave de paso a la jeringa de vector colocando el cierre giratorio de la llave de paso en una primera posición, el contenido de la jeringa de vector se inyecta lentamente (durante aproximadamente 1-2 minutos), teniendo cuidado de no aplicar fuerza excesiva sobre el émbolo de la jeringa durante la inyección. Después de inyectar el contenido de la jeringa de vector, el cierre giratorio de la llave de paso

se gira a una segunda posición para que el conjunto de la llave de paso y la aguja se pueda lavar con 1-2 cm<sup>3</sup> de solución salina normal usando la jeringa de descarga precargada adjunta.

- 5 Cuando esté listo, el intervencionista después alerta al personal de que quitará el aparato del sujeto. En un solo movimiento, la aguja, el tubo de extensión, la llave de paso y las jeringas se retiran lentamente del sujeto y se colocan en una bandeja quirúrgica para desecharlas en un recipiente para desechos con riesgo biológico o en un recipiente duro (para la aguja).
- 10 El sitio de inserción de la aguja se examina en busca de signos de sangrado o fuga de LCR y se trata según lo indicado por el investigador. El sitio se cubre usando gasa, esparadrapo quirúrgico y/o apósito Tegaderm, según se indica. Después, al sujeto se retira del escáner de TC y se coloca en decúbito supino sobre una camilla. Hay personal adecuado presente para garantizar la seguridad del sujeto durante el transporte y posicionamiento.
- 15 Se suspende la anestesia y se cuida al sujeto siguiendo las directrices institucionales para el cuidado postanestésico. Los monitores neurofisiológicos se retiran del sujeto. La cabeza de la camilla sobre la que se encuentra el sujeto debe elevarse ligeramente (~30 grados) durante la recuperación. El sujeto es transportado a una unidad de cuidados postanestésicos adecuada según las directrices institucionales. Después de que el sujeto haya recuperado adecuadamente la conciencia y esté en una condición estable, será admitido en la planta/unidad correspondiente para las evaluaciones exigidas por el protocolo. Se seguirán evaluaciones neurológicas según el protocolo y el Investigador Principal supervisa la atención del sujeto en colaboración con el hospital y el personal de investigación. Un método para el suministro de una composición descrita pero no reivindicada en el presente documento puede comprender las etapas de: hacer avanzar una aguja espinal dentro de la cisterna magna de un paciente; conectar un tramo de tubo flexible a un conector proximal de la aguja espinal y un puerto de salida de una válvula a un extremo proximal del tubo flexible; después de dichas etapas de avance y conexión y después de permitir que el tubo se autocebe con el líquido cefalorraquídeo del paciente, conectar un primer recipiente que contiene una cantidad de solución isotónica a un puerto de entrada de descarga de la válvula y posteriormente conectar un segundo recipiente que contiene una cantidad de una composición farmacéutica a un puerto de entrada de vector de la válvula; después de conectar dichos primer y segundo recipientes a la válvula, abrir un camino para el flujo de fluido entre el puerto de entrada de vector y el puerto de salida de la válvula e inyectar la composición farmacéutica en el paciente a través de la aguja espinal; y después de inyectar la composición farmacéutica, abrir un camino para el flujo de fluido a través del puerto de entrada de descarga y el puerto de salida de la válvula e inyectar la solución isotónica en la aguja espinal para lavar la composición farmacéutica en el paciente.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El método puede comprender además confirmar la colocación adecuada de una punta distal de la aguja espinal dentro de la cisterna magna antes de conectar el tubo y la válvula al conector de la aguja espinal. La etapa de confirmación puede incluir visualizar la punta distal de la aguja espinal dentro de la cisterna magna con formación de imágenes de tomografía computarizada (TC). La etapa de confirmación puede incluir observar la presencia del líquido cefalorraquídeo del paciente en el centro de la aguja espinal.
- En los métodos descritos anteriormente, la válvula puede ser una llave de paso con un cierre luer giratorio adaptado para girar a una primera posición que permite el flujo desde el puerto de entrada de vector al puerto de salida mientras que simultáneamente bloquea el flujo a través del puerto de entrada de descarga y a una segunda posición que permite el flujo desde el puerto de entrada de descarga al puerto de salida mientras se bloquea simultáneamente el flujo a través del puerto de entrada de vector, y en donde el cierre luer giratorio se coloca en dicha primera posición cuando dicha composición farmacéutica se inyecta al paciente y se coloca en dicha segunda posición cuando dicha composición farmacéutica se descarga en dicho paciente mediante la solución isotónica. Después de inyectar la solución isotónica en la aguja espinal para descargar la composición farmacéutica dentro del paciente, la aguja espinal puede retirarse del paciente con el tubo, la válvula y el primer y el segundo recipiente conectados a la misma como un conjunto. La válvula puede ser una llave de paso de 4 vías con un cierre luer macho giratorio. El primer y segundo recipiente pueden ser jeringas separadas. Se puede ubicar un conector en T en el centro de la aguja espinal e interconecta el tubo a la aguja espinal. Opcionalmente, la aguja espinal puede incluir una aguja introductora en el extremo distal de la aguja espinal. La aguja espinal puede ser una aguja espinal de 12,7 cm (cinco pulgadas), de calibre 22 o 24. La aguja introductora puede ser una aguja introductora de 8,89 cm (3,5 pulgadas) de calibre 18.
- El método puede utilizar un dispositivo que se compone de, como mínimo, un primer recipiente para contener una cantidad de una composición farmacéutica; un segundo recipiente para contener una solución isotónica; una aguja espinal a través de la cual se puede expulsar la composición farmacéutica desde el dispositivo directamente al líquido cefalorraquídeo dentro de la cisterna magna de un paciente; y una válvula que tiene un primer puerto de entrada interconectado al primer recipiente, un segundo puerto de entrada interconectado al segundo recipiente, un puerto de salida interconectado a la aguja espinal y un cierre luer para controlar el flujo de la composición farmacéutica y la solución isotónica a través de la aguja espinal. La válvula puede ser una llave de paso con un cierre luer giratorio adaptado para girar a una primera posición que permite el flujo desde el primer puerto de entrada al puerto de salida mientras que simultáneamente bloquea el flujo a través del segundo puerto de entrada y a una segunda posición que permite el flujo desde el segundo puerto de entrada al puerto de salida mientras se

- bloquea simultáneamente el flujo a través del primer puerto de entrada. Opcionalmente, la válvula es una llave de paso de 4 vías con un cierre luer macho giratorio. El primer y el segundo recipiente pueden ser jeringas separadas. La aguja espinal puede estar interconectada a la válvula a través de un tramo de tubo flexible. Un conector en T puede interconectar el tubo a la aguja espinal. En determinadas realizaciones, la aguja espinal es una aguja espinal de 12,7 cm (cinco pulgadas) de calibre 22 o 24. El dispositivo puede comprender además una aguja introductora conectada a un extremo distal de la aguja espinal. Opcionalmente, la aguja introductora es una aguja introductora de 8,89 cm (3,5 pulgadas) de calibre 18.
- Este método y este dispositivo pueden usarse cada uno opcionalmente para el suministro intratecal de las 10 composiciones proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, se pueden usar otros métodos y dispositivos para dicho suministro intratecal.
- Una composición puede comprender el anticuerpo rAAVhu68.anti-HER2 de modo que los vectores de AAV porten 15 los casetes de expresión de ácido nucleico que codifican las construcciones de inmunoglobulina y las secuencias reguladoras que dirigen la expresión de su inmunoglobulina en la célula seleccionada. Después de la administración de los vectores en el SNC, los vectores suministran los casetes de expresión al SNC y expresan las construcciones de inmunoglobulinas proteínicas *in vivo*. Se describe el uso de las composiciones descritas en el presente documento en un método antineoplásico, al igual que los usos de estas composiciones en pautas 20 antineoplásicas, que opcionalmente pueden implicar el suministro de uno o más agentes antineoplásicos u otros agentes activos.
- Una composición puede contener un único tipo de vector AAVhu68 como se describe en el presente documento que contiene el casete de expresión para suministrar la construcción de inmunoglobulina antineoplásica *in vivo*. Como alternativa, una composición puede contener dos o más vectores de AAV diferentes, cada uno de los cuales 25 tiene empaquetados en su interior casetes de expresión diferentes. Por ejemplo, los dos o más AAV diferentes pueden tener casetes de expresión diferentes que expresan polipéptidos de inmunoglobulina que se ensamblan *in vivo* para formar una única construcción de inmunoglobulina funcional. En otro ejemplo, los dos o más AAV pueden tener casetes de expresión diferentes que expresan polipéptidos de inmunoglobulina para diferentes dianas, por ejemplo, dos proporcionan dos construcciones de inmunoglobulina funcionales (por ejemplo, una construcción de 30 inmunoglobulina anti-Her2 y una segunda construcción de inmunoglobulina antineoplásica). En otra alternativa más, los dos o más AAV diferentes pueden expresar construcciones de inmunoglobulina dirigidas a la misma diana, en donde una de las construcciones de inmunoglobulina se ha modificado para eliminar la unión de FcRn y una segunda construcción de inmunoglobulina conserva su capacidad o tiene una capacidad potenciada para unirse a FcRn. Una composición de este tipo puede ser útil para proporcionar simultáneamente anticuerpos con mayor 35 retención en el área del cerebro y anticuerpos para el suministro sistémico de la construcción de inmunoglobulina.
- Opcionalmente, una o ambas de estas construcciones de inmunoglobulina descritas en el presente documento tienen actividad ADCC potenciada. Una pauta como se describe en el presente documento puede comprender, además de una o más de las combinaciones descritas en el presente documento, una combinación adicional con 40 uno o más de un fármaco biológico antineoplásico, un fármaco antineoplásico de molécula pequeña, un agente quimioterápico, potenciadores inmunitarios, radiación, cirugía y similares. Un fármaco biológico como se describe en el presente documento, se basa en un péptido, polipéptido, proteína, enzima, molécula de ácido nucleico, vector (incluyendo vectores víricos) o similares.
- De manera adecuada, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una cantidad eficaz 45 antineoplásica de uno o más AAVhu68 suspendidos en un portador farmacéuticamente adecuado diseñado para su suministro al sujeto a través de inyección, bomba osmótica, catéter intratecal, o para su suministro mediante otro dispositivo o vía. En un ejemplo, la composición se formula para su suministro intratecal. Como se usa en el presente documento, el suministro intratecal abarca una inyección en el canal espinal, más específicamente en el espacio subaracnoideo. Sin embargo, se pueden seleccionar otras vías de suministro y los portadores farmacéuticamente aceptables para las composiciones de AAV incluyen, por ejemplo, suministro de líquido 50 intracerebroespinal, intracraneal, intranasal, intracisternal, entre otras vías adecuadas, directas o sistémicas, es decir, el depósito de Ommaya.
- Las composiciones se pueden formular en unidades de dosificación para contener una cantidad de AAV que esté 55 en el intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^9$  copias de genoma (CG) a aproximadamente  $5 \times 10^{13}$  CG (para tratar un sujeto promedio de 70 kg de peso corporal). Se puede realizar una punción lumbar en la que se extraen de aproximadamente 15 ml (o menos) a aproximadamente 40 ml de LCR y en la que el vector se mezcla con el LCR y/o se suspende en un portador compatible y se suministra al sujeto. En un ejemplo, la concentración del vector 60 es de aproximadamente  $3 \times 10^{13}$  CG, pero también otras cantidades tales como aproximadamente  $1 \times 10^9$  CG, aproximadamente  $5 \times 10^9$  CG, aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  CG, aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  CG, aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CG, aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  CG, aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  CG, aproximadamente  $5 \times 10^{12}$  CG o aproximadamente  $1,0 \times 10^{13}$  CG.
- Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para retardar el crecimiento de un tumor. 65 Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para disminuir el tamaño tumoral en un

- sujeto. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para reducir el número de células cancerosas en un cáncer tumoral no sólido. Una composición como se proporciona en el presente documento puede ser útil para aumentar la supervivencia global y/o la supervivencia sin progresión en un paciente. Las construcciones de inmunoglobulina antineoplásicas se pueden seleccionar con vistas a la neoplasia que se va a tratar. Por ejemplo, para el tratamiento de un cáncer de mama metastásico en el cerebro, se puede modificar por ingeniería genética un casete de expresión para un anticuerpo anti-HER en un AAV recombinante como se describe en el presente documento. Opcionalmente, las composiciones de AAV como se describen en el presente documento se pueden administrar en ausencia de un agente químico o farmacológico extrínseco adicional, u otra alteración física de la barrera hematoencefálica. En una terapia combinada, la construcción de inmunoglobulina suministrada por AAV descrita en el presente documento puede administrarse antes, durante o después de comenzar la terapia con otro agente, así como cualquier combinación de los mismos, es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la terapia antineoplásica. Por ejemplo, el AAV se puede administrar entre 1 y 30 días, preferentemente 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia. La quimioterapia se puede administrar simultáneamente con o, más preferentemente, posteriormente a la terapia con inmunoglobulinas (anticuerpos) mediadas por AAV. Las composiciones de la invención se pueden combinar con otros productos biológicos, por ejemplo, fármacos de anticuerpos monoclonales recombinantes, conjugados anticuerpo-fármaco o similares. Además, en dichas pautas se pueden usar combinaciones de diferentes construcciones de inmunoglobulina suministradas por AAV, tales como las analizadas anteriormente. Puede usarse cualquier método o vía adecuada para administrar una composición que contiene AAVhu68.anti-Her2 como se describe en el presente documento y, opcionalmente, coadministrar agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Las pautas de agentes antineoplásicos utilizadas incluyen cualquier pauta que se crea que es óptima para el tratamiento de la afección neoplásica del paciente. Diferentes tumores malignos pueden requerir el uso de anticuerpos antitumorales específicos y agentes antineoplásicos específicos, que se determinarán sobre la base de paciente a paciente. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, la administración sistémica, oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis de antagonista administrada depende de numerosos factores, incluyendo, por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y gravedad del tumor que se está tratando y la vía de administración de los antagonistas.
- Cabe señalar que el término "un" o "uno/a" se refiere a uno o más. Por lo tanto, las expresiones "un" (o "uno/a"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se usan indistintamente en el presente documento.
- Las palabras "comprender", "comprende" y la expresión "que comprende" deben interpretarse de manera inclusiva en lugar de exclusiva. Las expresiones "consisten", "que consiste" y sus variantes, deben interpretarse de manera exclusiva, en lugar de inclusiva. Aunque se presentan diversas realizaciones en la memoria descriptiva que usan la expresión "que comprende", en otras circunstancias, también se pretende que una realización relacionada también se interprete y describa usando la expresión "que consiste en" o "que consiste esencialmente en".
- Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa una variabilidad del 10 % ( $\pm 10\%$ ) con respecto a la referencia dada, a menos que se especifique de otro modo.
- Como se usa en el presente documento, "enfermedad", "trastorno" y "afección" se usan indistintamente, para indicar un estado anómalo en un sujeto.
- A menos que se definan de otro modo en la presente memoria descriptiva, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto habitual en la materia y por referencia a textos publicados, que proporcionan a un experto en la materia una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.
- El término "expresión" se usa en el presente documento en su significado más amplio y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. La expresión puede ser transitoria o estable.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "título de NAb" se refiere a una medición de cuánto anticuerpo neutralizante (por ejemplo, NAb anti-AAV) se produce que neutraliza el efecto fisiológico de su epítopo objetivo (por ejemplo, un AAV). Los títulos de NAb anti-AAV se pueden medir como se describe en, por ejemplo, Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): págs. 381-390.
- Como se usa en el presente documento, un "casete de expresión" se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante, promotor, y puede incluir otras secuencias reguladoras para la misma. Un genoma de vector puede contener dos o más cassetes de expresión. El término "transgén" se puede usar indistintamente con "casete de expresión". Normalmente, un casete de expresión de este tipo para generar un vector vírico contiene la secuencia codificante para el producto génico descrito en el presente documento flanqueada por señales de empaquetamiento del genoma vírico y otras secuencias de control de la expresión tales como las descritas en el presente documento.

