

ENFOQUE DE TERAPIA GÉNICA CON AAV PARA EL TRATAMIENTO DE LGMD2B/DISFERLINOPATÍA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de
5 disferlinopatías.

ANTECEDENTES

Las mutaciones en el gen de la disferlina humana (DYSF) causan distrofias
musculares autosómicas recesivas caracterizadas por la degeneración y debilidad de los
músculos proximales y/o distales: distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD2B) y
10 miopatía de Miyoshi (MM). La mayoría de las mutaciones en DYSF provocan la ausencia
o una reducción grave de la cantidad de proteína disferlina presente en las células
musculares.

La falta de disferlina en las células musculares provoca la falta de reparación de las
fibras musculares y, finalmente, la muerte de las células musculares. La mayoría de las
15 personas con disferlinopatía requieren asistencia en silla de ruedas entre 10 y 20 años
después de la aparición de la debilidad muscular. Las tareas cotidianas, como ponerse de
pie desde una posición sentada, pueden volverse muy difíciles o casi imposibles.

La disferlinopatía no tiene cura y pocos tratamientos son efectivos. A menudo se
requiere fisioterapia simplemente para conservar la fuerza y la movilidad muscular el
20 mayor tiempo posible. A medida que los músculos se deterioran, puede ser necesario un
respirador para facilitar la respiración.

SUMARIO

La presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de
disferlinopatías que superan los límites de capacidad de empaquetamiento de los vectores
25 virales adenoasociados (AAV). Los aspectos de la invención proporcionan una
composición que comprende una primera molécula de ácido nucleico y una segunda
molécula de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica una porción separada de la
proteína disferlina y una inteína. Por ejemplo, la primera molécula de ácido nucleico puede
comprender una secuencia que codifica una primera porción de la proteína disferlina y una
30 primera porción de una inteína dividida, y la segunda molécula de ácido nucleico puede
comprender una secuencia que codifica una segunda porción de la proteína Disferlina y una

segunda porción de una inteína dividida. La primera molécula de ácido nucleico y la segunda molécula de ácido nucleico respectivamente codifican porciones diferentes de la proteína disferlina que forman una proteína disferlina funcional fusionándose mediante empalme de proteínas.

5 Convenientemente, cada ácido nucleico puede empaquetarse en un vector viral, por ejemplo, un vector de AAV.

Los vectores AAV típicos tienen una capacidad de empaquetamiento de aproximadamente 4,7 Kb. Los ácidos nucleicos se empaquetan casi universalmente con dos ITR terminales, cada una de aproximadamente 0,14 Kb de longitud. Además, los elementos reguladores, como el promotor, el intrón y los elementos poli(A), pueden tener entre 0,6 y 1 Kb. Como resultado de ello, la longitud máxima permitida del ADNc debe ser inferior a 3,8 Kb. Las terapias genéticas están restringidas por el límite de capacidad de empaquetamiento de los vectores virales adenoasociados (AAV). Como consecuencia, el tamaño de la secuencia codificante de DYSF (~6243 pb) impide el empaquetamiento del transgén en los serotipos tradicionales de AAV, incluido el AAV9. Los enfoques transgénicos mediados por AAV de doble vector proponen la expresión de partes de una proteína de vectores separados, seguida de recombinación homóloga o transempalme de ARN. Sin embargo, estos enfoques son ineficaces en el músculo esquelético. Sin limitarse a un mecanismo de acción, se cree que esto se debe a que requieren que ambos vectores AAV entren en el mismo núcleo, donde se produce el empalme del ARN y la recombinación homóloga. Dado que hay cientos de núcleos en cada fibra muscular, la eficiencia de la recombinación homóloga en los tejidos postmitóticos (por ejemplo, el músculo esquelético) es extremadamente baja.

25 Sin limitarse a un mecanismo de acción, los aspectos de la presente invención superan estas limitaciones al permitir que cada porción de la proteína disferlina se exprese en diferentes núcleos de células multinucleadas. Una vez expresadas, las dos porciones de la proteína disferlina pueden unirse mediante el empalme de las inteínas respectivas en el citoplasma de las células musculares. El empalme de las inteínas en el citoplasma da como resultado la formación de una proteína disferlina funcional.

30 En aspectos proporcionados por la invención, la primera porción de la proteína disferlina puede tener entre 1100 y 1150 aminoácidos de longitud. La segunda porción de la proteína disferlina puede tener entre 930 y 980 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la primera porción de la proteína disferlina puede comprender los dominios C2A-C2C, Fer, y los dominios dysF del gen DYSF y la segunda porción de la proteína disferlina puede

comprender los dominios C2D-C2G, así como el dominio transmembrana. La proteína disferlina se puede dividir entre los aminoácidos 1100 y 1136, contados desde el extremo N de la proteína disferlina.

5 En los aspectos de la invención, la primera molécula de ácido nucleico puede empaquetarse en un primer vector y la segunda molécula de ácido nucleico se empaqueta en un segundo vector. Cada vector puede ser un vector viral adenoasociado (AAV). La primera molécula de ácido nucleico puede comprender, en orden, una región ITR un promotor, la secuencia que codifica una primera porción de la proteína disferlina, la primera inteína, una región ITR. La segunda molécula de ácido nucleico puede comprender, en
10 orden, una región ITR, un promotor, la segunda inteína, la secuencia que codifica una segunda porción de la proteína disferlina, una región ITR. En consecuencia, la primera molécula de ácido nucleico puede tener una inteína N-terminal a la secuencia que codifica la primera porción de la proteína disferlina y la segunda molécula de ácido nucleico puede tener una inteína C-terminal a la secuencia que codifica la segunda porción de la proteína
15 disferlina.

Además, convenientemente, cada vector de AAV puede comprender una proteína de la cápside que tiene al menos una modificación que da como resultado un tropismo hepático reducido del vector de AAV y/o un direccionamiento preferencial del vector de AAV al tejido muscular. Por ejemplo, el vector de AAV puede comprender una proteína
20 de la cápside seleccionada entre las secuencias de las Tablas 1-4.

La presente invención también proporciona métodos para tratar a un sujeto que padece una disferlinopatía que comprende proporcionar al sujeto una composición que comprende una primera molécula de ácido nucleico y una segunda molécula de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica una porción separada de la proteína disferlina y
25 una inteína. La disferlinopatía puede ser cualquier disferlinopatía, por ejemplo, miopatía de Miyoshi (MM), distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD2B) y síndrome escapuloperoneal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La Figura 1 es un diagrama que ilustra los métodos de la invención.

La Figura 2 es una estructura cristalina para la disferlina.

La Figura 3 es un diagrama de la proteína disferlina y sus dominios.

La Figura 4 es un diagrama de las moléculas de ácido nucleico de la invención.

La Figura 5 es un Western blot de células transfectadas con plásmidos de disferlina-inteína utilizando un anticuerpo anti-etiqueta HA.

La Figura 6 es un Western blot de células transfectadas con plásmidos de disferlina-inteína utilizando un anticuerpo anti-etiqueta FLAG.

5 La Figura 7 es un diagrama de las moléculas de ácido nucleico de la invención donde la disferlina-inteína se expresa bajo el control de un promotor CK8 específico del músculo..

La Figura 8 es un western blot de miotubos C2C12 transducidos con AAV-disferlina-inteína utilizando un anticuerpo anti-etiqueta HA.

10 La Figura 9 es un western blot de miotubos C2C12 transducidos con AAV-disferlina-inteína utilizando un anticuerpo anti-etiqueta FLAG.

La Figura 10 es un western blot de miotubos C2C12 deficientes en disferlina transducidos con AAV-disferlina-inteína utilizando un anticuerpo anti-etiqueta HA.

15 La Figura 11 es un western blot de miotubos C2C12 deficientes en disferlina transducidos con AAV-disferlina-inteína utilizando un anticuerpo anti-etiqueta FLAG.

La Figura 12 es un western blot de la expresión de disferlina en ratones BLA/J *in vivo* luego de la administración de AAV-disferlina-inteína utilizando un anticuerpo N-terminal anti-disferlina.

20 La Figura 13 es un gráfico de barras de la expresión de disferlina en ratones BLA/J *in vivo* luego de la administración de AAV-disferlina-inteína.

La Figura 14 es un western blot de la expresión de disferlina en ratones BLA/J *in vivo* luego de la administración de AAV-disferlina-inteína utilizando un anticuerpo C-terminal anti-disferlina.

25 La Figura 15 es un gráfico de barras de la expresión de disferlina en ratones BLA/J *in vivo* luego de la administración de AAV-disferlina-inteína.

La Figura 16 es un esquema de la estrategia de división de la inteína.

La Figura 17 es un western blot de las disferlina-inteínas.

La Figura 18A-B muestra los resultados de la electroforesis capilar luego de la transducción de inteína dividida en miotubos de ratón.

30 La Figura 19A-D muestra la expresión de disferlina en ratones deficientes tras la administración del vector.

La Figura 20 muestra imágenes de la expresión de la proteína disferlina en el músculo tibial anterior luego de la administración del vector.

La Figura 21 muestra imágenes de la reparación de membrana en ratones luego de la administración del vector.

La Figura 22A-B son gráficos que muestran la cuantificación de la reparación de la membrana en ratones luego de la administración del vector.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de disferlinopatías que superan los límites de capacidad de empaquetamiento de los vectores virales adenoasociados (AAV). Los aspectos de la invención proporcionan una composición que comprende una primera molécula de ácido nucleico y una segunda molécula de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica una porción separada de la proteína disferlina y una inteína. Por ejemplo, la primera molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia que codifica una primera porción de la proteína disferlina y una primera porción de una inteína dividida y la segunda molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia que codifica una segunda porción de la proteína disferlina y una segunda porción de una inteína dividida. La primera molécula de ácido nucleico y la segunda molécula de ácido nucleico respectivamente codifican porciones diferentes de la proteína disferlina que forman una proteína disferlina funcional cuando se fusionan mediante empalme de proteínas.

La presente invención permitió descubrir que la disferlina puede empaquetarse y reconstituirse mediante empalme transinteínico. La presente invención reconoce que el empalme transinteínico de proteínas grandes suele ser imposible. Por ejemplo, se ha intentado el trans-empalme de proteínas mediado por inteína para reconstituir la distrofina en el músculo y el canal de calcio tipo L en los cardiomiocitos, sin embargo estos intentos han tenido una eficacia limitada. Véase, por ejemplo, Tornabene (2019) “Intein-mediated protein trans-splicing expands adeno-associated virus transfer capacity in the retina”, *Sci Transl Med.* 11(492), que se incorpora por completo a la presente como referencia. El diseño de la construcción debe tener en cuenta los puntos de unión de los residuos de aminoácidos necesarios para el empalme y la división eficientes de las proteínas fuera de los dominios estructurales para evitar el plegamiento incorrecto de los polipéptidos.

La Figura 1 es un diagrama que ilustra los métodos de la invención. Conforme lo ilustrado, una primera molécula de ADN codifica una porción N-terminal de la proteína disferlina con una porción N-terminal de una inteína dividida y una segunda molécula de ADN codifica una porción C-terminal de la proteína disferlina con una porción C-terminal

de una inteína dividida. Luego de la transcripción del ADN, se generan polipéptidos precursores que tienen la porción N-terminal de la proteína disferlina fusionada con la porción N-terminal de la inteína dividida, y la porción C-terminal de la proteína disferlina fusionada con la porción C-terminal de la inteína dividida. Los polipéptidos precursores se unen en sus respectivos sitios de inserción de inteínas y luego las inteínas se empalman dejando la proteína madura de longitud completa. Convenientemente, el empalme de las inteínas puede ocurrir dentro del citoplasma de las células, sin estar restringido al procesamiento en el núcleo.

La Figura 2 es una estructura cristalina para disferlina que muestra un ejemplo de sitio de la invención para dividir la disferlina.

La Figura 3 es un diagrama de la proteína disferlina y sus dominios que ilustra un ejemplo de sitio de la invención para dividir la disferlina.

Como lo indican las flechas respectivas, la proteína disferlina puede dividirse entre los aminoácidos 1100 y 1136, contados desde el extremo N-terminal. Según lo ilustrado, esta región de la proteína está expuesta superficialmente y presenta un desorden estructural.

Disferlinopatías

La disferlina es una proteína codificada por el gen DYSF en humanos. La disferlina está relacionada con la estabilización de la señalización del calcio y la reparación de las fibras musculares. Los defectos en el gen DYSF pueden provocar varios tipos de distrofia muscular, conocidos como disferlinopatías. Las disferlinopatías se caracterizan por una progresión lenta de debilidad y atrofia o desgaste muscular. Las disferlinopatías incluyen la miopatía de Miyoshi (MM), generalmente caracterizada por defectos en los músculos de las piernas distales cerca de los pies, la distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD2B), caracterizada por defectos en los músculos de las cinturas pélvica y escapular, y el síndrome escapuloperoneal, donde la debilidad y la atrofia afectan tanto a las piernas distales como a los músculos de la cintura escapular.

La proteína disferlina humana es una proteína transmembrana tipo II de 237 kilodaltons (2080 aa). El dominio citosólico de la disferlina está compuesto por siete dominios C2 altamente conservados (C2A-G). La disferlina además contiene los dominios “Fer” y “dysF” entre los dominios C2C y C2D. Las mutaciones en cada uno de estos dominios pueden causar disferlinopatía.

Vectores de virus adenoasociados

Los AAV son vectores virales especialmente apropiados para la administración de material genético a células de mamíferos. No se sabe que causen enfermedades en mamíferos y provocan una respuesta inmunitaria muy leve. Además, los AAV pueden infectar las células en múltiples etapas, ya sea en reposo o en una fase del ciclo de replicación celular. Convenientemente, el ADN de un AAV no se inserta regularmente en el genoma del huésped en sitios aleatorios, lo que reduce las propiedades oncogénicas de este vector.

Los AAV se han modificado para brindar una variedad de tratamientos, especialmente para trastornos genéticos causados por polimorfismos de un solo nucleótido (“SNP”). Las enfermedades genéticas que se han estudiado junto con los vectores AAV incluyen la fibrosis quística, la hemofilia, la artritis, la degeneración macular, la distrofia muscular, la enfermedad de Parkinson, la insuficiencia cardíaca congestiva y la enfermedad de Alzheimer. El AAV se puede utilizar como vector para administrar un ácido nucleico modificado a un huésped y utilizar los propios ribosomas del huésped para transcribir ese ácido nucleico en las proteínas deseadas. Véase, por ejemplo, West et al., *Virology* 160:38-47 (1987); Patente Estadounidense Número 4.797.368; WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); y Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994). Los AAV tienen cierta deficiencia en su replicación y/o patogenicidad y, por lo tanto, pueden ser más seguros que los vectores adenovirales. En algunas formas de realización, el AAV puede integrarse en un sitio específico en el cromosoma 19 de una célula humana sin efectos secundarios observables. En algunas formas de realización, la capacidad del vector de AAV, su sistema y/o las partículas de AAV pueden alcanzar aproximadamente 4,7 kb. El vector de AAV o su sistema puede incluir uno o más polinucleótidos de cápside modificados descritos en la presente.

Los AAV son virus pequeños, sin envoltura y con replicación defectuosa que infectan a humanos y otras especies de primates y tienen un genoma de ADN monocatenario lineal. Los serotipos de AAV presentes de forma natural presentan tropismo hepático. Como resultado de ello, la transfección de tejido no hepático con vectores AAV tradicionales se ve impedida por el tropismo hepático natural del virus. Además, debido a que el hígado actúa para descomponer las sustancias administradas a un sujeto, la transfección de tejido no hepático con vectores AAV no modificados requiere una dosis más alta para proporcionar una carga viral suficiente con el fin de sortear el hígado y llegar al tejido no hepático. Existen más de 30 serotipos naturales de AAV. Existen numerosas

variantes naturales en la cápside de AAV. Los serotipos de AAV incluyen, entre otros, los siguientes: AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV 12, AAV13. Los AAV pueden modificarse mediante técnicas convencionales de biología molecular, lo que permite optimizar estas partículas, por ejemplo, para su administración específica a cada célula, minimizar la inmunogenicidad, ajustar la estabilidad y la vida útil de las partículas, lograr una degradación eficiente y una administración precisa al núcleo. Los vectores AAV pueden dirigirse específicamente a uno o más tipos de células mediante la elección de la combinación adecuada de serotipo, promotor y método de administración.

Los enfoques anteriores para identificar secuencias de AAV correlacionadas con el tropismo se han basado en la comparación de serotipos existentes altamente relacionados con características distintivas, intercambios de dominios aleatorios entre serotipos no relacionados o la consideración de una estructura de orden superior para identificar motivos que definen el tropismo hepático. Por ejemplo, se ha realizado el mapeo de los determinantes del tropismo de los AAV comparando serotipos altamente relacionados. Un ejemplo de ello es el cambio de un solo aminoácido (E531K) entre AAV1 y AAV6 que mejora la transducción hepática murina en AAV1. Véase, Wu et al. (2006) J. Virol., 80(22):11393-7, que se incorpora a la presente como referencia. Otro ejemplo es un intercambio de dominios recíproco entre AAV2 y AAV8 que altera el tropismo, pero no logra definir ningún motivo específico y robusto dirigido a un tejido. Véase, Raupp et al. (201) J. Virol., 86(17):9396-408, que se incorpora a la presente como referencia. Además, la consideración global de la estructura sólo ha resaltado grandes diferencias entre transductores hepáticos mejores o peores que son más observacionales que útiles en la práctica. Nam et al (2007) J. Virol., 81(22):12260-71.