La abreviatura "sc" en este contexto se refiere a autocomplementario. "AAV autocomplementario" se refiere a una construcción en la que se ha diseñado una región codificante portada por una secuencia de ácido nucleico de AAV recombinante para formar un molde de ADN bicatenario intramolecular. Tras la infección, en lugar de esperar la síntesis mediada por células de la segunda cadena, las dos mitades complementarias de scAAV se asociarán para formar una unidad de ADN bicatenario (ADNb) que está lista para la replicación y transcripción inmediatas. Véase, por ejemplo, DM McCarty et al., "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (agosto de 2001), Vol 8, Número 16, Páginas 1248-1254. Los AAV auto-complementarios se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 6.596.535; 7.125.717; y 7.456.683.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unidas operativamente" se refiere a las secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a distancia para controlar el gen de interés.

El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a una proteína o un ácido nucleico indica que la proteína o el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce, normalmente, de manera recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para fabricar un ácido nucleico funcional nuevo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede tener un promotor de un gen dispuesto para dirigir la expresión de una secuencia codificante de un gen diferente. Por lo tanto, con referencia a la secuencia codificante, el promotor es heterólogo.

Un "virus de replicación defectuosa" o "vector vírico" se refiere a una partícula vírica sintética o artificial en la que un casete de expresión que contiene un gen de interés está empaquetado en una cápside o envoltura vírica, donde cualquier secuencia genómica vírica empaquetada también dentro de la cápside o envoltura vírica es de replicación deficiente; es decir, no pueden generar descendencia de viriones, pero conservan la capacidad de infectar células diana. El genoma del vector vírico puede no incluir genes que codifican las enzimas necesarias para la replicación (el genoma puede modificarse para que sea "dependiente de auxiliar", que contiene solo el gen de interés flanqueado por las señales necesarias para la amplificación y el empaquetamiento del genoma artificial), pero estos genes pueden suministrarse durante la producción. Por lo tanto, se considera seguro para su uso en terapia génica, ya que la replicación y la infección por viriones descendientes no pueden ocurrir excepto en presencia de la enzima vírica necesaria para la replicación.

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

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

Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de la composición de rAAV que suministra y expresa en las células diana una cantidad del producto génico del genoma de vector. Se puede determinar una cantidad eficaz basándose en un modelo animal, en lugar de un paciente humano. En el presente documento se describen ejemplos de un modelo murino adecuado.

Un rAAV o una composición como se proporciona en el presente documento puede excluir un anticuerpo anti-gripe o una construcción de inmunoglobulina. Un rAAV o una composición como se proporciona en el presente documento puede excluir un gen de atrofia muscular espinal (AME) o una secuencia codificante de SMN.

El término "traducción" en el contexto de la presente invención se refiere a un proceso en el ribosoma, en donde una cadena de ARNm controla el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para generar una proteína o un péptido.

Como se usan a lo largo de la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las expresiones "que comprende/n", "que contiene/n", "que incluye/n", y sus variantes, incluyen otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares. Por el contrario, la expresión "que consiste/n" y sus variantes excluyen otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares.

Cabe señalar que el término "un" o "uno/a", hacen referencia a uno o más, por ejemplo, "un potenciador", se entiende que representa uno o más potenciadores. Por lo tanto, las expresiones "un" (o "uno/a"), "uno/a o más" y "al menos uno/a" se usan indistintamente en el presente documento.

Como se ha descrito anteriormente, el término "aproximadamente" cuando se usa para modificar un valor numérico significa una variación de  $\pm 10\%$ , a menos que se especifique de otro modo.

- 5 Los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos.

### Ejemplos

10 En determinadas realizaciones, se ha observado que la cápside AAVhu68 tiene un mejor rendimiento que AAV9, que también está en el Clado F. Uno o ambos cambios de aminoácidos, el ácido glutámico (Glu) en la posición 67 y la valina (Val) en la posición 157, pueden conferir este mayor rendimiento. En determinadas realizaciones, los vectores que tienen las cápsides de AAVhu68 proporcionan al menos un aumento del 15 % en el rendimiento del vector empaquetado en comparación con los vectores a base de AAV9. En una comparación entre AAVhu68 y AAVrh10, se ha descubierto que AAVhu68 proporciona una mejor eficiencia de transducción que AAVrh10 a dosis bajas (por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^9$ ) después de la administración intracerebroventricular.

### EJEMPLO 1

#### A. Identificación de AAVhu68

20 Se extrajo ADN tisular de muestras de tejido humano como molde de PCR con columnas QIAamp (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante con las siguientes modificaciones. Se eligió la ADN polimerasa Q5 (Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, NEB) por su extraordinaria alta fidelidad y sólida eficiencia para recuperar el gen de VP1 de longitud completa de posibles AAV en las muestras, como describen Gao, et al. [Proc Natl Acad Sci USA, 3 de septiembre de 2002, 99(18): 11854-11859 (Epub de 21 de agosto de 2002)] con el conjunto de cebadores modificado de la siguiente manera: en lugar del cebador AV1NS, se usó GCTGCGYCAACTGGACCAATGAGAAC, prm504 [SEQ ID NO: 7], y en lugar del cebador inverso AV2CAS, se usó prm505: CGCAGAGACCAAGTTCAACTGAAACGA [SEQ ID NO: 8].

25 Las condiciones de PCR se modificaron de la siguiente manera:

30

	$\mu$ l
Agua	9
prm504	1,25
prm505	1,25
molde	1
2X Q5	12,5

#### Programa de PCR

	Tiempo (segundos)	Ciclo(s)
98	30	1
98	10	50
59	10	
72	93	
72	120	1

35 Las bandas de ~3 kb de la PCR se cortaron del gel; el ADN se extrajo con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) y se clonó en el Kit de clonación por PCR Zero Blunt® TOPO® (Thermo Fisher Scientific). Se secuenciaron los plásmidos para obtener la longitud completa del gen de VP1 de AAV. Para la mayoría de las muestras, se secuenciaron totalmente al menos tres plásmidos y se extrajeron secuencias consenso como secuencia final de AAV para esa muestra.

40

La secuencia de ácido nucleico obtenida que codifica la proteína de la cápside vp1 de AAVhu68 se proporciona en SEQ ID NO: 1. Véanse, además, las FIG. 2A-2C. La secuencia de aminoácidos de vp1 de AAVhu68 se proporciona en la FIG. 1 y SEQ ID NO: 2. En comparación con AAV9, AAVhu31 y AAVhu32, se identificaron dos mutaciones (A67E y A157V) críticas en AAVhu68 (marcadas con un círculo en la FIG. 1).

45

Este método de amplificación también proporcionó una secuencia espaciadora entre la secuencia codificante de vp 1 y las secuencias codificantes de rep. Esta secuencia codificante es: atgacttaaccagg, SEQ ID NO: 9. La secuencia codificante para rep52 de AAVhu68 se reproduce en SEQ ID NO: 3. La secuencia de la proteína rep52 también se reproduce en SEQ ID NO: 4.

- 5      Después se preparó el plásmido *trans* de pAAV2/hu68 cargando el gen de VP1 de hu68 en una cadena principal  
 10     de pAAV2/9 en lugar del gen de VP1 de AAV9 con el fin de evaluar la eficiencia de empaquetamiento, el  
 rendimiento y las propiedades de transducción. El plásmido pAAV2/9 contiene ITR 5' y 3' de AAV2 que flanquean  
 el gen de la cápside y está disponible en Penn Vector Core [Universidad de Pensilvania, Filadelfia, PA, EE.UU.,  
 pennvectorcore.med.upenn.edu].

#### B. Caracterización de AAVhu68

15     Aunque este fenómeno no se ha observado ni descrito anteriormente en las cápsides de virus adenoasociados, se  
 ha descubierto que otras proteínas y péptidos son susceptibles, tanto *in vivo* como *in vitro*, a una diversidad de  
 modificaciones químicas. Una de las modificaciones más frecuentes es la desamidación de asparragina, una  
 20     reacción espontánea no enzimática. En general, las semividas de desamidación del asparraginilo en condiciones  
 fisiológicas (pH 7,4, 37 °C) varían entre aproximadamente 1 y 1000 días. Una serie similar de reacciones ocurre  
 en los restos glutamina a glutamato, pero estas reacciones son mucho más lentas que las de sus homólogos de  
 asparragina.

25     En los péptidos cortos, la formación de intermedios cíclicos está controlada por la secuencia primaria, mientras  
 que en las proteínas las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias tienen un efecto adicional. Por lo tanto,  
 la tasa de desamidación de cada amida proteínica se determina de forma única. La identificación espectrométrica  
 30     de masas de péptidos desamidados es relativamente sencilla, ya que la desamidación suma a la masa de la  
 molécula intacta +0,984 Da (la diferencia de masa entre los grupos -OH y -NH<sub>2</sub>). Puesto que la desamidación es  
 una modificación estable en la fase gaseosa, los espectros de EM/EM pueden revelar la posición de desamidación  
 incluso en presencia de varios sitios de desamidación potenciales.

35     30 Se produjeron cuatro vectores AAVhu68 usando uno de los cuatro genomas de vector que no son pertinentes para  
 este estudio, cada uno producido usando métodos convencionales de triple transfección en células 293. Para una  
 descripción general de estas técnicas véase, por ejemplo, Bell CL, *et al.*, "The AAV9 receptor and its modification  
 to improve *in vivo* lung gene transfer in mice", J Clin Invest. 2011;121:2427-2435. Resumiendo, un plásmido que  
 40     codifica la secuencia que se va a empaquetar (un producto génico expresado a partir de un promotor de β-actina  
 de pollo, un intrón y una poli A de hormona de crecimiento) flanqueada por repeticiones terminales invertidas de  
 AAV2, se empaquetó mediante transfección triple de células HEK293 con plásmidos que codificaban el gen rep de  
 AAV2 y el gen cap de AAVhu68 y un plásmido auxiliar de adenovirus (pAdΔF6). Las partículas víricas de AAV  
 resultantes pueden purificarse mediante centrifugación en gradiente de CsCl, concentrarse y congelarse para su  
 uso posterior.

45     40 Desnaturalización y alquilación: A 100 µg de la preparación vírica descongelada (solución proteínica), añadir 2 µl  
 de ditiotreitol (DTT) 1 M y 2 µl de clorhidrato de guanidina (GndHCl) 8 M e incubar a 90 °C durante 10 minutos.  
 Dejar que la solución se enfrie a temperatura ambiente, después añadir 5 µl de yodoacetamida (IAM) 1 M recién  
 preparada e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de 30 minutos,  
 50     45 interrumpir la reacción de alquilación añadiendo 1 µl de DTT 1 M.

Digestion: A la solución de proteína desnaturizada añadir bicarbonato de amonio 20 mM, pH 7,5-8 en un volumen  
 que diluya la concentración final de GndHCl a 800 mM. Añadir una solución de proteasa (tripsina o quimotripsina)  
 55     50 para obtener una relación de proteasa a proteína de 1:20 e incubar a 37 °C durante la noche. Después de la  
 digestión, añadir TFA a una cantidad final del 0,5 % para interrumpir la reacción de digestión.

Espectrometría de Masas: Se analiza aproximadamente 1 microgramo de la mezcla de digestión combinada  
 mediante UHPLC-EM/EM. Se realiza CL en un sistema UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific). La fase móvil  
 60     55 A es agua MilliQ con ácido fórmico al 0,1 %. La fase móvil B es acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %. El gradiante  
 de CL se ejecuta desde el 4 % de B hasta el 6 % de B durante 15 min, después al 10 % de B durante 25 min (40  
 minutos en total), después al 30 % de B durante 46 min (86 minutos en total). Las muestras se cargan directamente  
 en la columna. El tamaño de la columna es de 75 cm × 15 um D.I. y está rellena de medio C18 de 2 micrómetros  
 (Acclaim PepMap). La CL está en interfaz con un espectrómetro de masas Orbitrap de cuadrupolo (Q-Exactive HF,  
 Thermo Scientific) a través de ionización por electronebulización nanoflex usando una fuente. La columna se  
 calienta a 35 °C y se aplica un voltaje de electronebulización de 2,2 kV. El espectrómetro de masas está  
 programado para obtener espectros de masas en tandem de los 20 iones principales. Resolución de EM completa  
 a 120.000 y resolución de EM/EM a 30.000. La energía de colisión normalizada se establece en 30, el control  
 automático de ganancia en 1e5, el llenado máximo de EM en 100 ms, el llenado máximo de EM/EM en 50 ms.

65     Procesamiento de datos: Los archivos de datos EN BRUTO del espectrómetro de masas se analizaron mediante  
 BioPharma Finder 1.0 (Thermo Scientific). Resumiendo, todas las búsquedas requirieron una tolerancia de masa

de precursor de 10 ppm, tolerancia de masa de fragmentos de 5 ppm, escisión tríptica, hasta 1 escisión perdida, modificación fija de la alquilación de cisteína, modificación variable de la oxidación de metionina/triptófano, desamidación de asparragina/glutamina, fosforilación, metilación y amidación.

- 5 En la siguiente tabla, T se refiere a la tripsina y C se refiere a la quimotripsina.