Los AAV que presentan un tropismo tisular modificado que pueden utilizarse con la presente invención están descriptos en la Patente Estadounidense Número 9.695.220. Patente Estadounidense Número 9.719.070; Patente Estadounidense Número 10.119.125; Patente Estadounidense Número 10.526.584; Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense Número 2018-0369414; Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense Número 2020-0123504; Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense Número 2020-0318082; Publicación de Solicitud de Patente Internacional por el PCT Número WO 2015/054653; Publicación de Solicitud de Patente Internacional por el PCT Número WO 2016/179496; Publicación de Solicitud de Patente Internacional por el PCT Número WO 2017/100791; y Publicación de Solicitud de Patente Internacional

por el PCT Número WO 2019/217911, las cuales quedan incorporadas por completo a la presente como referencia.

El vector de AAV o su sistema puede incluir una o más moléculas reguladoras, tales como promotores, potenciadores, represores y similares. En algunas formas de realización, el vector de AAV o su sistema puede incluir uno o más polinucleótidos que pueden codificar una o más proteínas reguladoras. En algunas formas de realización, la o las proteínas reguladoras pueden seleccionarse entre Rep78, Rep68, Rep52, Rep40, variantes de las mismas, y combinaciones de las mismas. En algunas formas de realización, el promotor específico de músculo puede impulsar la expresión de un polinucleótido de la cápside de AAV modificado.

El vector de AAV o su sistema puede incluir uno o más polinucleótidos que pueden codificar una o más proteínas de la cápside, tales como las proteínas de la cápside de AAV modificadas descritas en otras secciones de la presente. Las proteínas de la cápside modificadas pueden ensamblarse en una cubierta proteica (cápside modificada) de la partícula viral AAV. La cápside modificada puede tener un tropismo específico para células, tejidos y/u órganos.

El vector de AAV o su sistema se puede configurar para producir partículas AAV que tengan un serotipo específico. En algunas formas de realización, el serotipo puede ser AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-8, AAV-9 o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el AAV puede ser AAV1, AAV-2, AAV-5, AAV-9 o cualquier combinación de los mismos. Se puede seleccionar el AAV del AAV en función de las células a las que se dirige; por ejemplo, se pueden seleccionar los serotipos AAV 1, 2, 5, 9 o una cápside híbrida AAV-1, AAV-2, AAV-5, AAV-9 o cualquier combinación de los mismos para dirigirse a las células cerebrales y/o neuronales; y se puede seleccionar AAV-4 para dirigirse al tejido cardíaco; y se puede seleccionar AAV-8 para su administración al hígado. Así, en algunas formas de realización, un vector de AAV o un sistema del mismo capaz de producir partículas de AAV capaces de dirigirse al cerebro y/o a las células neuronales se puede configurar para generar partículas de AAV que tengan los serotipos 1, 2, 5 o una cápside híbrida AAV-1, AAV-2, AAV-5 o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, un vector de AAV o un sistema del mismo capaz de producir partículas de AAV capaces de dirigirse al tejido cardíaco se puede configurar para generar una partícula AAV que tenga un serotipo AAV-4. En algunas formas de realización, un vector de AAV o un sistema del mismo capaz de producir partículas de AAV capaces de dirigirse al hígado se puede

configurar para generar un AAV que tenga un serotipo AAV-8. Véase además Srivastava. 2017. Curr. Opin. Virol. 21:75-80.

Se advertirá que si bien los diferentes serotipos pueden proporcionar cierto nivel de especificidad de células, tejidos y/o órganos, cada serotipo sigue siendo multitrópico y, por lo tanto, puede producir toxicidad tisular si se utiliza ese serotipo para dirigirse a un tejido en el que el serotipo es menos eficiente en la transducción. Por lo tanto, además de lograr cierta capacidad de direccionamiento tisular mediante la selección de un AAV de un serotipo en particular, se apreciará que el tropismo del serotipo de AAV puede modificarse mediante una cápside de AAV modificada descrita en la presente. Conforme lo descripto en otras secciones de la presente, es posible generar variantes de AAV de tipo salvaje de cualquier serotipo a través de un método descrito en la presente y determinar que tienen un tropismo celular específico particular, que puede ser igual o diferente al del serotipo del AAV de tipo salvaje de referencia. En algunas formas de realización, es posible mejorar la célula, el tejido y/o la especificidad del serotipo de tipo salvaje (por ejemplo, se hace más selectivo o específico para un tipo particular de célula hacia el cual el serotipo ya está sesgado). Por ejemplo, el AAV-9 de tipo salvaje está sesgado hacia los músculos y el cerebro en humanos (véase por ejemplo, Srivastava. 2017. Curr. Opin. Virol. 21:75-80.). Al incluir una cápside de AAV modificada y/o una variante de proteína de cápside de AAV-9 de tipo salvaje de acuerdo con la presente, se podría reducir o eliminar el tropismo por las células nerviosas y/o aumentar la especificidad hacia el músculo de tal manera que la especificidad nerviosa parezca reducida en comparación, mejorando así la especificidad por el músculo en comparación con el AAV-9 de tipo salvaje. Según se ha mencionado, la inclusión de una cápside modificada y/o una variante de proteína de la cápside de un serotipo de AAV de tipo salvaje puede tener un tropismo diferente al del serotipo de AAV de referencia de tipo salvaje. Por ejemplo, una cápside de AAV modificada y/o una variante de proteína de la cápside de AAV-9 pueden tener especificidad hacia un tejido distinto del músculo o el cerebro en humanos.

En algunas formas de realización, el vector de AAV es un vector de AAV híbrido o un sistema del mismo. Los AAV híbridos son AAV que incluyen genomas con elementos de un serotipo empaquetados en una cápside derivada de al menos un serotipo diferente. Por ejemplo, si se trata del rAAV2/5 que se va a producir, y si el método de producción se basa en el método de transfección transitoria sin auxiliares analizado anteriormente, el primer plásmido y el tercer plásmido (el plásmido auxiliar adeno) serán los mismos que los analizados para la producción de rAAV2. Sin embargo, el segundo plásmido, pRepCap,

será diferente. En este plásmido, llamado pRep2/Cap5, el gen Rep aún deriva de AAV2, mientras que el gen Cap deriva de AAV5. El esquema de producción es el mismo que el enfoque mencionado anteriormente para la producción de AAV2. El rAAV resultante se denomina rAAV2/5, cuyo genoma se basa en el AAV2 recombinante, mientras que la cápside se basa en el AAV5. Se asume que el tropismo celular o tisular mostrado por este virus híbrido AAV2/5 debería ser el mismo que el del AAV5. Se advertirá que las partículas de AAV híbridas de tipo salvaje sufren los mismos problemas de especificidad que los serotipos de tipo salvaje no híbridos antes analizados.

Las ventajas logradas por los sistemas AAV híbridos basados en tipo salvaje se pueden combinar con la especificidad celular mayor y personalizable que se puede lograr con las cápsides de AAV modificadas y se pueden combinar generando un AAV híbrido que puede incluir una cápside de AAV modificada descrita en otras secciones de la presente. Se apreciará que los AAV híbridos pueden contener una cápside de AAV modificada que contiene un genoma con elementos de un serotipo diferente al serotipo de tipo salvaje de referencia del que la cápside de AAV modificada es una variante. Por ejemplo, es posible producir un AAV híbrido que incluya una cápside de AAV modificada que sea una variante de un serotipo de AAV-9, que se utiliza para empaquetar un genoma que contiene componentes (por ejemplo, elementos rep) de un serotipo de AAV-2. Al igual que con los AAV híbridos de tipo salvaje descritos previamente, el tropismo de la partícula de AAV resultante será el de la cápside de AAV modificada.

En algunas formas de realización, el vector de AAV o sistema del mismo está configurado como un vector “sin tripas”, similar al descrito en relación con un vector retroviral. En algunas formas de realización, el vector de AAV “sin tripas” o sistema del mismo puede tener elementos de ADN viral que actúan en cis involucrados en la amplificación y empaquetamiento del genoma en enlace con las secuencias heterólogas de interés (por ejemplo, los polinucleótidos de la cápside del AAV modificados).

Los vectores descritos en la presente pueden construirse utilizando cualquier proceso o técnica adecuada. En algunas formas de realización, es posible utilizar uno o más métodos o técnicas de recombinación y/o clonación adecuados para los vectores descritos en la presente. Entre las técnicas y/o métodos de recombinación y/o clonación adecuados se incluyen, entre otros, los descritos en la Publicación de la Solicitud de Patente Estadounidense Número US 2004-0171156 A1. En otras secciones de esta memoria se describen otros métodos y técnicas adecuados.

La construcción de vectores de AAV recombinantes está descrita en varias publicaciones, incluidas la Patente Estadounidense Número 5.173.414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); y Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989). Cualquiera de las técnicas y/o métodos puede utilizarse y/o adaptarse para construir un AAV u otro vector descrito en la presente. Los vectores de AAV son analizados en otras secciones de esta memoria.

En algunas formas de realización, el vector puede tener uno o más sitios de inserción, como una secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción (también denominado "sitio de clonación"). En algunas formas de realización, uno o más sitios de inserción (por ejemplo, aproximadamente o más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de inserción) están ubicados aguas arriba y/o aguas abajo de uno o más elementos de secuencia de uno o más vectores.

Los vehículos, vectores, partículas, nanopartículas, formulaciones y componentes de administración de los mismos para la expresión de uno o más elementos de un sistema de cápside de AAV modificada de acuerdo con la presente son los utilizados en los documentos anteriores, como las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional WO 2021/050974 y WO 2021/077000 y la Solicitud Internacional por el PCT Número PCT/US2021/042812, que se incorporan a la presente como referencia.

Otros vectores de AAV están descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2019/2071632, que se incorporan a la presente como referencia.

Otros vectores AAV están descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional WO 2020/086881 y WO 2020/235543, que se incorporan a la presente como referencia.

Otros vectores AAV están descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional WO 2005/033321; WO 2006/110689; WO 2007/127264; WO 2008/027084; WO 2009/073103; WO 2009/073104; WO 2009/105084; WO 2009/134681; WO 2009/136977; WO 2010/051367; WO 2010/138675; WO 2001/038187; WO 2012/112832; WO 2015/054653; WO 2016/179496; WO 2017/100791; WO 2017/019994; WO 2018/209154; WO 2019/067982; WO 2019/195701; WO 2019/217911; WO 2020/041498; WO 2020/210839; Patente Estadounidense Número 7.906.111; Patente Estadounidense Número 9.737.618; Patente Estadounidense Número 10.265.417; Patente Estadounidense Número 10.485.883; Patente Estadounidense Número 10.695.441; Patente Estadounidense Número 10.722.598; Patente Estadounidense Número 8.999.678; Patente Estadounidense

Número 10.301.648; Patente Estadounidense Número 10.626.415; Patente Estadounidense
Número 9.198.984; Patente Estadounidense Número 10.155.931; Patente Estadounidense
Número 8.524.219; Patente Estadounidense Número 9.206.238; Patente Estadounidense
Número 8.685.387; Patente Estadounidense Número 9.359.618; Patente Estadounidense
5 Número 8.231.880; Patente Estadounidense Número 8.470.310; Patente Estadounidense
Número 9.597.363; Patente Estadounidense Número 8.940.290; Patente Estadounidense
Número 9.593.346; Patente Estadounidense Número 10.501.757; Patente Estadounidense
Número 10.786.568; Patente Estadounidense Número 10.973.928; Patente Estadounidense
Número 10.519.198; Patente Estadounidense Número 8.846.031; Patente Estadounidense
10 Número 9.617.561; Patente Estadounidense Número 9.884.071; Patente Estadounidense
Número 10.406.173; Patente Estadounidense Número 9.596.220; Patente Estadounidense
Número 9.719.010; Patente Estadounidense Número 10.117.125; Patente Estadounidense
Número 10.526.584; Patente Estadounidense Número 10.881.548; Patente Estadounidense
Número 10.738.087; Publicación de Patente Estadounidense Número 2011-023353;
15 Publicación de Patente Estadounidense Número 2019-0015527; Publicación de Patente
Estadounidense Número 2020-155704; Publicación de Patente Estadounidense Número
2017-0191079; Publicación de Patente Estadounidense Número 2019-0218574;
Publicación de Patente Estadounidense Número 2020-0208176; Publicación de Patente
Estadounidense Número 2020-0325491; Publicación de Patente Estadounidense Número
20 2019-0055523; Publicación de Patente Estadounidense Número 2020-0385689;
Publicación de Patente Estadounidense Número 2009-0317417; Publicación de Patente
Estadounidense Número 2016-0051603; Publicación de Patente Estadounidense Número
2016-00244783; Publicación de Patente Estadounidense Número 2017-0183636;
Publicación de Patente Estadounidense Número 2020-0263201; Publicación de Patente
25 Estadounidense Número 2020-0101099; Publicación de Patente Estadounidense Número
2020-0318082; Publicación de Patente Estadounidense Número 2018-0369414;
Publicación de Patente Estadounidense Número 2019-0330278; Publicación de Patente
Estadounidense Número 2020-0231986, las cuales quedan incorporadas a la presente como
referencia.

30

Variantes de la cápside de MyoAAV

Tabla: Variantes de la cápside de MyoAAV (eMyoAAV)

Variantes de la cápside de MyoAAV				
RANGO	MOTIVO N-MERO	SEQ ID NO.:	SECUENCIA DE CODIFICACIÓN	SEQ ID NO.:
1	AEGRGDQYTR	177	GCTGAGGGTAGAGGAGACCAGTATACTCGT	181
2	GPGRGDQTTL	178	GGGCCGGGTAGAGGAGACCAGACTACGTTG	182
3	AEGRGDQYTR	177	GCGGAAGGCAGAGGAGACCAATACACAAGG	183
4	ATGRGDLGQA	179	GCGACTGGTAGAGGAGACCTGGGTCAGGCT	184
5	AVARGDQGLI	180	GCGGTGGCGAGAGGAGACCAGGGTCTTATT	185
6	NISRGDQGYQ	6	AACATCTCCAGAGGAGACCAAGGTTACCAA	186
7	APARGDQGSQ	7	GCGCCGGCTAGAGGAGACCAGGGGAGTCAG	187
8	AVSRGDRMEF	8	GCCGTTAGCAGAGGAGACCGGATGGAATTC	188
9	QMGRGDMGIK	10	CAGATGGGTAGAGGAGACATGGGGATTAAG	189
10	EYRRGDKADI	11	GAGTATCGGAGAGGAGACAAGGCGGATATT	190
11	ESRRGDKEPL	12	GAGAGTCGGAGAGGAGACAAGGAGCCGCTG	191
12	AHMRGDLGGT	13	GCACACATGAGAGGAGACCTAGGCGGCACG	192
13	VWQRGDKMDM	14	GTGTGGCAAAGAGGAGACAAAATGGACATG	193
14	SIGRGDTGHM	15	TCTATTGGGAGAGGAGACACGGGTCATATG	194
15	NIARGDAGQY	16	AATATTGCTAGAGGAGACGCTGGTCAGTAT	195
16	AVARGDQGLI	180	GCAGTAGCAAGAGGAGACCAAGGCTTAATC	196
17	SVSRGDQGLH	17	TCGGTCTCGAGAGGAGACCAAGGATTGCAC	197
18	EYRRGDKADI	11	GAATACAGGAGAGGAGACAAAGCAGACATC	198
19	AHMRGDLGGT	13	GCGCATATGAGAGGAGACTTGGGGGGGACT	199
20	QIGRGDITHG	18	CAGATTGGTAGAGGAGACATTACTCATGGG	200
21	EVRRGDLHGT	19	GAAGTCAGAAGAGGAGACTTGCACGGGACA	201
22	SVSRGDVHTM	20	AGTGTCTCAAGAGGAGACGTGCACACGATG	202
23	MVTRGDLGTR	21	ATGGTGACTIONAGAGGAGACCTTGGTACGCGG	203
24	NGGRGDTTHF	22	AACGGCGGGAGAGGAGACACGACGCACTTC	204
25	TMGRGDMNSL	23	ACGATGGGGAGAGGAGACATGAATTCGCTT	205
26	AISRGDQGLS	24	GCGATTAGTAGAGGAGACCAGGGTCTTTCT	206
27	NDARGDKSTY	25	AACGACGCAAGAGGAGACAAATCCACATAC	207
28	VGLRGDLTGS	26	GTGGGGCTGAGAGGAGACTTGACGGGTTCG	208
29	EMRRGDLGTS	27	GAGATGAGGAGAGGAGACCTGGGGACGAGT	209
30	AMSRGDMGMA	28	GCGATGAGTAGAGGAGACATGGGGATGGCG	210
31	ATGRGDLGQA	179	GCAACGGGCAGAGGAGACTTAGGCCAAGCA	211
32	NVARGDQVNY	29	AACGTAGCAAGAGGAGACCAAGTTAACTAC	212
33	SIGRGDTGHM	15	AGCATCGGAAGAGGAGACACCGGCCACATG	213
34	ASVRGDLSGS	30	GCATCCGTAAGAGGAGACCTATCAGGCTCA	214
35	SAARGDTERL	31	AGCGCCGCGAGAGGAGACACTGAACGGCTA	215
36	AMSRGDMGMA	28	GCCATGTCAAGAGGAGACATGGGTATGGCT	216