# ES 2 971 872 T3

Modificación	T	T	T	C	C	C	T	T	T
<b>Enzima</b>	T	T	T	C	C	C	T	T	T
% de Cobertura	93,6	92	93,1	92,5	90,2	89,7	91,1	88,9	98,9
+ Desamidación (Desamid)									
~N35									
<b>N57+ Desamid</b>	87,6	95,5	89,3	88,2	90,5	96,3	86,4	84,8	100,0
<b>N66+ Desamid</b>	4,7								
<b>N94+ Desamid</b>	11,3	10,9	11,0	5,3	11,6	10,4	10,8	5,6	5,0
<b>N113+ Desamid</b>				1,8					
-N253+ Desamid	17,7	22,0	21,1	15,0	17,0	22,6	20,5	15,6	4,2
<b>Q259+ Desamid</b>	35,2	25,6	21,0		35,4	26,3	20,9	9,2	
-N270+ Desamid	16,4	25,1	23,2	16,6	15,9	24,9	23,5	16,1	0,2
-N304+ Desamid	2,6	2,9	2,8	1,3	2,5	2,8	2,9	1,3	16,6
~N314+Desamid									10,3
N319+ Desamid	0,3	2,8	2,8	0,2		2,9	2,8	0,2	6,5
N329+ Desamid	72,7	85,6	89,1	86,8	71,0	87,2	88,7	84,7	85,5
N336+ Desamid		30,8	9,3	100,0		31,0	9,2	95,7	
-N409+ Desamid	21,3	22,9	23,9	24,0	22,0	23,4	24,7	24,2	
N452+ Desamid	98,8	99,7	99,2	100,0	98,9	97,3	98,1	95,2	98,2
N477+ Desamid	4,4	4,3	4,3	2,6	4,5	4,4	4,3	2,6	
N512+ Desamid	97,5	97,9	95,3	95,7	92,2	91,8	99,2	96,1	99,7
-N515+ Desamid	8,2	21,0	16,0		8,3	21,0	16,5	0,0	2,5
~Q599+ Desamid	4,0	15,4	10,1	13,6	4,0	15,5	10,0	13,8	15,8
N628+ Desamid	5,3		5,6		5,4	0,0	5,4	0,0	
N651+ Desamid	0,9	1,6	1,6					0,5	

# ES 2 971 872 T3

N663+ Desamid	3,4	3,5	3,7	3,4	0,0	3,4	3,6				
N709+ Desamid	0,6	0,8	20,2	0,6	0,6	0,8	19,8	0,6	0,3	1,3	0,1
N735									25,0	42,7	0,2
+ Acetilación (Ac);											21,7
K332 + Ac					100,0						
~K693+Ac	13,0		13,5								
~K666+Ac						93,8					
~K68+ Ac			59,2								
+ Isomerización (Iso);											
D97 + Iso	0,5	0,4	0,4	0,2	0,5			0,4	0,4	0,2	
D107 + Iso		0,3		0,3				0,3			
D384 + Iso	0,8					0,9					
+ Fosforilación (Fos)											
S149+Fos	5,8	5,7	5,2	9,8		5,7	5,9	5,2	5,2	9,9	
-S499+ Fos					30,6						
-T569+ Fos	0,9										
-S586+ Fos			3,6								
+ Oxidación											
~W23+Oxi		4,7	5,5					4,8	4,8	5,5	
W247+Oxi	1,5	0,4	0,7					1,4	1,4		
W247+Oxi a quinurenina		0,1						0,1	0,1		

W306+Oxi	0,7	0,9	1,6	1,8	0,7	1,0	1,6	1,8
W306+Oxidación a quinurenina		0,3				0,3		
M404+Oxi	0,1		0,2		0,1		0,2	
M436+Oxi	4,9	10,2	23,0	4,8		10,2	22,6	
-M518+ Oxi	29,9	1,5	10,6	29,9		1,5	10,5	
-M524+ Oxi	18,8	31,6	52,7	18,4	31,1	52,5	14,2	
M559+Oxi	19,0	21,6	19,6	20,9	19,6	21,3	20,1	20,9
-M605+ Oxi	12,2	15,2			12,8	14,8		
W619+Oxi	1,0		0,6	1,5	1,0		0,6	1,5
W619+Oxidación			20,3					
-M640+ Oxi	23,5	64,2	24,6	22,4	21,1	25,6		
W695+Oxi	0,3		0,4	0,4	0,3		0,4	0,4
+Amidación								
~D297+Amidación		72,9		73,3				

En el caso de la proteína de la cápside AAVhu68, 4 restos (N57, N329, N452, N512) muestran habitualmente altos niveles de desamidación y en la mayoría de los casos > 90 % en diversos lotes. Restos de asparragina adicionales (N94, N253, N270, N304, N409, N477) y Q599) también muestran niveles de desamidación de hasta el ~20 % en diversos lotes. Los niveles de desamidación se identificaron inicialmente usando una digestión con tripsina y se verificaron con una digestión con quimotripsina.

#### 5 EJEMPLO 2 - Rendimiento de vectores AAVhu68

10 Se generaron y evaluaron vectores AAVhu68 y AAV9 que portaban diversos marcadores, tales como GFP y LacZ. Cada uno de los vectores se generó usando la técnica de triple transfección en células 293, como describen Gao et al [Gao, Guang-Ping, et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy". Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859.]

#### 15 A. Producción de plásmido *trans* de pAAVhu68

15 La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside vp1 se proporciona en SEQ ID NO: 1.

20 Se preparó el plásmido *trans* de pAAV2/hu68 cargando el gen de VP1 de hu68 en una cadena principal de pAAV2/9 en lugar del gen de VP1 de AAV9 con el fin de evaluar la eficiencia de empaquetamiento, el rendimiento y las propiedades de transducción. El plásmido pAAV2/9 contiene ITR 5' y 3' de AAV2 que flanquean el gen de la cápside y está disponible en Penn Vector Core [Universidad de Pensilvania, Filadelfia, PA, EE.UU., pennvectorcore.med.upenn.edu].

#### 25 B. Rendimiento de vectores AAVhu68

25 Se cultivaron y mantuvieron células 293 en DMEM, 1X (Modificación de Dulbecco del medio esencial mínimo de Eagle) con glucosa 4,5 g/l, L-glutamina y piruvato de sodio suplementados con suero fetal bovino 10 % en atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C. Las transfecciones se realizaron como describen Gao et al [Gao, Guang-Ping, et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy". Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859.] con el plásmido de vector reemplazado por pAAV2/hu68 o pAAV2/9. El transgén (casete de expresión) utilizado fue CB7.CI.ffLuciferasa.RBG. Las células transfectadas se cultivaron adicionalmente en placas de 6 pocillos. Se recogió el lisado total de las células, así como el sobrenadante, para la cuantificación del virus a través de análisis TaqMan (Applied Biosystems) usando sondas y cebadores dirigidos a la región poliA de beta-globina de conejo del transgén (casete de expresión) como se describe en Gao et al [Gao, Guangping, et al. "Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance *in vivo*". Human gene therapy 11.15 (2000): 2079-2091.]. Se compararon los rendimientos de seis plásmidos de pAAV2/9 y seis plásmidos de pAAV2/hu.68 en placas de 6 pocillos, cabeza a cabeza, en términos tanto del título de sobrenadante como del título de lisado total. Cada plásmido provenía de una colonia de bacterias individual.

40 40 Se descubrió que el rendimiento de AAVhu68 era similar al de AAV9 en términos de lisado total (FIG. 3A, n = 6, p = 0,42). Sin embargo, en el sobrenadante, el rendimiento de AAVhu68 fue significativamente mayor que el de AAV9 (FIG. 3B, n = 6, p = 0,0003). Por lo tanto, se demostró que AAVhu68 es un mejor vector en comparación con AAV9 en términos de producción, puesto que el sobrenadante se recoge durante la producción de virus y escala de pila de células.

#### 45 EJEMPLO 3 - Transducción *in vivo* de AAVhu68.LacZ

50 50 Se generó AAVhu68.CB7.nLacZ (también denominado AAVhu68.LacZ) a través de la inserción de una secuencia que codifica la β-galactosidasa bacteriana localizada en el núcleo (nLacZ) y después se produjo como se describe en el Ejemplo 2. Para evaluar la eficiencia de empaquetamiento, rendimiento, propiedades de transducción, eficiencia de transducción y tropismo de AAVhu68 *in vivo*, a los ratones se les inyectaron 5 × 10<sup>11</sup> copias de genoma del vector AAVhu68.LacZ a través de diversos métodos de administración, tales como administración intravenosa, intramuscular e intranasal. Se recogieron músculo, pulmón, hígado y corazón después de sacrificar a los ratones dos semanas después de la administración del vector. Se prepararon secciones congeladas de cada órgano, se procesaron y se analizaron como protocolo convencional para detectar la expresión del gen LacZ [Bell, Peter, et al. "An optimized protocol for detection of E. coli β-galactosidase in lung tissue following gene transfer". Histochemistry and cell biology 124.1 (2005): 77-85.]. Una tinción positiva para LacZ mostrada en color azul (FIG. 4A-4C) indica una transducción satisfactoria de AAVhu68.

60 60 Como se muestra en la FIG 4A, después de que los vectores se introdujesen en ratones a través de inyección intravenosa (IV), todos los órganos sometidos a ensayo (corazón, hígado, pulmón y músculo) demostraron transducción de AAVhu68, mientras que se observó un tropismo que favorecía al corazón y al hígado sobre los pulmones y los músculos. Después de que los vectores se introdujesen en ratones a través de inyección intramuscular (IM), el corazón, el hígado y el músculo demostraron una alta tasa de transducción de AAVhu68, mientras que no se observó transducción detectable en el pulmón. Si se realizó administración intranasal, se

observó transducción dispersa en corazón, hígado, músculo y pulmón.

Estos resultados revelaron que AAVhu68 demostró una alta eficiencia de transducción y un amplio tropismo de tejido/órgano.

5

#### EJEMPLO 4 - Transducción *in vivo* de AAVhu68.GFP en comparación con AAV9.GFP

Se generaron AAVhu68.GFP y AAV9.GFP a través de la inserción de un gen que codificaba la proteína fluorescente verde (GFP) como los genes que después se producen como se describe en el Ejemplo 2. Para evaluar la eficiencia de empaquetamiento, rendimiento, propiedades de transducción, eficiencia de transducción y tropismo de AAVhu68 y AAV9 *in vivo*, a los ratones se les administró AAVhu68.GFP o AAV9.GFP en dosis de  $1 \times 10^{10}$  CG o  $1 \times 10^{11}$  CG. Se recogieron cerebro, músculo, pulmón, hígado y corazón después de sacrificar a los ratones dos semanas después de la administración del vector. Se prepararon y procesaron secciones congeladas de cada órgano para visualizar la expresión de GFP como describen Wang et al. [Wang L, et al., Hum Gene Ther. Noviembre de 2011; 22(11):1389-401; Wang L, et al., Mol Ther. Enero de 2010; 18(1): 126-34]. Una tinción positiva para GFP mostrada en color verde (FIG. 5A-5C y FIG. 6A-6D) indica una transducción satisfactoria de los vectores sometidos a ensayo.

Se investigaron secciones de diversas regiones del cerebro (hipocampo, corteza motora y cerebelo) de ratones a los que se les administraron los vectores por vía intracerebroventricular. La transducción de los vectores AAV se observó en todas las muestras de hipocampo sometidas a ensayo excepto en una de ratones inyectados con  $1 \times 10^{10}$  CG de AAV9.GFP. Se observó una mejor transducción de AAVhu68.GFP en comparación con la de AAV9 en la corteza motora. Además, se observó transducción en el cerebelo de AAVhu68.GFP cuando a los ratones se les inyectaron  $1 \times 10^{11}$  CG del vector solamente. Por lo tanto, AAVhu68 mostró una mayor eficiencia de transducción así como un tropismo más amplio en el cerebro en comparación con AAV9.

En un experimento adicional, se prepararon y procesaron diversos órganos, tales como hígado, riñón, corazón y páncreas, de ratones a los que se les administró AAVhu68.GFP por vía intravenosa como describen Wang et al. [Wang L, Calcedo R, Bell P, Lin J, Grant RL, Siegel DL, Wilson JM, Hum Gene Ther. Noviembre de 2011; 22(11): 1389-401; Wang L, Calcedo R, Wang H, Bell P, Grant R, Vandenbergh LH, Sanmiguel J, Morizono H, Batshaw ML, Wilson JM, Mol Ther. Enero de 2010; 18(1):126-34]. Una señal positiva de GFP mostrada en color verde indica una transducción satisfactoria de dichos vectores de AAV. Se proporcionaron imágenes de campo claro mostradas en blanco y negro para la morfología de los órganos, mientras que el canal fluorescente de color rojo correspondiente se proporcionó como control negativo.

35

Se observó una fuerte señal positiva mostrada en color verde en el hígado, mientras que en el riñón, el corazón y el páncreas se demostró asimismo la transducción de dicho vector, lo que indica un amplio tropismo de tejido/órgano del vector AAVhu68.

40

#### EJEMPLO 5 - Rendimiento y transducción *in vivo* de vectores de AAV con mutación A67E y A157V

Para aumentar el rendimiento y/o la eficiencia de empaquetamiento de un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV), se diseña un gen de la cápside de AAV para expresar una proteína vpl con una Glu en la posición del aminoácido 67 y/o una Val en la posición del aminoácido 157, para los vectores de AAV, tales como AAV9, AAVhu31 y AAVhu32, en donde la numeración de los restos de aminoácidos se basa en AAVhu68 [SEQ ID NO: 5].

50

Dichos vectores de AAV se producen y se evalúan en cuanto al rendimiento de cada vector de acuerdo con el Ejemplo 2. La eficiencia de la transducción *in vivo* y el tropismo de tejido/órgano/región se evalúan adicionalmente mediante métodos convencionales, tales como se ilustran en el Ejemplo 3.

#### EJEMPLO 6 - AAVhu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 intratecal para la profilaxis de metástasis cerebrales de cáncer de mama HER2+ humano

AAV9	Virus adenoasociado 9
AAV9.trastuzumab	AAV9.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 (AAV9 que lleva un casete de expresión de trastuzumab)
EAB	Ensayo de ácido bicinconílico
MCCM	Metástasis cerebrales de cáncer de mama
IC	Intrón químérico
CMV (Promotor)	Potenciador temprano inmediato de citomegalovirus/promotor de beta-actina de pollo

LCR	Líquido cefalorraquídeo
ddPCR	Reacción en cadena de la polimerasa digital de gotitas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CG	Copias de genoma
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
PTG	Programa de terapia genética
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
AAVhu68	Virus adenoasociado serotipo hu68
AAVhu68.trastuzumab	hu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 (AAVhu68 que lleva un casete de expresión de trastuzumab)
ICV	Intracerebroventricular
ID	Número de identificación
IT	Intratecal
mAb	Anticuerpo monoclonal
DME	Dosis mínima esencial
n	Número de animales
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RAG1 <sup>-/-</sup>	Desactivación del gen 1 activador de recombinación
RAG1	Gen 1 activador de recombinación
rBG	Secuencia de poli A de β-globina de conejo
RPM	Rotaciones por minuto
DT	Desviación típica
PTN	Procedimiento de trabajo normalizado
SV40 (señal Poli A)	Señal de poliadenilación del virus de simio 40

#### A. Sumario

- 5 El fin de este estudio era someter a ensayo la eficacia terapéutica de AAVhu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 (AAVhu68.trastuzumab), un virus adenoasociado recombinante de serotipo AAVhu68 que contenía un casete de expresión de trastuzumab, para la profilaxis de metástasis cerebrales de cáncer de mama HER2+ humano en un modelo en ratón de xenoinjerto. El trastuzumab (Herceptin®, Roche) es un anticuerpo monoclonal humanizado (mAb) dirigido contra HER2 que prolonga la supervivencia de los pacientes cuando se usa por vía intravenosa con quimioterapia para tratar la enfermedad HER2+ sistémica. Sin embargo, la barrera hematoencefálica impide que el Herceptin®, que se administra por vía intravenosa, entre en el sistema nervioso central, lo que le impide tratar eficazmente las metástasis cerebrales del cáncer de mama HER2+. Varios informes de casos indican que Herceptin® administrado por vía intratecal puede aumentar la supervivencia de pacientes con enfermedad leptomenígea HER2+ o detener la progresión de metástasis focales de HER2+ [J. C. Bendell, et al., Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. Cancer. 97, 2972-2977 (2003); D. J. Slamon, et al., Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. N. Engl. J. Med. 344, 783-792 (2001), M. A. Cobleigh, et al., Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J. Clin. Oncol. 17, 2639-2648 (1999), Zagouri F, et al., (2013). Intrathecal administration of trastuzumab for the treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-positive metastatic breast cancer: a systematic review and pooled analysis. Breast Cancer Res Treat, 139(1):13-22, Bousquet G, et al. (2016). Intrathecal Trastuzumab Halts Progression of CNS Metastases in Breast Cancer. J Clin Oncol. 34(16):e151-155]. Sin embargo, el LCR se renueva rápidamente, comprometiendo probablemente el efecto terapéutico de Herceptin® IT debido a un perfil farmacocinético del LCR que fluctúa ampliamente. El objetivo del tratamiento con AAVhu68.trastuzumab es prevenir la aparición, ralentizar el crecimiento, mejorar la supervivencia o aumentar las medidas de calidad de vida.
- 10
- 15
- 20
- 25

vida clínicas asociadas a MCCM HER2+ al proporcionar la expresión a largo plazo, localizada, de AAVhu68.trastuzumab en el propio parénquima cerebral.