37	SPSRGDQGRT	9	AGTCCATCGAGAGGAGACCAAGGACGCACT	217
38	VPGRGDLNTM	32	GTGCCTGGGAGAGGAGACCTTAATACTATG	218
39	GPGRGDQTTL	178	GGTCCTGGGAGAGGAGACCAAACGACCCTT	219
40	TSVRGDHGTL	33	ACATCGGTCAGAGGAGACCACGGAACATTG	220
41	TPSRGDLGQT	34	ACGCCTTCGAGAGGAGACCTTGGGCAGACT	221
42	AGHRGDTGVI	35	GCTGGACACAGAGGAGACACAGGAGTCATC	222
43	APARGDQGSM	36	GCGCCGGCGAGAGGAGACCAGGGTAGTATG	223
44	MSLRGDLNGS	37	ATGTCGTTGAGAGGAGACTTGAATGGGTCG	224
45	EAKRGDVHSI	38	GAGGCTAAGAGAGGAGACGTGCATTCTATT	225
46	SAQRGDIVQAV	39	AGTGCTCAGAGAGGAGACGTGCAGGCGGTG	226
47	STARGDQGDR	40	AGTACGGCGAGAGGAGACCAGGGGGATAGG	227
48	QISRGDLGIN	41	CAGATTAGTAGAGGAGACCTGGGGATTAAT	228
49	TFTRGDMTMN	42	ACGTTCAACAAGAGGAGACATGACGATGAAC	229
50	QEGRGDLNMR	43	CAAGAAGGAAGAGGAGACCTGAACATGAGG	230
51	AHARGDTSSL	44	GCACACGCAAGAGGAGACACCAGCTCCCTG	231
52	TNRRGDAGTL	45	ACGAATGGGAGAGGAGACGCTGGGACTCTG	232
53	AFGRGDQGQL	46	GCTTTCGGCAGAGGAGACCAAGGGCAACTA	233
54	ADGRGDRSSL	47	GCTGATGGGAGAGGAGACCGTTCGTCTCTG	234
55	DGRRGDGHSL	48	GACGGACGCAGAGGAGACGGACACAGCCTT	235
56	EKLRGDLHST	49	GAGAAGTTGAGAGGAGACCTTCATTCTGACT	236
57	EARRGDASAM	50	GAGGCGCGTAGAGGAGACGCTTCGGCGATG	237
58	MGTRGDKMDF	51	ATGGGAACGAGAGGAGACAAAATGGACTTC	238
59	STSRGDRESY	52	TCGACTTCGAGAGGAGACCGGGAGTCGTAT	239
60	CQPRGDTTRC	53	TGTCAGCCGAGAGGAGACACGACTCGGTGT	240
61	MHTRGDKMDF	54	ATGCACACGAGAGGAGACAAAATGGACTTC	241
62	YSARGDTSGL	55	TACAGTGCCAGAGGAGACACAAGTGGCCTG	242
63	STMRGDHEKL	56	TCGACGATGAGAGGAGACCATGAGAAGTTG	243
64	TQMRGDGVTL	57	ACCCAAATGAGAGGAGACGGGGTCACACTA	244
65	TTRRGDMGDN	58	ACTACTCGTAGAGGAGACATGGGGGATAAT	245
66	ANRRGDRLEL	59	GCGAATGGTAGAGGAGACAGGCTGGAGTTG	246
67	AVSRGDRMEF	8	GCTGTGTCTAGAGGAGACAGGATGGAGTTT	247
68	ENQRGDLSGR	60	GAGAATCAGAGAGGAGACTTGTCGGGTCGG	248
69	STGRGDLGQA	61	TCGACTGGTAGAGGAGACCTGGGGCAGGCT	249
70	MHTRGDKMDF	54	ATGCATACTAGAGGAGACAAGATGGATTTT	250
71	SSARGDYSEV	62	AGTAGTGCGAGAGGAGACTATAGTGAGGTG	251
72	AFGRGDQGQL	46	GCGTTTGGGAGAGGAGACCAGGGTCAGCTT	252
73	STARGDAATY	63	AGTACGGCGAGAGGAGACGCGGCGACTTAT	253
74	VNTRGDTQKL	64	GTCAACACAAGAGGAGACACTCAAAAATT	254
75	AMSRGDHASL	65	GCGATGAGTAGAGGAGACCATGCGTCGCTT	255
76	QAARGDVNKL	66	CAGGCTGCTAGAGGAGACGTTAATAAGCTG	256
77	RGTRGDTVEL	67	AGGGGTACGAGAGGAGACACGGTTGAGTTG	257
78	TTRRGDMGDN	58	ACCACCCGGAGAGGAGACATGGGAGACAAC	258

79	ASTRGDYAGV	68	GCTAGTACGAGAGGAGACTATGCGGGTGTT	259
80	DDRRGDKLPL	69	GACGACAGGAGAGGAGACAACTGCCCCCTT	260
81	SGSRGDLNAV	70	TCGGGGTCGAGAGGAGACCTGAATGCGGTG	261
82	EYRRGDQQIQ	71	GAGTATAGGAGAGGAGACCAGCAGATTCAG	262
83	TYVRGDRAEV	72	ACGTACGTCAGAGGAGACAGAGCAGAAAGTG	263
84	QSLRGDLNGS	73	CAATCACTAAGAGGAGACTTGAACGGATCC	264
85	EGRRGDTTSL	74	GAGGGTCGGAGAGGAGACACGACGTCGTTG	265
86	AENRGDRSSL	75	GCGGAGAATAGAGGAGACCGGTGAGTTTG	266
87	VAGRGDRSEL	76	GTGGCTGGGAGAGGAGACCGTAGTGAGCTG	267
88	DPARGDIGAR	77	GATCCGGCGAGAGGAGACATTGGTGCGCGT	268
89	EMRRGDLGTS	27	GAAATGCGCAGAGGAGACTTGGGAACCTCA	269
90	VWQRGDKMDM	14	GTTTGGCAGAGAGGAGACAAGATGGATATG	270
91	VIGRGDKALQ	78	GTGATTGGGAGAGGAGACAAGGCGCTTCAG	271
92	SFERGDKNSL	79	AGCTTCGAAAGAGGAGACAAAACTCTCTT	272
93	QIARGDIASV	80	CAGATTGCTAGAGGAGACATTGCTAGTGTG	273
94	TISRGDLGGA	81	ACGATTAGTAGAGGAGACCTGGGTGGGGCT	274
95	AMIRGDMTHS	82	GCGATGATTAGAGGAGACATGACGCATAGT	275
96	TSVRGDHGT	33	ACGAGTGTGAGAGGAGACCATGGGACGCTG	276
97	TMRRGDLNDS	83	ACGATGCGGAGAGGAGACCTGAATGATAGT	277
98	AYSRGDLGNH	84	GCCTACTCCAGAGGAGACCTAGGCAACCAC	278
99	EERRGDTHRL	85	GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGCTG	279
100	SQLRGDAGTI	86	TCACAACTAAGAGGAGACGCGGGGACAATC	280
101	AMVRGDAHQL	87	GCGATGGTGAGAGGAGACGCGCATCAGCTG	281
102	TTSRGDLNSV	88	ACGACTAGTAGAGGAGACTTGAATTCGGTT	282
103	WEQRGDMIGK	89	TGGGAGCAGAGAGGAGACATGATTGGGAAG	283
104	YTTRGDLQSN	90	TACACCACCAGAGGAGACCTCCAATCAAAC	284
105	MSQRGDLSHQ	91	ATGTCGCAGAGAGGAGACCTTTCGCATCAG	285
106	ASTRGDTTHM	92	GCGAGTACTAGAGGAGACACGACGCATATG	286
107	SDTRGDTHRL	93	TCAGACACCAGAGGAGACACCCACAGACTG	287
108	TLGRGDQYTS	94	ACGCTGGGTAGAGGAGACCAGTATACGAGT	288
109	SYARGDVREV	95	TCGTATGCGAGAGGAGACGTTAGGGAGGTT	289
110	ETRRGDLSQN	96	GAGACTCGTAGAGGAGACCTGAGTCAGAAT	290
111	TIGRGDLMDK	97	ACAATCGGGAGAGGAGACCTGATGGACAAA	291
112	SYTRGDLSQN	98	AGTTACACCAGAGGAGACCTTAGCCAAAAC	292
113	SKLRGDASEI	99	TCGAAGCTGAGAGGAGACGCTAGTGAGATT	293
114	SMARGDKAEI	100	TCGATGGCGAGAGGAGACAAGGCGGAGATT	294
115	GAVRGDHSSL	101	GGAGCCGTCAGAGGAGACCACTCATCGTTA	295
116	METRGDMSNR	102	ATGGAGACGAGAGGAGACATGAGTAATCGT	296
117	AYTRGDKDAL	103	GCGTACACAAGAGGAGACAAAGACGCACTA	297
118	ENRRGDITQS	104	GAGAATCGGAGAGGAGACATTACGCAGTCG	298
119	STGRGDLGQA	61	TCCACGGGCAGAGGAGACCTTGACAAGCA	299
120	GAVRGDHSSL	101	GGTGCTGTTAGAGGAGACCATAGTAGTCTT	300

121	SQLRGDAGTI	86	TCTCAGCTTAGAGGAGACGCTGGTACGATT	301
122	MLLRGDKNDF	105	ATGCTCCTAAGAGGAGACAAAAACGACTTC	302
123	KVQRGDASDW	106	AAGGTGCAGAGAGGAGACGCGAGTGATTGG	303
124	AFTRGDMQTA	107	GCGTTTACGAGAGGAGACATGCAGACTGCT	304
125	QPKRGDVQAQ	108	CAGCCTAAGAGAGGAGACGTTCCAGGCTCAG	305
126	ASLRGDMGVS	109	GCTAGTCTGAGAGGAGACATGGGGGTGAGT	306
127	AYSRGDKESF	110	GCCTACTCCAGAGGAGACAAAGAATCGTTC	307
128	RFQRGDLTDA	111	CGGTTCCAAAGAGGAGACTTGACCGACGCT	308
129	SDARGDTMKL	112	TCTGATGCTAGAGGAGACACGATGAAGCTG	309
130	SGARGDTVSL	113	AGCGGGGCCAGAGGAGACACAGTAAGTCTC	310
131	DEKRGDQKHL	114	GATGAGAAGAGAGGAGACCAGAAGCATCTT	311
132	NGVRGDVQNF	115	AACGGAGTAAGAGGAGACGTCCAAAACTTC	312
133	MTLRGDLGGS	116	ATGACGTTGAGAGGAGACCTGGGTGGGTCG	313
134	EARRGDASAM	50	GAGGCTAGGAGAGGAGACGCTAGTGCGATG	314
135	GQERGDLGTR	117	GGGCAGGAGAGAGGAGACCTGGGGACTCGG	315
136	RGARGDLVDA	118	AGAGGCGCCAGAGGAGACCTAGTCGACGCT	316
137	QYSRGDHTDL	119	CAATACTCCAGAGGAGACCACACCGACCTT	317
138	MNTRGDVHAM	120	ATGAACACCAGAGGAGACGTGCACGCTATG	318
139	TVRRGDLATE	121	ACGGTACGGAGAGGAGACCTAGCAACCGAA	319
140	NIARGDAGQY	16	AATATTGCGAGAGGAGACGCTGGTCAGTAT	320
141	SVGRGDKADI	122	TCTGTTGGGAGAGGAGACAAGGCTGATATT	321
142	SHNRGDTGTM	123	TCACACAACAGAGGAGACACCGGAACCATG	322
143	TNTRGDKESV	124	ACGAACACCAGAGGAGACAAAGAATCAGTA	323
144	SIGRGDQYTI	125	TCGATTGGTAGAGGAGACCAGTATACGATT	324
145	QTSRGDAGSW	126	CAGACGAGTAGAGGAGACGCGGGGTCTTGG	325
146	AENRGDRSSL	75	GCTGAAAACAGAGGAGACCGAAGCAGCCTA	326
147	AISRGDVQSL	127	GCGATTTTCGAGAGGAGACGTTTCAGTCGTTG	327
148	NAQRGDHGQL	128	AACGCACAAAGAGGAGACCACGGGCAACTG	328
149	LNSRGDQASV	129	CTCAACTCGAGAGGAGACCAAGCCTCCGTC	329
150	SGNRGDIGTF	130	TCGGGAAACAGAGGAGACATAGGTACATTC	330
151	NVGRGDQATM	131	AACGTGGGAAGAGGAGACCAAGCCACAATG	331
152	SYSRGDTGRL	132	TCGTATTCTAGAGGAGACACTGGTCGGCTT	332
153	SHLRGDQALA	133	AGCCACTTAAGAGGAGACCAAGCGTTGGCC	333
154	YFARGDMTMN	134	TACTTCGCCAGAGGAGACATGACTATGAAC	334
155	QSQRGDLNPM	135	CAGTCGCAGAGAGGAGACCTTAATCCTATG	335
156	EQRRGDKTEL	136	GAGCAGAGGAGAGGAGACAAGACGGAGCTG	336
157	VSARGDAGQL	137	GTGTCTGCGAGAGGAGACGCGGGTCAGTTG	337
158	SPSRGDQGRT	9	TCTCCGTCTAGAGGAGACCAGGGGCGGACG	338
159	EASRGDKGTH	138	GAGGCTAGTAGAGGAGACAAGGGTACGCAT	339
160	LSTRGDMGMQ	139	CTGTCTACTAGAGGAGACATGGGTATGCAG	340
161	ANMRGDQLHT	140	GCGAATATGAGAGGAGACCAGCTGCATACT	341
162	ENTRGDLTHA	141	GAGAATACGAGAGGAGACCTTACTCATGCG	342

163	IERRGDSAGL	142	ATTGAGCGTAGAGGAGACTCGGCGGGGCTG	343
164	SAMRGDGVSL	143	AGTGCGATGAGAGGAGACGGAGTGAGCTTG	344
165	TVSRGDQGLS	144	ACGGTTTCGAGAGGAGACCAGGGGTGTCT	345
166	SIVRGDLNST	145	TCGATCGTCAGAGGAGACCTGAACTCCACG	346
167	DVARGDKTNF	146	GACGTAGCGAGAGGAGACAAAACAACTTC	347
168	WSQRGDLSGT	147	TGGAGCCAAAGAGGAGACCTGAGTGGAACC	348
169	LNQRGDVSNM	148	CTGAACCAAAGAGGAGACGTTTCCAACATG	349
170	AALRGDLSGS	149	GCCGCCCTAAGAGGAGACCTATCCGGCTCA	350
171	RVARGDITDI	150	AGGGTTGCGAGAGGAGACATTACGGATATT	351
172	STNRGDLNQV	151	TCGACGAACAGAGGAGACCTCAACCAAGTT	352
173	DSRRGDSVSL	152	GATTCGCGGAGAGGAGACTCTGTGAGTCTT	353
174	SVGRGDQSQM	153	AGTGTTGGGAGAGGAGACCAGTCTCAGATG	354
175	SNTRGDTNSL	154	TCCAACACGAGAGGAGACACAACTCCCTA	355
176	DNRRGDGTTM	155	GATAATCGGAGAGGAGACGGTACGACTATG	356
177	TPSRGDQGRL	156	ACGCCTTCGAGAGGAGACCAAGGAAGACTA	357
178	NYSRGDSMTL	157	AACTACAGCAGAGGAGACTCAATGACGCTT	358
179	MQARGDAGTL	158	ATGCAGGCTAGAGGAGACGCTGGGACTCTG	359
180	TQSRGDLSGA	159	ACGCAGTCGAGAGGAGACTTGTCTGGTGCG	360
181	FAQRGDLTGV	160	TTTGCGCAGAGAGGAGACTTGACTGGGGTT	361
182	APVRGDLIGT	161	GCGCCGGTGAGAGGAGACCTGATTGGTACG	362
183	SNTRGDTNSL	154	TCGAATACTAGAGGAGACACGAATAGTTTG	363
184	EPKRGDLSNT	162	GAGCCGAAGAGAGGAGACTTGAGTAATACG	364
185	SVGRGDTYPL	163	TCGGTTGGGAGAGGAGACACTTATCCTCTG	365
186	QTARGDMTGH	164	CAAACAGCCAGAGGAGACATGACTGGCCAC	366
187	AGARGDLENR	165	GCTGGTGCGAGAGGAGACTTGAGAAATCGG	367
188	MSTRGDLNNV	166	ATGAGCACTAGAGGAGACCTAAACAACGTC	368
189	EKQRGDLNSM	167	GAAAAACAAAGAGGAGACCTCAACAGCATG	369
190	IKTRGDLGHE	168	ATTAAGACGAGAGGAGACCTTGATCATGAG	370
191	IGRRGDMELS	169	ATTGGGAGGAGAGGAGACATGGAGTTGTCT	371
192	TTGRGDLKEV	170	ACTACGGGTAGAGGAGACTTGAAGGAGGTT	372
193	TDKRGDQNTV	171	ACGGATAAGAGAGGAGACCAGAATACTGTG	373
194	SNVRGDREAV	172	TCGAATGTTAGAGGAGACCGGGAGGCGGTT	374
195	SVGRGDQSQM	153	TCAGTCGGCAGAGGAGACCAAAGTCAAATG	375
196	YANRGDLSHQ	173	TACGCCAACAGAGGAGACCTGAGTCACCAA	376
197	QISRGDLGIN	41	CAAATATCGAGAGGAGACCTAGGTATCAAC	377
198	SMMRGDAGQL	174	TCGATGATGAGAGGAGACGCTGGGCAGTTG	378
199	EARRGDSQGL	175	GAGGCGCGGAGAGGAGACAGTCAGGGGCTG	379
200	MPTRGDQTKF	176	ATGCCCACAAGAGGAGACCAAACCAAATTC	380