5 Se administró AAVhu68.trastuzumab en cuatro dosis diferentes ( $1,00 \times 10^{10}$ ,  $3,00 \times 10^{10}$ ,  $1,00 \times 10^{11}$  y  $3,00 \times 10^{11}$  CG/animal) mediante inyección intracranealventricular (ICV) en ratones RAG1<sup>-/-</sup> de 6-9 semanas de edad. Se implantaron células BT474.M1.fluc, derivadas de una estirpe celular de carcinoma ductal humano HER2+, al menos 21 días después. Los ratones fueron observados a diario y se sacrificaron al final del estudio. Se recogió tejido cerebral en la necropsia para medir el volumen tumoral. Se concluyó que la administración ICV profiláctica de AAVhu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 en un modelo de xenoinjerto en RAG1<sup>-/-</sup> de metástasis cerebrales de

10 cáncer de mama HER2+ dio como resultado una reducción significativa del volumen tumoral en todas las dosis sometidas a ensayo en este experimento. En conjunto, estos resultados demostraron la potencial eficacia terapéutica de AAVhu68.trastuzumab para mejorar la supervivencia de pacientes con MCCM HER2+.

15 B. El objetivo de este estudio fue investigar la dosis mínima esencial (DME) de AAVhu68.trastuzumab para la profilaxis tumoral en un modelo de xenoinjerto en RAG1<sup>-/-</sup> de MCCM HER2+ mediante el estudio del volumen tumoral. El vector es AAVhu68.CMV.PI.htrastuzumab.SV40 o AAVhu68.trastuzumab.

Título de ddPCR:  $7,38 \times 10^{13}$  CG/ml

Endotoxina: < 2,0 UE/ml

20 Pureza: 100 %

Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Control sin tratamiento)

25 La capacidad de AAVhu68.trastuzumab para proporcionar profilaxis tumoral se evaluó usando un modelo de xenoinjerto murino RAG1<sup>-/-</sup> de MCCM HER2+. Un modelo en ratón inmunodeficiente permite el crecimiento de tumores ortotópicos de origen humano en un ratón sin rechazo por parte del sistema inmunitario del ratón. Adicionalmente, el ratón RAG1<sup>-/-</sup> no posee ninguna IgG intrínseca, permitiendo cuantificar el trastuzumab mediante ELISA de proteína A.

Tabla: Diseño del estudio

N.º de grupo	Tratamiento	Dosis (CG/ratones)	Genotipo (n)	Volumen de dosis ( $\mu$ l)	VDA	Implantación de células tumorales
1	AAVhu68.trastuzumab	$1,0 \times 10^{10}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	21 días postratamiento
2	AAVhu68.trastuzumab	$3,0 \times 10^{10}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
3	AAVhu68.trastuzumab	$1,0 \times 10^{11}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
4	AAVhu68.trastuzumab	$3,0 \times 10^{11}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
5	PBS	Sin tratamiento	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	

30 El artículo de ensayo y el control negativo se diluyeron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril hasta la concentración adecuada. El vector se administró ICV en el ventrículo lateral izquierdo.

35 El suministro intratecal de AAV se puede realizar usando una diversidad de rutas para el acceso al LCR. Se eligió la vía ICV porque es mínimamente invasiva y no requiere ningún procedimiento quirúrgico en el ratón (en comparación con la vía de la cisterna magna que requiere incisiones a través de la piel y los músculos del cuello). Se demostró anteriormente en el laboratorio de los presentes inventores y por otros que una única inyección del vector AAV9 en el líquido cefalorraquídeo (ICV o cisterna magna) tanto en ratones como en animales grandes se dirige a las neuronas de todo el cerebro [Dirren et al. (2014). Intracerebroventricular Injection Of Adeno-Associated Virus 6 And 9 Vectors For Cell Type-Specific Transgene Expression In The Spinal Cord. Hum. Gene. Therapy 25, 109-120, Snyder et al. (2011). Comparison Of Adeno-Associated Viral Vector Serotypes For Spinal Cord And Motor Neuron Gene Delivery. Hum. Gene Ther 22, 1129-1135, Bucher et al. (2014). Intracisternal Delivery Of AAV9 Results In Oligodendrocyte And Motor Neuron Transduction In The Whole Central Nervous System Of Cats. Gene Therapy 21, 522-528, Hinderer et al. (2014). Intrathecal Gene Therapy Corrects CNS Pathology In A Feline Model Of Mucopolysaccharidosis I. Mol Ther: 22, 2018-2027].

#### C. Implantación de células tumorales en ratones RAG1<sup>-/-</sup>

50 Para crear un modelo de xenoinjerto en ratón para MCCM HER2+, se empleó una estirpe celular de carcinoma de células ductales HER2+ humano transducida con luciferasa de luciérnaga, BT474-M1.fluc. Para el procedimiento de inyección, los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina. Se cortó el pelo del cuero cabelludo y del cuello. Un gránulo de 17-β estradiol de liberación prolongada (1,7 mg, liberación de 90 días, Innovative Research of America) se implantó por vía subcutánea en el dorso del cuello y se volvió a administrar cada 90 días durante el estudio. Los ratones se fijaron en un aparato estereotáxico. La piel expuesta se limpió con povidona yodada y

etanol al 70 %. Se realizó una incisión anteroposterior de 1 cm sobre la parte superior del cráneo. Se identificó el bregma. Se colocó un taladro neumático en el bregma y después se movió 0,8 mm hacia atrás y 2,2 mm hacia la izquierda de bregma, donde se perforó un orificio en el cráneo. Se cargó una jeringa Hamilton de 25 µl con 5 µl de suspensión de células tumorales (100.000 células en total en MatriGel®:PBS 50:50). La aguja se llevó al bregma y

5 se movió a las coordenadas indicadas anteriormente antes de penetrar 4,0 mm en el parénquima cerebral. Después se levantó la aguja 1,0 mm hacia atrás y arriba por el trayecto de la aguja para crear un bolsillo en el que 10 inyectar las células tumorales. La aguja se dejó colocada durante 5 minutos. A continuación, se inyectaron 5 µl de suspensión celular durante 10 minutos usando un aparato de inyección motorizado. La aguja se dejó en su lugar durante 5 minutos después de finalizar la inyección y después se retiró lentamente. La incisión sobre el cráneo se 15 suturó con vicryl 4,0 y los ratones recibieron enrofloxacino 15 mg/kg (Bayer) en PBS estéril junto con buprenorfina 0,3 mg/kg en PBS estéril, ambos por vía subcutánea.

Los ratones se controlaron a diario. Cuando estaban moribundos, los ratones se sacrificaron por sobreexposición 15 a CO<sub>2</sub> seguida de dislocación cervical. En la necropsia, se aislaron los cerebros y se cortaron coronalmente a través del trayecto de la aguja de inyección de tumor.

Volumen tumoral: La medición del diámetro tumoral del día 35 se realizó con calibres Vernier digitales (Thermo-Fisher). Los cerebros se recogieron en la necropsia. Se usó una disección roma en el trayecto de la aguja de 20 inyección de tumor para aislar los tumores del tejido cerebral circundante. Después se midió el diámetro tumoral en 3 dimensiones (x, y y z), y el volumen tumoral se calculó como el volumen de un elipsoide,  $4/3 * \pi * x/2 * y/2 * z/2$ . El hemisferio cerebral derecho, el hemisferio contralateral al sitio de inyección del vector e implantación del tumor, se conservó en formol. Los tumores disecados se agruparon por cohorte de dosis y se conservaron en formol. Las comparaciones de volumen tumoral se realizaron usando el ensayo de Mann-Whitney en GraphPad Prism 7.

#### 25 D. Resultados

Volumen tumoral: Para determinar si la profilaxis tumoral con AAVhu68.trastuzumab IT ralentiza el crecimiento tumoral, se midió el diámetro tumoral 35 días después de la implantación. La mediana del volumen de los tumores 30 del grupo que recibió la dosis más alta de profilaxis tumoral con AAVhu68.trastuzumab (0,4 mm<sup>3</sup>, n = 10) fue significativamente más pequeña la de que los ratones que no recibieron tratamiento (26,1 mm<sup>3</sup>, n = 9). Todos los ratones que recibieron dosis más bajas de AAVhu68.trastuzumab tuvieron tumores significativamente más pequeños en comparación con los que no recibieron tratamiento. La mediana del volumen tumoral de los ratones 35 que recibieron  $1,00 \times 10^{10}$  CG/ratón se calculó para que fuese estadísticamente igual que la mediana del volumen tumoral de los ratones que recibieron  $3,00 \times 10^{10}$  CG/ratón ( $p = 0,6029$ ). Cabe destacar que, dos ratones del grupo 1, un ratón del grupo 2, tres ratones del grupo 3 y tres ratones del grupo 4 no tenían ningún tumor muy apreciable tras la disección.

Grupo	Dosis (CG/ratón)	Número de ratones	Mediana del volumen tumoral (mm <sup>3</sup> )	Valor de p en comparación con ratones sin tratamiento
1	$1,00 \times 10^{10}$	9*	6,4	0,0375
2	$3,00 \times 10^{10}$	10	8,1	0,0053
3	$1,00 \times 10^{11}$	9*	1,3	0,0026
4	$3,00 \times 10^{11}$	10	0,4	< 0,0001

\*Un animal en cada uno de estos grupos se sacrificó antes de la fecha programada para la necropsia y, por lo tanto, no se incluyó en el análisis.

40 En todas las dosis, la administración IT de AAVhu68.trastuzumab condujo a una mediana del volumen tumoral significativamente menor el D35 postimplantación del tumor cuando se administró de forma profiláctica en un modelo de xenoinjerto murino RAG1<sup>-/-</sup> de MCCM HER2+, que usa la estirpe celular de carcinoma ductal humano HER2+ BT474.M1. La DEM de AAVhu68.trastuzumab medida en este estudio fue de  $1,00 \times 10^{10}$  CG/ratón.

#### 45 EJEMPLO 7 - Rendimiento de producción y pureza para los vectores AAVhu68

Para comparar el rendimiento de producción y/o la pureza de un vector adenoasociado recombinante (rAAV) que tiene diferentes cápsides, se generaron y prepararon dos conjuntos diferentes de vectores que tenían cápsides diferentes, incluyendo AAVhu68, AAV8triple, AAV8 y AAV9.

50 Resumiendo, se produjo un conjunto de vectores que tenían una cápside indicada y un genoma de vector que comprendía un promotor de citomegalovirus (CMV), una secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga y una poli A de SV40 (CMV.flLuciferasa.SV40) y se evaluó para determinar el rendimiento de cada vector a pequeña

escala. Los resultados muestran que los vectores AAV9 proporcionaron el mayor rendimiento mientras que el vector AAVhu68 le siguió en segundo puesto (FIG 8A). Los vectores AAV8 y AAV8 triple también proporcionaron un rendimiento superior a  $4 \times 10^{13}$  CG (FIG 8A).

- 5 El otro conjunto de vectores que tenían una cápside indicada y un genoma de vector que comprendía un promotor de CMV, un intrón, una secuencia codificante de inmunoadhesina (201Ig IA) y una poli A de SV40 (CMV.PI.201Ig IA.SV40) se produjo y se evaluó para determinar el rendimiento y la pureza de cada vector a mega escala de acuerdo con métodos convencionales. Los resultados se muestran en las FIG. 8B y 9.
- 10 Similares a los rendimientos de las preparaciones a pequeña escala, los vectores AAV9 proporcionaron el mayor rendimiento con aproximadamente  $5,7 \times 10^{14}$  CG, mientras que el vector AAVhu68 le siguió en segundo puesto con aproximadamente  $3,8 \times 10^{14}$  CG (FIG 8B). Los vectores AAV8 proporcionaron un rendimiento de aproximadamente  $3,6 \times 10^{14}$  CG y AAV8triple a aproximadamente  $1,8 \times 10^{14}$  CG (FIG 8B). Las purezas de las preparaciones sometidas a ensayo son comparables, variando de aproximadamente el 97,4 % a aproximadamente el 98,6 %.

15 EJEMPLO 8 - Vectores de rAAV en ratones RAG KO macho.

La expresión génica se sometió a ensayo *in vivo* usando vectores de rAAV que tenían cápsides diferentes, incluyendo AAVhu68, AAV8triple, AAV8 y AAV9 y que expresaban un producto transgénico secretado, 201Ig IA.

20 A ratones RAG KO macho de 6-8 semanas de edad ( $n = 5$ /grupo) se les inyectaron por vía intramuscular en el músculo gastrocnemio  $3 \times 10^{11}$  CG/ratón o  $3 \times 10^{10}$  CG/ratón del vector sometido a ensayo usando una jeringa Hamilton. Se recogió suero semanalmente de ratones a los que se les administraron vectores que expresaban proteínas secretadas mediante sangrados submandibulares en tubos de recogida de suero. Se midieron los niveles de expresión transgénica en suero mediante ELISA como se describe en Greig *et al.*, Intramuscular Injection of AAV8 in Mice and Macaques Is Associated with Substantial Hepatic Targeting and Transgene Expression, PLoS One. 13 de noviembre de 2014; 9(11):e112268. doi: 10.1371/journal.pone.0112268. eCollection 2014.

30 Como se muestra en las FIG 10A y 10B, los vectores AAVhu68, AAV8 y AAV9 expresaron el transgén a un nivel similar, mientras que el vector AAV8triple se expresa mejor después de la inyección IM en ratones. A la dosis más baja sometida a ensayo (es decir,  $3 \times 10^{10}$  CG/ratón), la diferencia en la expresión con respecto a AAV8triple es sustancial.

35 EJEMPLO 9 - Expresión transgénica de vectores de rAAV en ratones C57BL/6J macho.

35 Se sometió a ensayo la expresión en hígado y músculo *in vivo* usando vectores de rAAV que tenían cápsides diferentes, incluyendo AAVhu68, AAV8triple, AAV8 y AAV9 y que expresaban una luciferasa de luciérnaga (ffLuc) como transgén.

40 A ratones C57BL/6J macho de 6-8 semanas de edad ( $n = 5$ /grupo) se les inyectaron por vía intramuscular en el músculo gastrocnemio  $3 \times 10^{11}$  CG/ratón del vector sometido a ensayo usando una jeringa Hamilton. La expresión de ffLuc se visualizó semanalmente mediante imágenes de bioluminiscencia de todo el cuerpo como se describió anteriormente (Greig *et al.*, PLoS One 2014, citado anteriormente).

45 Como se muestra en las FIG 11A y 11B, los vectores AAVhu68, AAV8 y AAV9 se expresaron a un nivel similar tanto en músculo como en hígado, mientras que el vector AAV8triple tiene una expresión reducida en el hígado y una expresión potenciada en el músculo.

50 EJEMPLO 10 - Vectores rAAV en macacos cangrejeros machos y hembras.

50 La expresión transgénica se sometió a ensayo en macacos cangrejeros usando vectores de rAAV que tenían cápsides diferentes, incluyendo AAVhu68, AAV8triple, AAV8 y AAV9 y que expresaban un transgén secretado, 201Ig IA.

55 A macacos cangrejeros machos y hembras con títulos de NAb con respecto al vector inyectado de < 1:5 al inicio de los estudios, se les administró una dosis de  $10^{13}$  CG/kg de peso corporal del vector que expresaba 201Ig IA de una de las cuatro cápsides de vector (AAV8triple, AAVhu68, AAV9 o AAV8) por vía intramuscular en el músculo vasto lateral de las piernas derecha e izquierda en inyecciones de 1 ml por kg de peso corporal (concentración de vector de  $10^{13}$  CG/ml) para el estudio de biodistribución de vectores. Se tomaron muestras de sangre antes del estudio y semanalmente durante el estudio a través de venopunción de la vena femoral. Los niveles de expresión transgénica se midieron en suero mediante ELISA como se describió anteriormente (Greig *et al.*, PLoS One 2014, citado anteriormente).

65 Como se muestra en la FIG12, AAVhu68 y AAV8triple se expresan mejor en comparación con los vectores AAV9 y AAV8 después de la inyección IM.

(Texto libre del listado de secuencias)

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

5

SEQ ID NO: (que contiene texto libre)	Texto libre con el identificador <223>
2	<223> Construcción sintética
3	<223> gen rep de AAVhu68 de origen homo sapiens
4	<223> Construcción sintética
5	<223> cápside de VP 1 de AAV9 de origen homo sapiens <220> <221> CDS <222> (1)..(2208) <223> Cápside de VP1 de AAV9
6	<223> Construcción sintética
7	<223> cebador prm504
8	<223> cebador prm505
9	<223> secuencia espaciadora de AAVhu68
10	<223> proteína de la cápside vp 1 de AAVhu31
11	<223> proteína de la cápside vp1 de AAVhu32
12	<223> secuencia codificante de vp1 de AAVhu31
13	<223> secuencia codificante de vp1 de AAVhu32
14	<223> hu68vp1 modificada <220> <221> MISC_FEATURE <222> (23)..(23) <223> Xaa puede ser W (Trp, triptófano), o W oxidado. <220> <221> MISC_FEATURE <222> (35)..(35) <223> Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (57)..(57) <223> Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (66)..(66) <223> Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp
	<220> <221> MISC_FEATURE

	<p>&lt;222&gt; (94)..(94)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (97)..(97)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser D (asp, ácido aspártico), o D isomerizado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (107)..(107)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser D (asp, ácido aspártico), o D isomerizado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; misc_feature</p> <p>&lt;222&gt; (113)..(113)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (149)..(149)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser S (Ser, serina), o S fosforilada</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (149)..(149)</p>
	<p>&lt;223&gt; Xaa puede ser S (Ser, serina), o S fosforilada</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (247)..(247)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser W (Trp, triptófano), o W oxidado (por ejemplo, quinurenina).</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (253)..(253)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (259)..(259)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa representa Q, o Q desamidado a ácido glutámico (ácido alfa-glutámico), ácido gamma-glutámico (Glu) o una combinación de ácido alfa y gamma-glutámico</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (270)..(270)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p>

	<p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (297)..(297)</p>
	<p>&lt;223&gt; Xaa representa D (Asp, ácido aspártico) o D aminado a N (Asn, asparragina)</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (304)..(304)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (306)..(306)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser W (Trp, triptófano), o W oxidado (por ejemplo, quinurenina).</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (314)..(314)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (319)..(319)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (329)..(329)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (332)..(332)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser K (lys, lisina), o K acetilada</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (336)..(336)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (384)..(384)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser D (asp, ácido aspártico), o D isomerizado.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (404)..(404)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser M (Met, Metionina), o M oxidada.</p>

	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (409)..(409)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (436)..(436)</p>
	<p>&lt;223&gt; Xaa puede ser M (Met, Metionina), o M oxidada.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (452)..(452)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (477)..(477)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (499)..(499)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser S (Ser, serina), o S fosforilada</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (512)..(512)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (515)..(515)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p>
	<p>&lt;222&gt; (518)..(518)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser M (Met, Metionina), o M oxidada.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (524)..(524)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser M (Met, Metionina), o M oxidada.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (559)..(559)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser M (Met, Metionina), o M oxidada.</p>

	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (569)..(569)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser T (Thr, treonina), o T fosforilada</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (586)..(586)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser S (Ser, serina), o S fosforilada</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (599)..(599)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa representa Q, o Q desamidado a ácido glutámico (ácido alfa-glutámico), ácido gamma-glutámico (Glu) o una combinación de ácido alfa y gamma-glutámico</p>
	<p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (605)..(605)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser M (Met, Metionina), o M oxidada.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (619)..(619)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser W (Trp, triptófano), o W oxidado (por ejemplo, quinurenina).</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (628)..(628)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (640)..(640)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser M (Met, Metionina), o M oxidada.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (651)..(651)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p>
	<p>&lt;222&gt; (663)..(663)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (666)..(666)</p>

	<223> Xaa puede ser K (lys, lisina), o K acetilada <220> <221> MISC_FEATURE <222> (689)..(689) <223> Xaa puede ser K (lys, lisina), o K acetilada <220> <221> MISC_FEATURE <222> (693)..(693) <223> Xaa puede ser K (lys, lisina), o K acetilada <220> <221> MISC_FEATURE <222> (695)..(695) <223> Xaa puede ser W (Trp, triptófano), o W oxidado. <220> <221> MISC_FEATURE <222> (709)..(709) <223> Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp <220>
	<221> MISC_FEATURE <222> (735)..(735) <223> Xaa puede ser Asn, o desamidarse a Asp, isoAsp o Asp/isoAsp

## REIVINDICACIONES

1. Un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende una cápside AAVhu68 y un genoma de vector en la cápside AAVhu68, en donde:

5 (A) el genoma de vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV y entre las ITR una secuencia de ácido nucleico no de AAV que codifica un producto unido operativamente a secuencias que dirigen la expresión del producto en una célula diana de mamífero; y

10 (B) la cápside AAVhu68 comprende proteínas vp1 de AAVhu68, proteínas vp2 de AAVhu68 y proteínas vp3 de AAVhu68 producidas a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde las proteínas AAVhu68vp1 comprenden un ácido glutámico en la posición 67 y una valina en la posición 157 y las proteínas AAVhu68vp2 comprenden una valina en la posición 157 basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2.

15 2. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cápside AAVhu68 comprende subpoblaciones de proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAVhu68, en donde las subpoblaciones de las proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAV hu68 comprenden al menos del 50 % a 100 % de aspárraginas (N) desamidadas en los pares aspárragina - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, con respecto a los aminoácidos en SEQ ID NO: 2, en donde las aspárraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos, según se determina usando espectrometría de masas.

25 3. Un virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende una cápside AAVhu68 y un genoma de vector en la cápside AAVhu68, en donde:

30 (A) el genoma de vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de repetición terminales invertidas (ITR) de AAV y entre las ITR una secuencia de ácido nucleico no de AAV que codifica un producto unido operativamente a secuencias que dirigen la expresión del producto en una célula diana de mamífero; y

35 (B) la cápside AAVhu68 comprende poblaciones heterogéneas de proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAVhu68,

40 en donde las proteínas vp1 de AAVhu68 son los aminoácidos 1 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp1) que comprenden un ácido glutámico en la posición 67 y una valina en la posición 157 y comprenden además subpoblaciones de proteínas vp1 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2,

45 en donde las proteínas vp2 de AAVhu68 son los aminoácidos 138 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp2) que comprenden una valina en la posición 157 y comprenden además subpoblaciones de proteínas vp2 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2, y

50 en donde las proteínas vp3 de AAVhu68 son los aminoácidos 203 a 736 de SEQ ID NO: 2 (vp3), que comprenden subpoblaciones de proteínas vp3 que comprenden aminoácidos modificados basados en las posiciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 2,

55 en donde las subpoblaciones de las proteínas vp1 de AAVhu68, vp2 de AAVhu68 y vp3 de AAV hu68 comprenden al menos del 50 % a 100 % de aspárraginas (N) desamidadas en los pares aspárragina - glicina en cada una de las posiciones 57, 329, 452, 512, con respecto a los aminoácidos en SEQ ID NO: 2, en donde las aspárraginas desamidadas se desamidan a ácido aspártico, ácido isoaspártico, un par de interconversión de ácido aspártico/ácido isoaspártico o combinaciones de los mismos, según se determina usando espectrometría de masas.

50 4. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde las subpoblaciones de proteínas vp1, vp2 y vp3 de AAVhu68 comprenden además:

55 (i) una o más modificaciones seleccionadas de: lisina acetilada, serina y/o treonina fosforilada, ácido aspártico isomerizado, glutaminas desamidadas, triptófano oxidado y/o metionina, o un aminoácido amidado según se determina usando espectrometría de masas; y/o

60 (ii) del 1 % al 40 % de desamidación de las aspárraginas en una o más de las posiciones N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709 o combinaciones de las mismas, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, según se determina usando espectrometría de masas.

5. El rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde las subpoblaciones de la cápside AAVhu68 de las proteínas de la cápside vp1, vp2 y vp3 de AAVhu68 comprenden además

65 (a) al menos el 65 % de las aspárraginas (N) en los pares aspárragina - glicina ubicados en las posiciones 57 de las proteínas vp1 están desamidadas, según se determina usando espectrometría de masas, basándose en

la numeración de SEQ ID NO: 2; y/o

(b) al menos el 75 % de las N en los pares asparragina - glicina en la posición 329 de las proteínas vp1, vp2 y vp3 están desamidasadas, según se determina usando espectrometría de masas, basándose en la numeración de restos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y/o

5 (c) al menos el 50 % de las N en los pares asparragina - glicina en la posición 452 de las proteínas vp1, vp2 y vp3 están desamidasadas, según se determina usando espectrometría de masas, basándose en la numeración de restos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y/o

10 (d) al menos el 75 % de las N en pares asparragina - glicina en la posición 512 de las proteínas vp1, vp2 y vp3 están desamidasadas, según se determina usando espectrometría de masas, basándose en la numeración de restos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

6. El rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cápside AAVhu68 comprende:

15 (a) una subpoblación de proteínas vp1 en la que del 75 % al 100 % de las N en la posición 57 de las proteínas vp1 están desamidasadas, según se determina usando espectrometría de masas; y/o

(b) subpoblaciones de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o proteínas vp3 en las que del 75 % al 100 % de las N en la posición 329, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidasadas según se determina usando espectrometría de masas; y/o

20 (c) subpoblaciones de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o proteínas vp3 en las que del 75 % al 100 % de las N en la posición 452, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidasadas según se determina usando espectrometría de masas; y/o

(d) subpoblaciones de proteínas vp1, proteínas vp2 y/o proteínas vp3 en las que del 75 % al 100 % de las N en la posición 512, basándose en la numeración de SEQ ID NO: 2, están desamidasadas según se determina usando espectrometría de masas.

25 7. El rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas vp1 es SEQ ID NO: 1, o una secuencia de al menos el 80 % a al menos el 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; opcionalmente en donde la secuencia de ácido nucleico es al menos del 80 % al 97 % idéntica a SEQ ID NO: 1.

30 8. Una composición que comprende una población mixta de virus adenoasociado recombinante hu68 (rAAVhu68), en donde cada uno de los rAAVhu68 se selecciona independientemente de un rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

35 9. El rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde las secuencias ITR de AAV son una ITR 5' y una ITR 3' de una fuente de AAV distinta de AAVhu68.

40 10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde la composición se formula para

(i) el suministro intratecal y el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto para el suministro al sistema nervioso central;

(ii) el suministro intravenoso; o

45 (iii) el suministro intranasal o intramuscular.

AAV9	(1)	MAADGYLPDWLEDILSECREWVWIKLKGPPKQKNGHQDNARGVLPGMIGDKGEPIWIDAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKYNHADAEF	100
hu.68.VP1	(1)	MAADGYLPDWLEDILSECREWVWIKLKGPPKQKNGHQDNARGVLPGMIGDKGEPIWIDAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKYNHADAEF	
hu.31	(1)	MAADGYLPDWLEDILSECRERBWWKLKGPPPKFERRHDDSRGLVLPGSKYLPGNGLDKGEPIWIDAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKYNHADAEF	
hu.32	(1)	MAADGYLPDWLEDILSECRERBWWKLKGPPPKFERRHDDSRGLVLPGSKYLPGNGLDKGEPIWIDAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKYNHADAEF	
			200
AAV9	(101)	QERLIKEDTSFGGNLGRAFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRKPVEQSPQEPDSSGKSGQAOPAKKRNLNGQTGOTGOTESVPDPQIGEPPAAPSIVGS	101
hu.68.VP1	(101)	QERLIKEDTSFGGNLGRAFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRKPVEQSPQEPDSSGKSGQAOPAKKRNLNGQTGOTGOTESVPDPQIGEPPAAPSIVGS	
hu.31	(101)	QERLIKEDTSFGGNLGRAFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRKPVEQSPQEPDSSGKSGQAOPAKKRNLNGQTGOTGOTESVPDPQIGEPPAAPSIVGS	
hu.32	(101)	QERLIKEDTSFGGNLGRAFQAKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRKPVEQSPQEPDSSGKSGQAOPAKKRNLNGQTGOTGOTESVPDPQIGEPPAAPSIVGS	
			300
AAV9	(201)	LTMASGGAPVADINNEADGVGSSSGWICDSOVLGDRVITTSITRWALPTINWLYKQSNISSTSGCSSSIDNAIFGSTPPIGYFDENRPHCHFSPRDWQR	201
hu.68.VP1	(201)	LTMASGGAPVADINNEADGVGSSSGWICDSOVLGDRVITTSITRWALPTINWLYKQSNISSTSGCSSSIDNAIFGSTPPIGYFDENRPHCHFSPRDWQR	
hu.31	(201)	LTMASGGAPVADINNEADGVGSSSGWICDSOVLGDRVITTSITRWALPTINWLYKQSNISSTSGCSSSIDNAIFGSTPPIGYFDENRPHCHFSPRDWQR	
hu.32	(201)	LTMASGGAPVADINNEADGVGSSSGWICDSOVLGDRVITTSITRWALPTINWLYKQSNISSTSGCSSSIDNAIFGSTPPIGYFDENRPHCHFSPRDWQR	
			400
AAV9	(301)	UNMMNGFRPRLNFQKQEVTDIINGVKTAANLTSTVQFTDSYQLPYVLAHEGCCIPPFADVMIPQYGLTLNDG&DAVGRSSFYCLEYF	301
hu.68.VP1	(301)	UNMMNGFRPRLNFQKQEVTDIINGVKTAANLTSTVQFTDSYQLPYVLAHEGCCIPPFADVMIPQYGLTLNDG&DAVGRSSFYCLEYF	
hu.31	(301)	UNMMNGFRPRLNFQKQEVTDIINGVKTAANLTSTVQFTDSYQLPYVLAHEGCCIPPFADVMIPQYGLTLNDG&DAVGRSSFYCLEYF	
hu.32	(301)	UNMMNGFRPRLNFQKQEVTDIINGVKTAANLTSTVQFTDSYQLPYVLAHEGCCIPPFADVMIPQYGLTLNDG&DAVGRSSFYCLEYF	
			500
AAV9	(401)	PSQMLRTGNNFQSFEEWPFHSSYAHQSOSLDPLMINPLUDQYLYLSSLTKINGSQNQCTLKFSVAGPSMIAVQGRNYPGPSYRQCRVSTTVQMNSE	401
hu.68.VP1	(401)	PSQMLRTGNNFQSFEEWPFHSSYAHQSOSLDPLMINPLUDQYLYLSSLTKINGSQNQCTLKFSVAGPSMIAVQGRNYPGPSYRQCRVSTTVQMNSE	
hu.31	(401)	PSQMLRTGNNFQSFEEWPFHSSYAHQSOSLDPLMINPLUDQYLYLSSLTKINGSQNQCTLKFSVAGPSMIAVQGRNYPGPSYRQCRVSTTVQMNSE	
hu.32	(401)	PSQMLRTGNNFQSFEEWPFHSSYAHQSOSLDPLMINPLUDQYLYLSSLTKINGSQNQCTLKFSVAGPSMIAVQGRNYPGPSYRQCRVSTTVQMNSE	