Tabla: Variantes de la cápside de MyoAAV mejoradas (eMyoAAV)

Variantes de la cápside de MyoAAV mejoradas (eMyoAAV)				
RANGO	INSERTO N-MERO	SEQ ID NO.:	SECUENCIA DE CODIFICACIÓN	SEQ ID NO.:
1	SNSRGDYNLSL	381	TCAAACCTCCAGAGGAGACTACAACCTCCTTG	557
2	SSARGDRDYL	397	TCGTCTGGCTAGAGGAGACCGTGATTATCTG	558
3	STVRGDYTSV	398	AGCACGGTCAGAGGAGACTACACGTCCGTG	559
4	QERRGDYTSM	382	CAGGAGCGGAGAGGAGACTATACGAGTATG	560
5	NGGRGDTTHF	386	AACGGCGGGAGAGGAGACACGACGCACTTC	561
6	ASTRGDHGVL	383	GCGAGTACTAGAGGAGACCATGGTGTGTTG	562
7	SYQRGDQHNH	399	TCGTACCAAAGAGGAGACCAACACAACATG	563
8	NDTRGDRSYM	400	AACGACACAAGAGGAGACCGATCTTACATG	564
9	ENRRGDFNNT	384	GAAAACAGGAGAGGAGACTTCAACAACACT	565
10	SGSRGDLSGH	401	TCCGGCTCGAGAGGAGACTTGTCAGGACAC	566
11	ENRRGDITQS	393	GAGAATCGGAGAGGAGACATTACGCAGTCG	567
12	DKPRGDRQLL	402	GATAAGCCGAGAGGAGACCGGCAGTTGTTG	568
13	EERRGDTHRL	392	GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGCTG	569
14	AMIRGDMTHS	391	GCGATGATTAGAGGAGACATGACGCATAGT	570
15	SNNRGDYTTM	403	TCAAACAACAGAGGAGACTACACGACAATG	571
16	QGGRGDLSTL	404	CAGGGTGGGAGAGGAGACTTGTCGACGTTG	572
17	SKDRGDYQTL	405	TCGAAGGATAGAGGAGACTATCAGACTCTT	573
18	ATARGDQMKL	406	GCTACGGCGAGAGGAGACCAGATGAAGCTG	574
19	QHMRGDLTGA	407	CAGCATATGAGAGGAGACTTGACTGGTGCG	575
20	DGTRGDLGRY	408	GACGGCACGAGAGGAGACCTTGGAAGGTAC	576
21	DSRRGDYANL	409	GACTCTCGGAGAGGAGACTACGCAAACCTC	577
22	SAMRGDYTST	410	TCGGCGATGAGAGGAGACTATACTAGTACT	578
23	ENRRGDAQLL	411	GAGAATCGGAGAGGAGACGCGCAGCTGCTG	579
24	TTLRGDHSQL	412	ACGACGCTGAGAGGAGACCATAGTCAGCTT	580
25	DAGRGMHRM	413	GACGCAGGGAGAGGAGACATGCACCGTATG	581
26	QHTRGDLSTT	414	CAGCATACGAGAGGAGACTTGAGTTCTACT	582
27	QVYRGDRESV	415	CAAGTTTACAGAGGAGACAGGGAATCCGTG	583
28	SSQRGDLAGT	416	TCGAGTCAGAGAGGAGACTTGCTGGTACT	584
29	TDVRGDRGTF	417	ACGGATGTTAGAGGAGACAGGGGGACGTTT	585
30	SSVRGDREVT	418	TCGTCTGTGAGAGGAGACCGGGAGGTGACG	586
31	ENRRGDLTNA	419	GAGAATAGGAGAGGAGACCTGACTAATGCG	587
32	SYARGDVHSI	420	TCGTATGCGAGAGGAGACGTTCAATTCTATT	588
33	DSSRGDLNLR	421	GACAGCTCAAGAGGAGACCTCAACCTCCGG	589
34	SNARGDYSNM	422	TCGAACGCGAGAGGAGACTACTCAAACATG	590
35	SSVRGDHSVL	423	TCGTCTGTGAGAGGAGACCATTCGGTGCTT	591
36	SAFRGDLHAT	424	TCGGCTTTTAGAGGAGACCTGCATGCTACT	592

37	SAMRGDYTST	410	TCCGCCATGAGAGGAGACTACACAAGCACG	593
38	NAQRGDHGQL	394	AACGCACAAAGAGGAGACCACGGGCAACTG	594
39	SDRRGDQLLY	425	TCGGATCGGAGAGGAGACCAGCTGTTGTAT	595
40	SGVRGDLAV	426	AGCGGCGTAAGAGGAGACCGCCTAGCCGTA	596
41	ASLRGDLST	427	GCCAGCCTAAGAGGAGACCTCAGCTCAACG	597
42	TNRRGDLHGM	428	ACGAACGGAAGAGGAGACCTTCACGGAATG	598
43	TNTRGDHGML	429	ACGAATACGAGAGGAGACCATGGGATGCTG	599
44	SSARGDRDYL	397	AGTTCCGCCAGAGGAGACCGGGACTACCTC	600
45	EDRRGDLLRT	430	GAGGATCGGAGAGGAGACCTTTTGAGGACT	601
46	SSLRGDLLHS	431	TCGTCGCTGAGAGGAGACCTGTTGCATTCT	602
47	ENRRGDLTNA	419	GAAAACCGTAGAGGAGACCTCACGAACGCT	603
48	DGRRGDRESI	432	GACGGCAGGAGAGGAGACCGGGAATCGATC	604
49	TGTRGDTMTW	433	ACTGGAACCAGAGGAGACACAATGACATGG	605
50	STVRGDYTSV	398	TCGACTGTAGAGGAGACTATACTTCTGTT	606
51	SATRGDHNVL	434	TCGGCAACGAGAGGAGACCACAACGTACTG	607
52	TDRRGDSGTL	435	ACGGATCGGAGAGGAGACAGTGGTACTCTG	608
53	TSARGDLIHT	436	ACGAGTGCTAGAGGAGACCTGATTCATACG	609
54	SGVRGDLAV	426	AGTGGGGTGAGAGGAGACCGGCTGGCGGTG	610
55	AVERGDLML	437	GCGGTTGAGAGAGGAGACCGTCTTATGCTG	611
56	DRSRGDTHVL	438	GACAGGTCGAGAGGAGACACGCACGTACTC	612
57	ESTRGDLRVV	439	GAGTCGACGAGAGGAGACCTTCGTGTTGTG	613
58	TTIRGDYREL	440	ACGACGATTAGAGGAGACTATCGTGAGTTG	614
59	TFIRGDLAGA	441	ACGTTTCATCAGAGGAGACCTGGCAGGTGCG	615
60	MTSRGDLTTY	442	ATGACGAGCAGAGGAGACTTGACAACATAC	616
61	ADRRGDQLYS	443	GCGGATCGTAGAGGAGACCAGCTTTATTTCG	617
62	AHMRGDLGGT	385	GCACACATGAGAGGAGACCTAGGCGGCACG	618
63	GYVRGDLGQH	444	GGGTACGTCAGAGGAGACCTGGGGCAACAC	619
64	DASRGDRTSL	445	GATGCGAGTAGAGGAGACAGGACTAGTTTG	620
65	TEVRGDRSQV	446	ACGGAGGTGAGAGGAGACAGGTGCGAGGTT	621
66	SHLRGDQALA	395	TCGCATCTGAGAGGAGACCAGGCTCTTGCG	622
67	SEVRGDRLSI	447	TCGGAGGTGAGAGGAGACCGGTTGAGTATT	623
68	SAARGDTERL	387	AGCGCCGCGAGAGGAGACACTGAACGGCTA	624
69	SDRRGDLSGA	448	TCAGACCGTAGAGGAGACCTGTCGGGCGCT	625
70	SVTRGDRVVI	449	AGCGTCACAAGAGGAGACAGAGTAGTCATC	626
71	SEGRGDRMAL	450	TCGGAGGGGAGAGGAGACAGGATGGCTCTT	627
72	SSTRGDHLSL	451	TCGTCTACTAGAGGAGACCATCTTTCGCTG	628
73	AMIRGDMTHS	391	GCTATGATCAGAGGAGACATGACCCACTCC	629
74	SSTRGDQIYV	452	TCGTCGACGAGAGGAGACCAGATTTATGTG	630
75	EERRGDTHRL	392	GAGGAGCGGAGAGGAGACACTCATCGGTTG	631
76	SNSRGDYNL	381	TCGAATTCGAGAGGAGACTATAATAGTCTT	632
77	SAQRDRMGSP	453	TCCGCACAAAGGGATCGTATGGGTTCTCCG	633
78	TGTRGDIATF	454	ACGGGTACGAGAGGAGACATTGCGACTTTT	634