FIG 1-1

AAV9	(501)	FAMPGASSVALNGRISLIMPGPAMASHKEGEDRFFPLSSLSLIFGKQGTGRDNIDADKVMTNEEEIKTINPVATESYGQVATNHCSAQAAQQTGWWQGS	601	PGMWWVQDQDVYLOGSPWAKIPHIDGNFHPSPLMGGFMKHPPQQLIKNTPVADPTAFNKKLNSFTIQYSTGQVSVEENLOKENSKRWNPQEIQ	700	
hu.68.VP1	(501)	FAMPGASSVALNGRISLIMPGPAMASHKEGEDRFFPLSSLSLIFGKQGTGRDNIDADKVMTNEEEIKTINPVATESYGQVATNHCSAQAAQQTGWWQGS	601	PGMWWVQDQDVYLOGSPWAKIPHIDGNFHPSPLMGGFMKHPPQQLIKNTPVADPTAFNKKLNSFTIQYSTGQVSVEENLOKENSKRWNPQEIQ	700	
hu.31	(501)	FAMPGASSVALNGRISLIMPGPAMASHKEGEDRFFPLSSLSLIFGKQGTGRDNIDADKVMTNEEEIKTINPVATESYGQVATNHCSAQAAQQTGWWQGS	601	PGMWWVQDQDVYLOGSPWAKIPHIDGNFHPSPLMGGFMKHPPQQLIKNTPVADPTAFNKKLNSFTIQYSTGQVSVEENLOKENSKRWNPQEIQ	700	
hu.32	(501)	FAMPGASSVALNGRISLIMPGPAMASHKEGEDRFFPLSSLSLIFGKQGTGRDNIDADKVMTNEEEIKTINPVATESYGQVATNHCSAQAAQQTGWWQGS	601	PGMWWVQDQDVYLOGSPWAKIPHIDGNFHPSPLMGGFMKHPPQQLIKNTPVADPTAFNKKLNSFTIQYSTGQVSVEENLOKENSKRWNPQEIQ	700	
AAV9	(601)		701	YTSNNYYSKINVEFAVITEGVSEPRPIGTRYLTNL	736	
hu.68.VP1	(601)		701	YTSNNYYSKINVEFAVITEGVSEPRPIGTRYLTNL	736	
hu.31	(601)		701	YTSNNYYSKINVEFAVITEGVSEPRPIGTRYLTNL	736	
hu.32	(601)		701	YTSNNYYSKINVEFAVITEGVSEPRPIGTRYLTNL	736	
AAV9	(701)					
hu.68.VP1	(701)					
hu.31	(701)					
hu.32	(701)					

FIG 1-2

FIG 2A-1

EIG 2A-2

FIG 2B-1

FIG 2B-2

				1900
AAV9	(1801)	ATACTTCCGAGAATGGTTGGAGACAGATGAGCTGCAAGGAGCTGAACTGCATTTGGCCAAAATTCTGACACCGAACGACTTCACCTTCCTCCGC		
hu.68.VP1	(1801)	ATACTTCCGAGAATGGTTGGAGACAGATGAGCTGCAAGGAGCTGAACTGCATTTGGCCAAAATTCTGACACCGAACGACTTCACCTTCCTCCGC		
hu.31	(1801)	ATACTTCCGAGAATGGTTGGAGACAGATGAGCTGCAAGGAGCTGAACTGCATTTGGCCAAAATTCTGACACCGAACGACTTCACCTTCCTCCGC		
hu.32	(1801)	ATACTTCCGAGAATGGTTGGAGACAGATGAGCTGCAAGGAGCTGAACTGCATTTGGCCAAAATTCTGACACCGAACGACTTCACCTTCCTCCGC		
				2000
AAV9	(1901)	TGATGGAGGGTTGGAAAGCACCCTCTCTAGATCTCATCAAAAACACACTGTACCTGGGATGCTCAACGGGTTCAAAAGGACAAAGCT		
hu.68.VP1	(1901)	TGATGGAGGGTTGGAAAGCACCCTCTCTAGATCTCATCAAAAACACACTGTACCTGGGATGCTCAAAAGGACAAAGCT		
hu.31	(1901)	TGATGGAGGGTTGGAAAGCACCCTCTCTAGATCTCATCAAAAACACACTGTACCTGGGATGCTCAAAAGGACAAAGCT		
hu.32	(1901)	TGATGGAGGGTTGGAAAGCACCCTCTCTAGATCTCATCAAAAACACACTGTACCTGGGATGCTCAAAAGGACAAAGCT		
				2100
AAV9	(2001)	GAACTTTCAACCCAGTATTCTACTGGCCAAAGTCAGCGTGGGAGATTGAGTGGGAGCTGGAGATTCAGGAAAGGAAAACAGGAAGGCTGGAAACCGGAGACCG		
hu.68.VP1	(2001)	GAACTTTCAACCCAGTATTCTACTGGCCAAAGTCAGCGTGGGAGCTGGAGATTCAGGAAAGGAAAACAGGAAGGCTGGAAACCGGAGATTCAG		
hu.31	(2001)	GAACTTTCAACCCAGTATTCTACTGGCCAAAGTCAGCGTGGGAGCTGGAGATTCAGGAAAGGAAAACAGGAAGGCTGGAAACCGGAGATTCAG		
hu.32	(2001)	GAACTTTCAACCCAGTATTCTACTGGCCAAAGTCAGCGTGGGAGCTGGAGATTCAGGAAAGGAAAACAGGAAGGCTGGAAACCGGAGATTCAG		
				2200
AAV9	(2101)	TACACTTCAACTATTACAAGCTTAATAATGTTGAAATTGCTGAAAGGTGATAACTGAAACCCGCCATTGGCACCGATAACCTGACTC		
hu.68.VP1	(2101)	TACACTTCAACTATTACAAGCTTAATAATGTTGAAATTGCTGAAAGGTGATAACTGAAACCCGCCATTGGCACCGATAACCTGACTC		
hu.31	(2101)	TACACTTCAACTATTACAAGCTTAATAATGTTGAAATTGCTGAAAGGTGATAACTGAAACCCGCCATTGGCACCGATAACCTGACTC		
hu.32	(2101)	TACACTTCAACTATTACAAGCTTAATAATGTTGAAATTGCTGAAAGGTGATAACTGAAACCCGCCATTGGCACCGATAACCTGACTC		
				2301 2211
AAV9	(2201)	GTAACTGTAA		
hu.68.VP1	(2201)	GTAACTGTAA		
hu.31	(2201)	GTAACTGTAA		
hu.32	(2201)	GTAACTGTAA		

FIG 2C

FIG. 3A

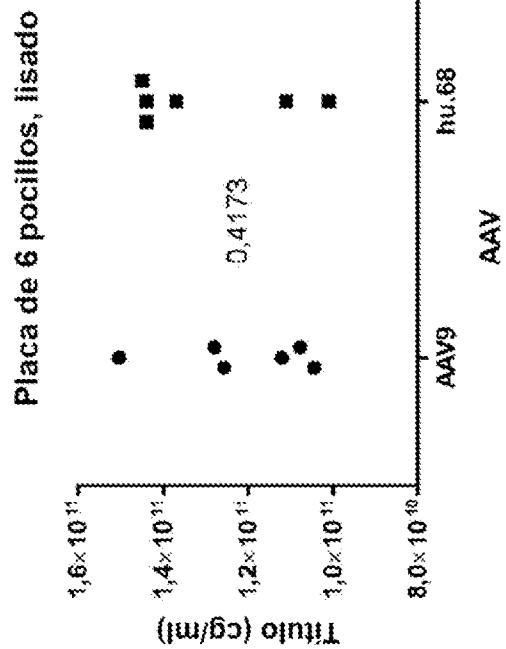


FIG. 3B

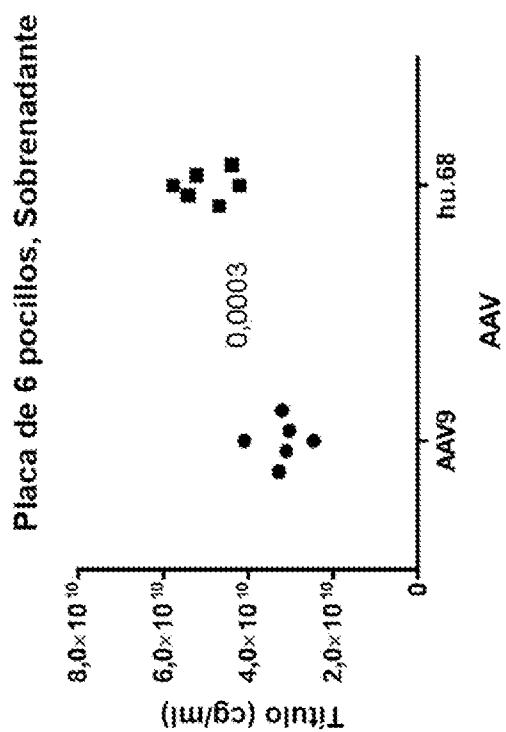


FIG. 4A

$5 \times 10^{11}$  CG de AA Vhuss8.CB7.mLacZ, administración IV, rataón

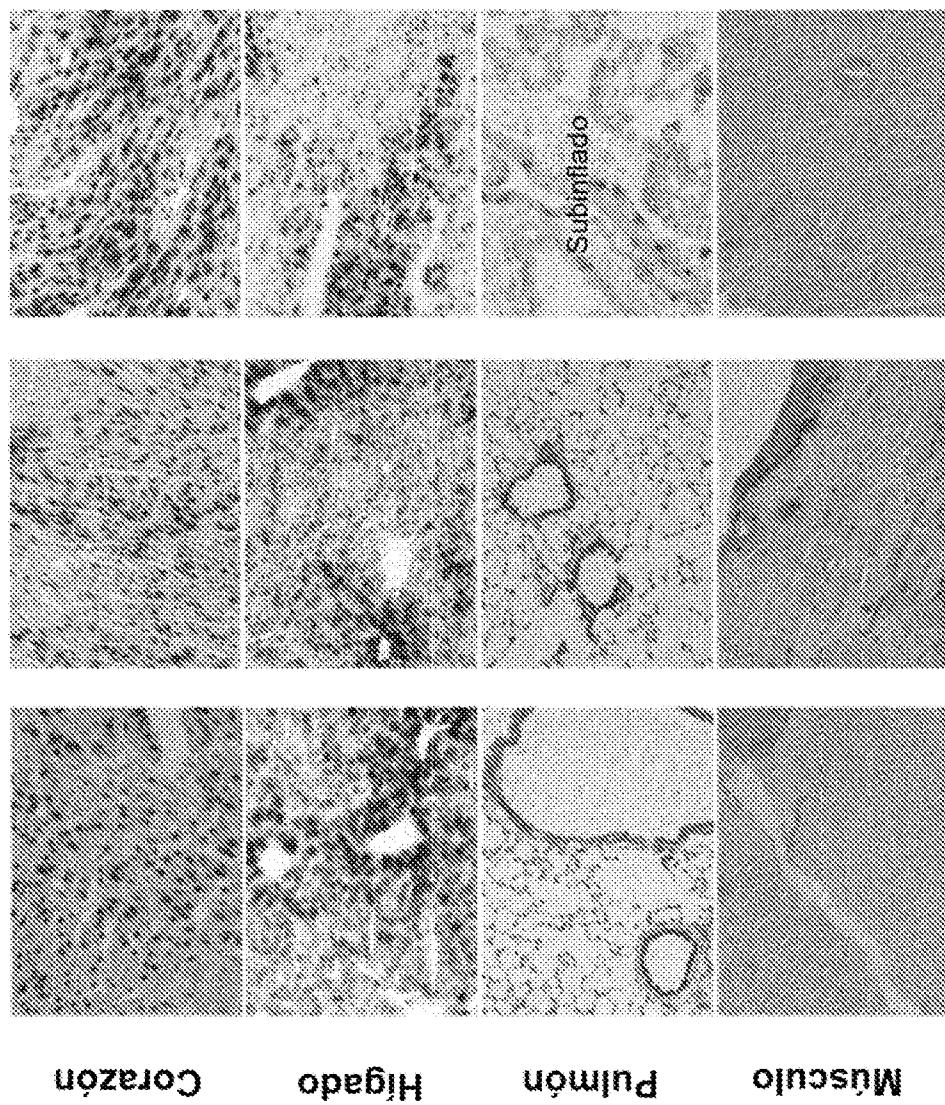


FIG. 4B

$5 \times 10^{11}$  CG de AA Vnu68.CB7.mLacZ, administración IM, ratón

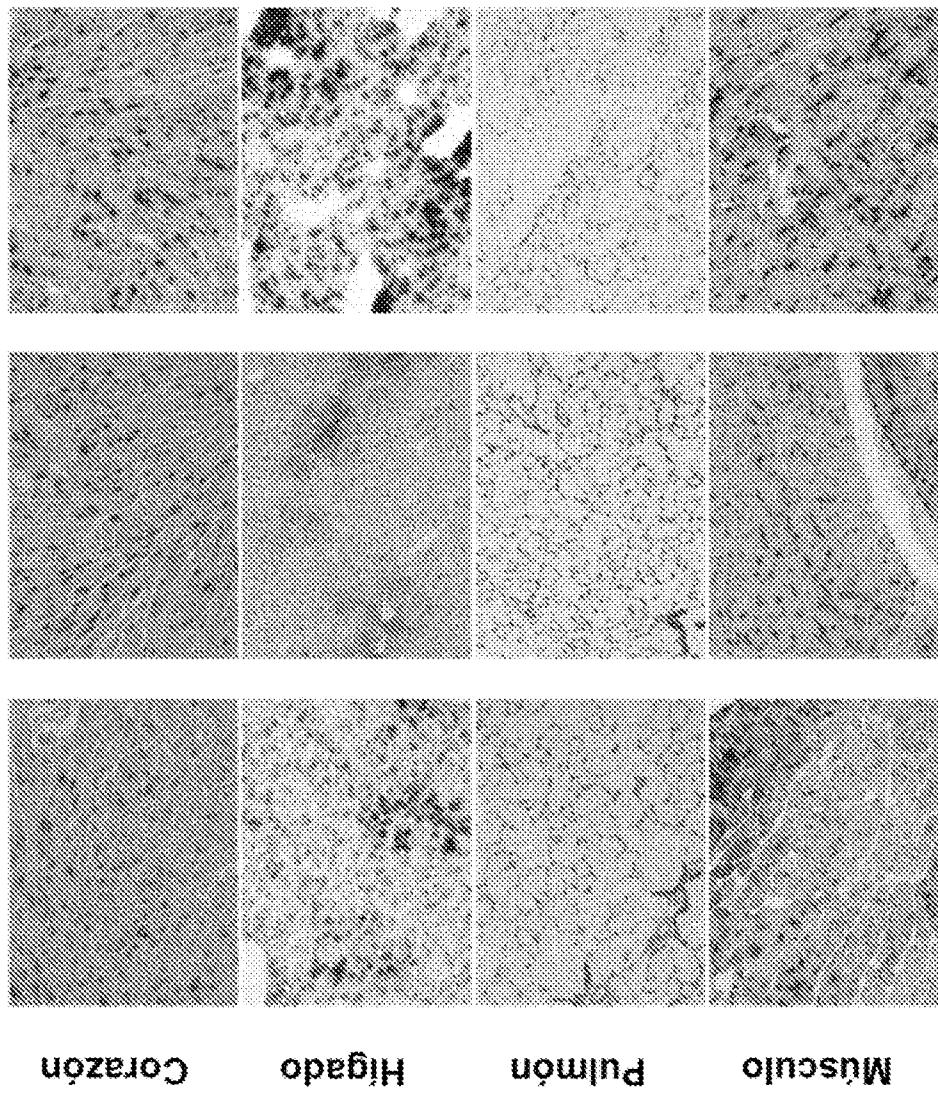


FIG. 4C

gX 10<sup>11</sup> CG de AA Vhuc88.C87.nlacZ, administración IV, ratón

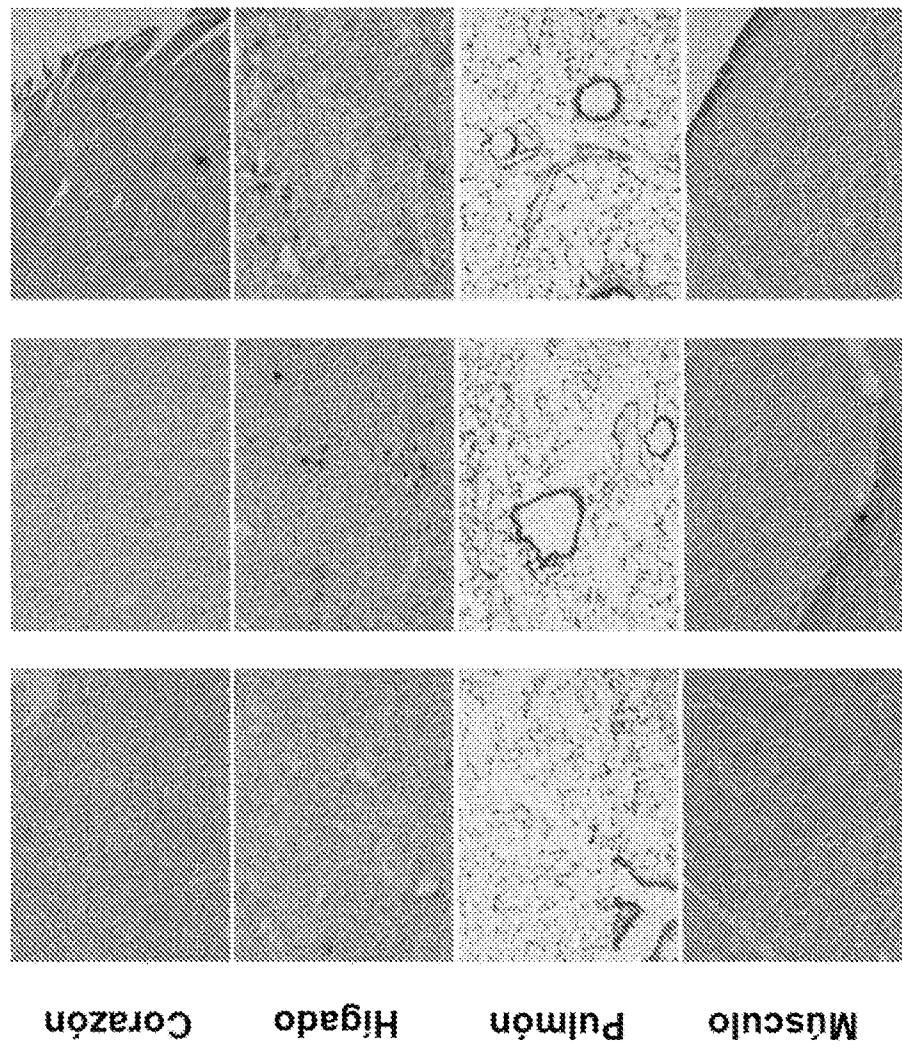


FIG. 5A

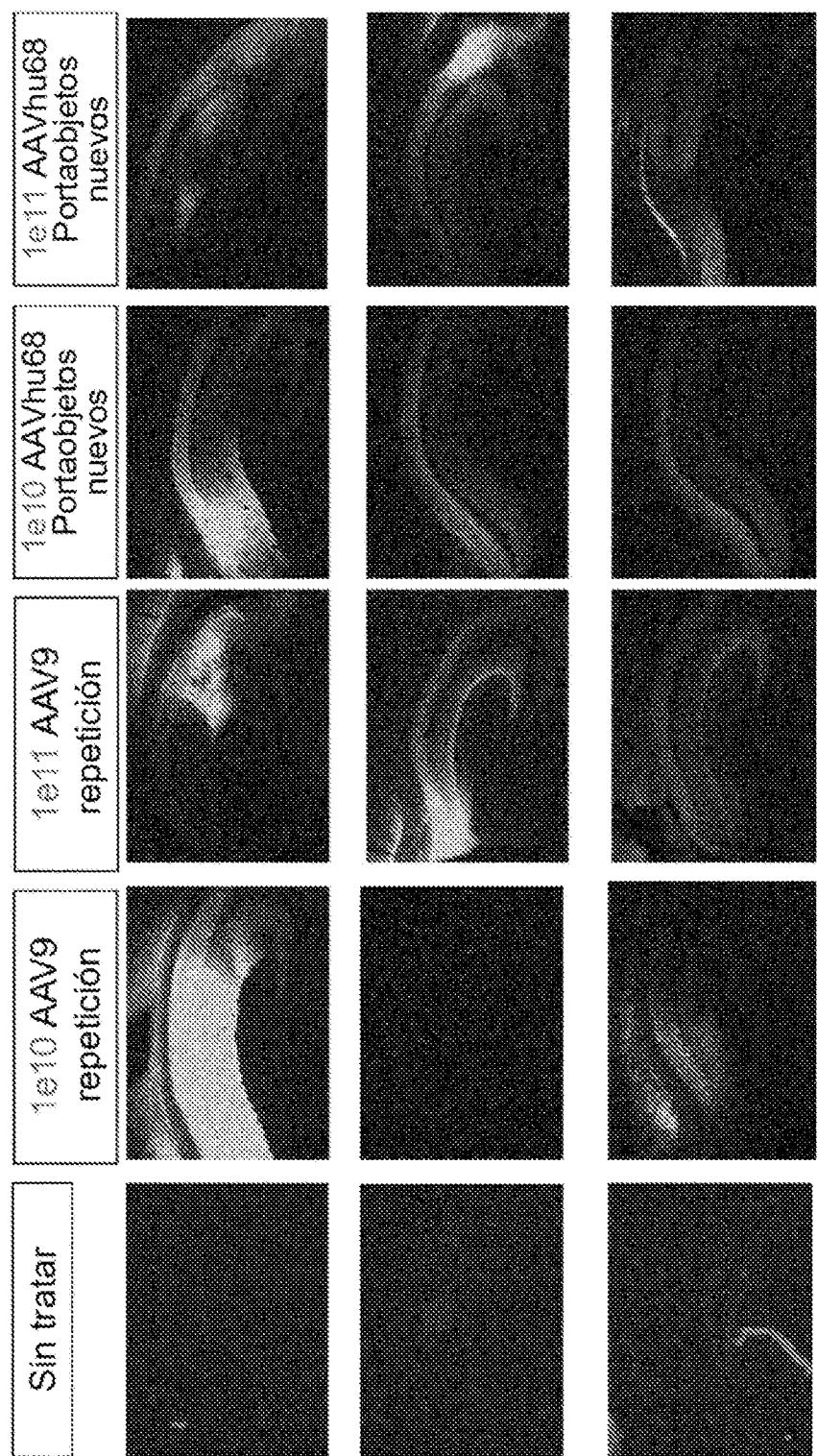


FIG. 5B

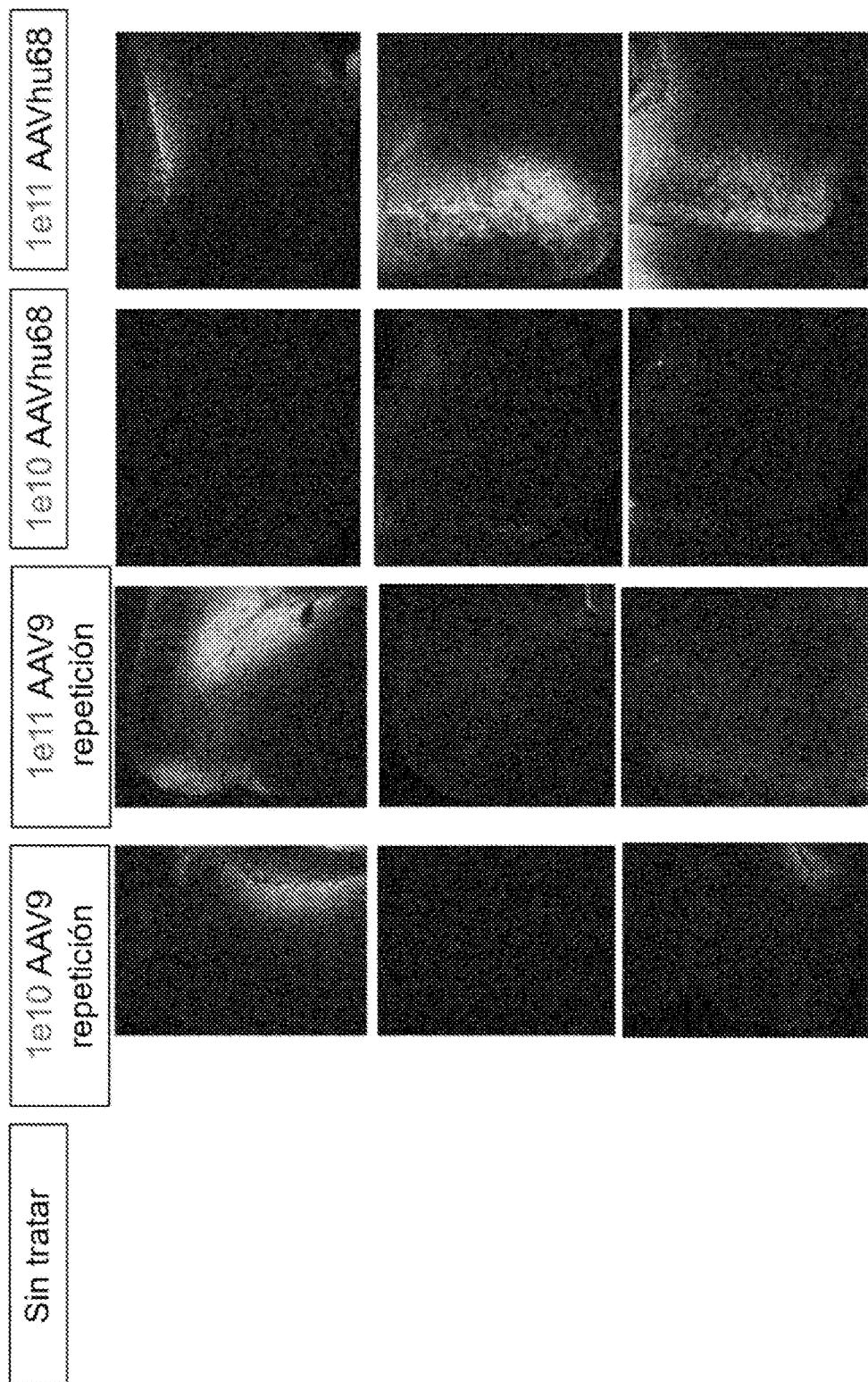


FIG. 5C

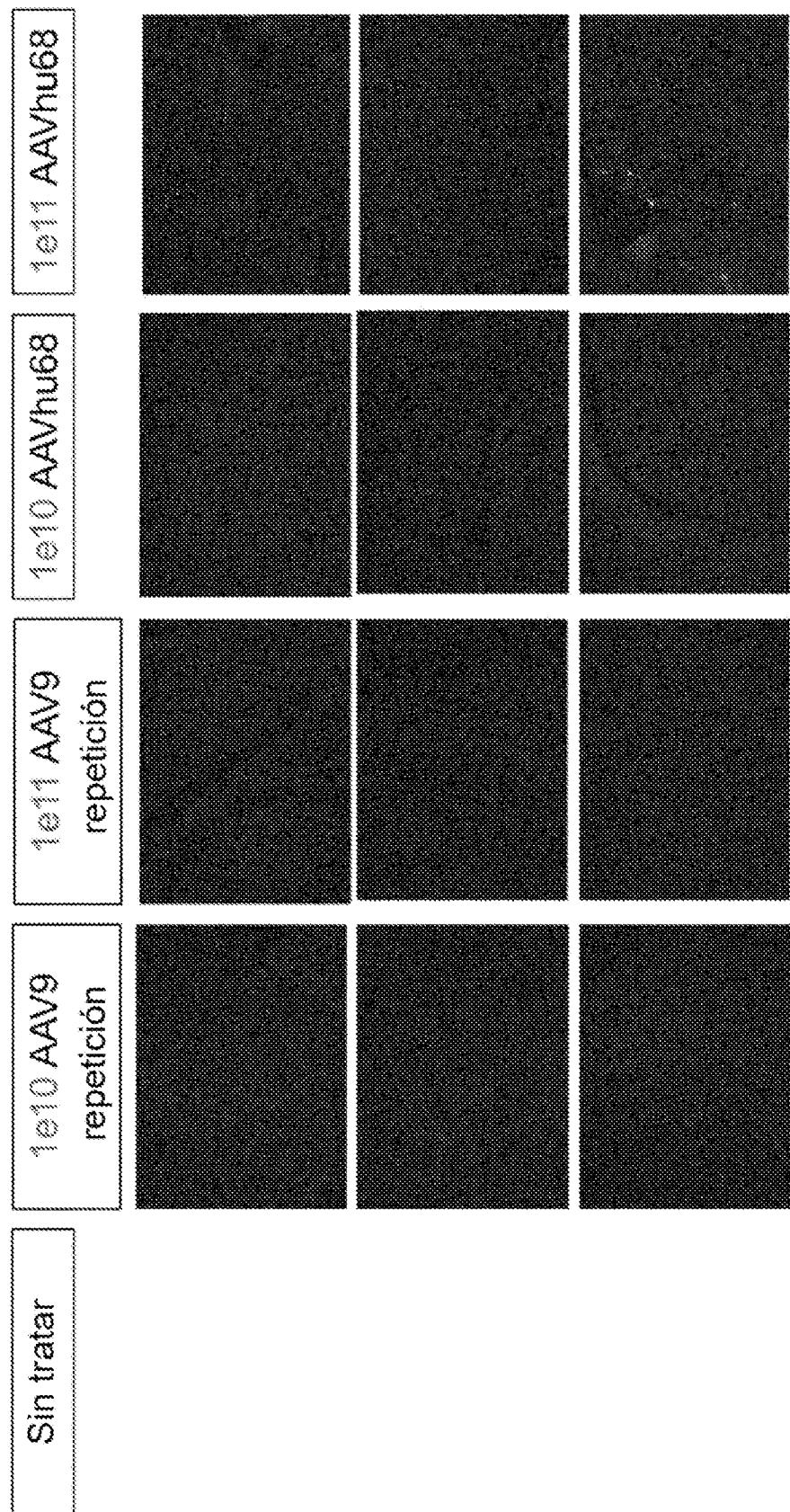


FIG. 6A

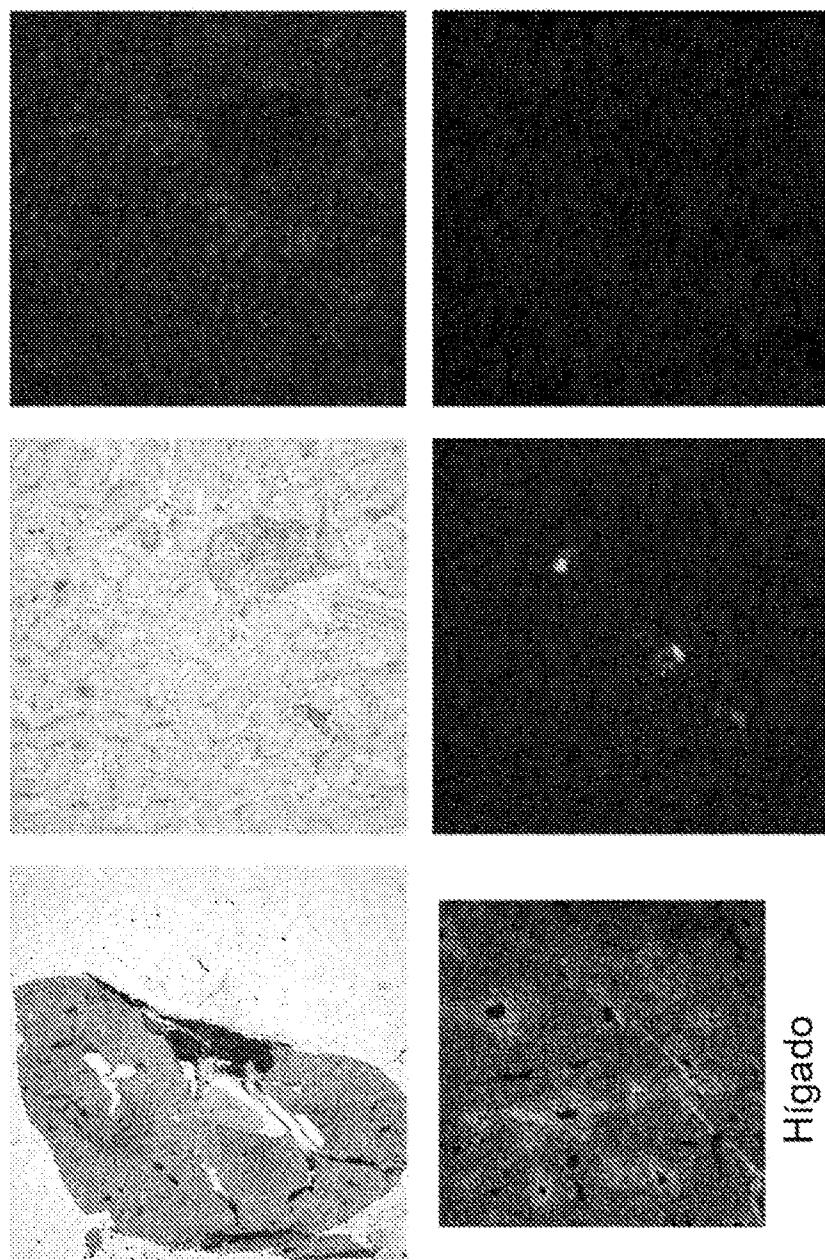


FIG. 6B

Riñón



Corazón

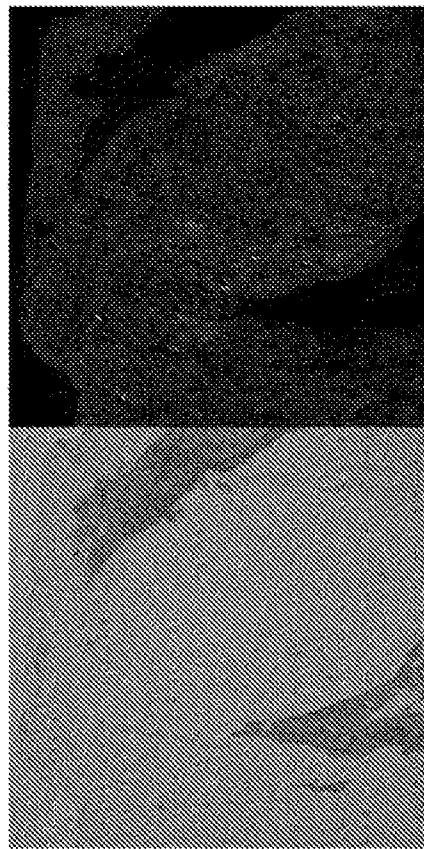


FIG. 6C

Páncreas

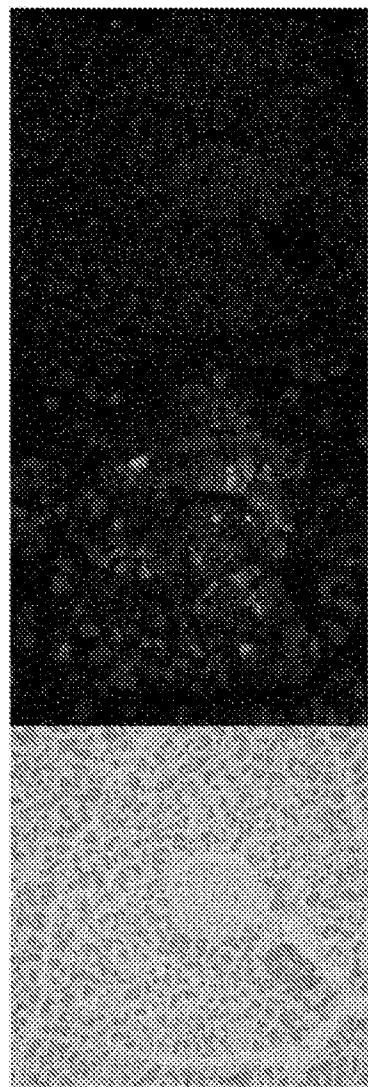


FIG. 6D

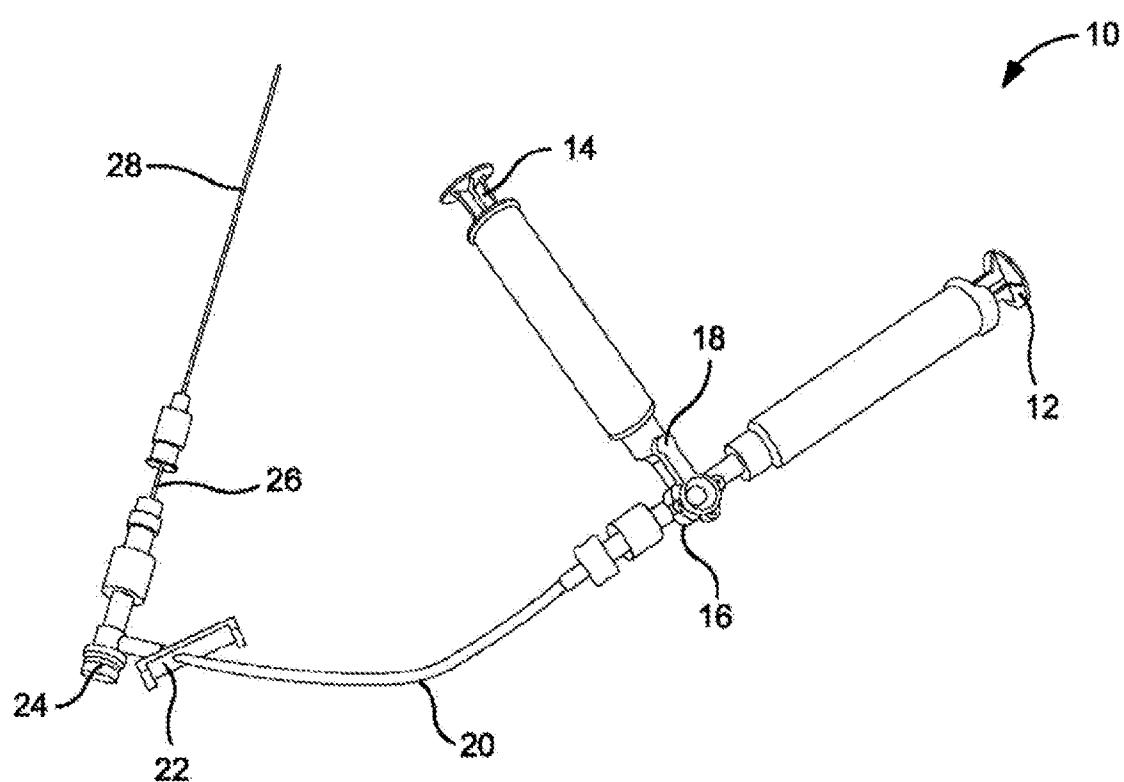
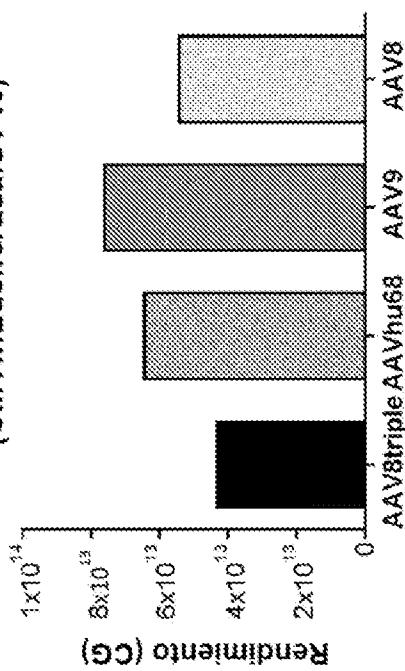


FIG 7

**FIG. 8A**

Rendimiento de preparaciones  
a pequeña escala  
(CMV.fflLuciferasa.SV40)



**FIG. 8B**

Rendimiento de preparaciones  
a mega escala  
(CMV.P1.2011g IA.SV40)

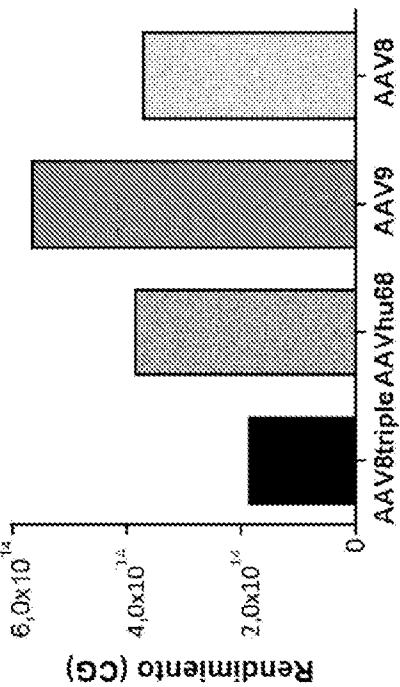


FIG. 9

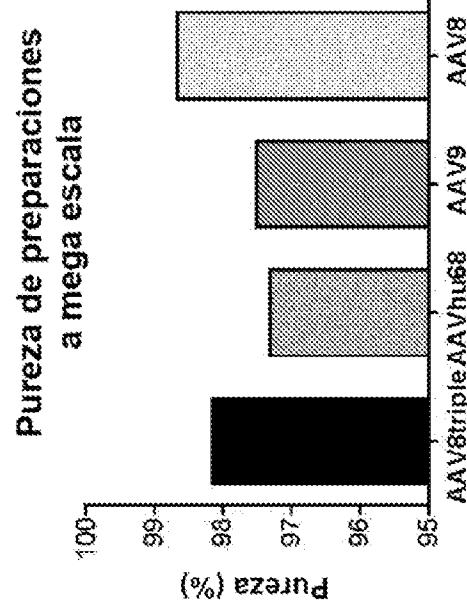


FIG. 10A  
 $3 \times 10^{11}$  CG/ratón

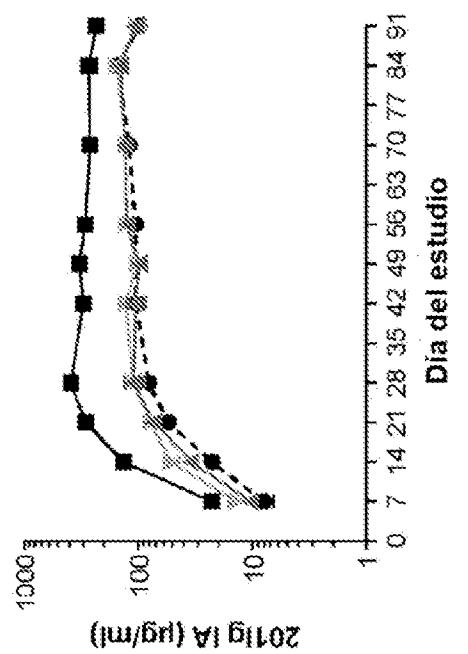
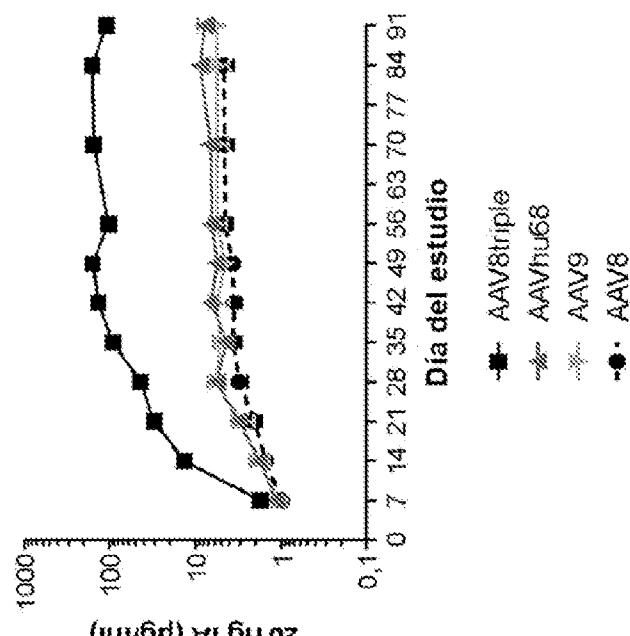
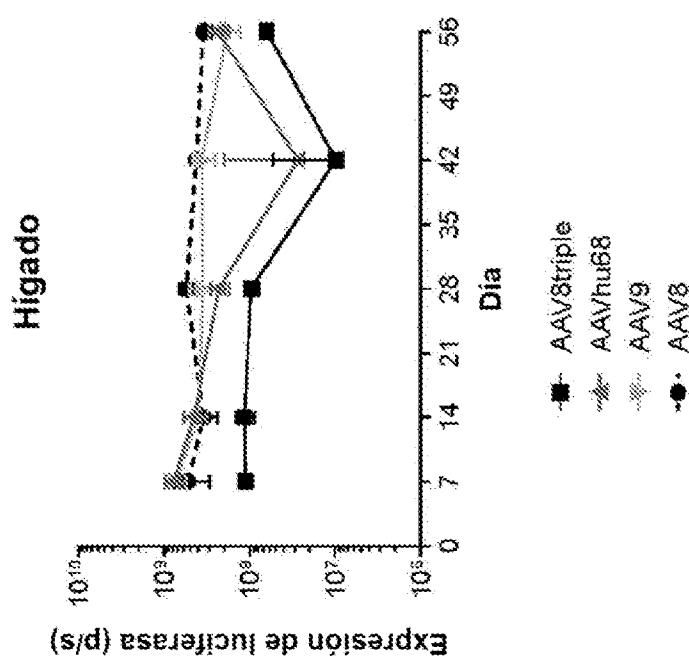


FIG. 10B  
 $3 \times 10^{10}$  CG/ratón



**FIG. IIIA**



**FIG. IIIB**

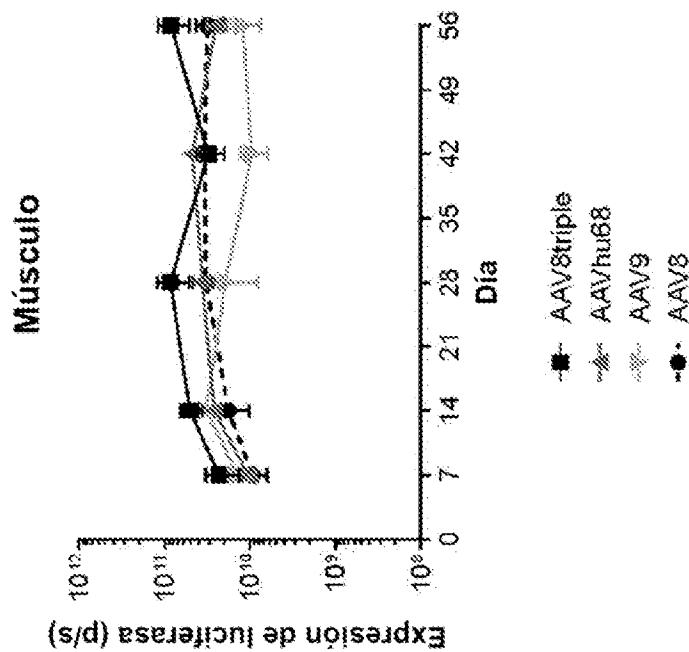


FIG 12