79	SMQRGDLLST	455	TCGATGCAGAGAGGAGACCTGCTTTCTACT	635
80	EDVRGDRSKL	456	GAGGATGTGAGAGGAGACAGGAGTAAGCTT	636
81	AHMRGDLGGT	385	GCGCATATGAGAGGAGACTTGGGGGGGACT	637
82	TSVRGDQSQY	457	ACGAGTGTGAGAGGAGACCAGAGTCAGTAT	638
83	ADRRGDTGLF	458	GCGGATCGGAGAGGAGACACGGGGTTGTTT	639
84	NTYRGDRDSL	459	AACACTTACAGAGGAGACCGAGACAGCCTG	640
85	TDVRGDRGTF	417	ACGGATGTTAGAGGAGACCGGGGGACGTTT	641
86	SRGRGDLNDL	460	TCTCGTGGGAGAGGAGACCTGAATGATTTG	642
87	SNVRGDREAV	396	AGCAACGTAAGAGGAGACAGGGAAGCCGTC	643
88	MDRRGDASIL	461	ATGGACAGGAGAGGAGACGCCTCCATACTG	644
89	SIWRGDRTEV	462	TCGATATGGAGAGGAGACCGTACAGAAGTC	645
90	NSQRGDYSGM	463	AACTCACAAAGAGGAGACTACAGTGGAATG	646
91	SSVRGDIGGI	464	TCTAGCGTAAGAGGAGACATCGGGGGGATC	647
92	ENQRGDLGR	390	GAGAATCAGAGAGGAGACTTGTCTGGGTCGG	648
93	EIRRGDLAQ	465	GAGATTCTGGAGAGGAGACCTTCTGGCTCAG	649
94	SNIRGDHAVM	466	TCGAACATCAGAGGAGACCACGCAGTCATG	650
95	LDTRGDRSQV	467	CTGGATACGAGAGGAGACCGGAGTCAGGTT	651
96	ANTRGDHQN	468	GCGAATACGAGAGGAGACCATCAGAATTTT	652
97	QVYRGDRESV	415	CAGGTGTATAGAGGAGACCGTGAGTCTGTT	653
98	TSVRGDLSMN	469	ACGTCGGTGAGAGGAGACCTTTCGATGAAT	654
99	ASTRGDHGVL	383	GCCTCAACGAGAGGAGACCACGGAGTTCTC	655
100	TTTRGDYLN	470	ACGACGACGAGAGGAGACTATCTTAATACG	656
101	AERRGDIKEY	471	GCGGAGAGGAGAGGAGACATTAAGGAGTAT	657
102	SHARGDLGST	472	TCGCATGCTAGAGGAGACTTGGGTTTCGACT	658
103	TSQRGDYVSL	473	ACGTCTCAGAGAGGAGACTATGTTTCTCTT	659
104	GPGRGDQTTL	556	GGGCCGGGTAGAGGAGACCAGACTACGTTG	660
105	VNVRGDRGEV	474	GTGAATGTGAGAGGAGACCGTGGTGAGGTG	661
106	SYRRGDHDQL	475	TCGTATCGTAGAGGAGACCATGATCAGCTT	662
107	SGTRGDRVDL	476	AGCGGCACAAGAGGAGACAGGGTAGACCTC	663
108	SHFRGDLHTS	477	TCCCACCTCAGAGGAGACTTGCACACGTCC	664
109	SDRRGDLSP	478	TCGGATCGTAGAGGAGACCTTTCGGTGCCT	665
110	SGTRGDTLIL	479	AGCGGCACCAGAGGAGACACCCTTATACTC	666
111	ENTRGDLHGK	480	GAAAACACCAGAGGAGACCTCCACGGCAAA	667
112	DRARGDTHVL	481	GATCGGGCGAGAGGAGACACGCATGTGCTG	668
113	ASGRGDIAGL	482	GCGTCTGGTAGAGGAGACATTGCGGGGCTT	669
114	EGRRGDLFQA	483	GAGGGTCGTAGAGGAGACCTGTTTCAGGCG	670
115	RSERGDRLEI	484	AGATCCGAAAGAGGAGACAGGCTAGAAATC	671
116	AAYRGDAHVL	485	GCGGCCTACAGAGGAGACGCACACGTGCTC	672
117	NDSRGDQHRL	486	AACGACTCGAGAGGAGACCAACACCGATTG	673
118	SSARGDHSQL	487	TCATCGGCAAGAGGAGACCACTCTCAACTG	674
119	TNERGDRLSI	488	ACGAATGAGAGAGGAGACCGTCTTTCGATT	675
120	SNSRGDYTSV	489	AGCAACTCCAGAGGAGACTACACCAGTGTC	676

121	NVTRGDHTVM	490	AACGTCACAAGAGGAGACCACACCGTTATG	677
122	TMVRGDVKGL	491	ACGATGGTGAGAGGAGACGTTAAGGGGCTT	678
123	TGTRGDIATF	454	ACCGGGACAAGAGGAGACATAGCCACGTTC	679
124	VQLRGDLAST	492	GTGCAGCTGAGAGGAGACTTGGCTTCTACT	680
125	MNRRGDYSEQ	493	ATGAACCGGAGAGGAGACTACTCGGAACAA	681
126	ANTRGDLSPV	494	GCGAATACTAGAGGAGACCTGAGTCCGGTT	682
127	TGMRGDAGSL	495	ACGGGTATGAGAGGAGACGCTGGGAGTCTT	683
128	LDRRGDFSSA	496	CTAGACCGCAGAGGAGACTTCAGCTCCGCG	684
129	MYHRGDMTSV	497	ATGTACCACAGAGGAGACATGACTTCGGTG	685
130	GSMRGDLHST	498	GGGTTCGATGAGAGGAGACTTGCATTTCGACG	686
131	SSSRGDFSSV	499	TCGTCGTCCAGAGGAGACTTCAGCTCTGTT	687
132	TGTRGDLHTY	500	ACGGGTACGAGAGGAGACTTGCATACTTAT	688
133	YTQRGDLATV	501	TACACCCAAAGAGGAGACCTTGCCACCGTC	689
134	TDVRGDRMYV	502	ACGGATGTTAGAGGAGACCGGATGTATGTG	690
135	TSVRGDHGT	388	ACATCGGTCAGAGGAGACCACGGAACATTG	691
136	SNSRGDLSVN	503	TCGAACCTCCAGAGGAGACCTATCGGTAAAC	692
137	QSGRGDQMTL	504	CAGTCTGGGAGAGGAGACCAGATGACGTTG	693
138	MNTRGDLQQS	505	ATGAACACCAGAGGAGACTTGCAACAATCG	694
139	AGSRGDLQTV	506	GCGGGATCAAGAGGAGACCTACAAACGGTG	695
140	SNMRGDQTYV	507	TCGAACATGAGAGGAGACCAAACCTTACGTC	696
141	TPSRGDMSNV	508	ACGCCAAGTAGAGGAGACATGTCCAACGTC	697
142	NSTRGDLHMA	509	AACAGCACAAGAGGAGACCTACACATGGCA	698
143	ANTRGDLSVS	510	GCTAACACCAGAGGAGACCTCTCAGTCAGT	699
144	TDRRGDTGLL	511	ACCGACCGAAGAGGAGACACCGGCTTACTG	700
145	DGVRGDRATW	512	GACGGCGTAAGAGGAGACCGTGCAACATGG	701
146	ENRRGDFNNT	384	GAGAATCGTAGAGGAGACTTTAATAATACG	702
147	EPSRGDRMVL	513	GAGCCTAGTAGAGGAGACAGGATGGTGTG	703
148	SGVRGDRIII	514	AGCGGCGTTAGAGGAGACCGGATCATAATC	704
149	TSMRGDYTHV	515	ACGTCGATGAGAGGAGACTATACGCATGTT	705
150	ASSRGDLTVI	516	GCGTCGAGTAGAGGAGACTTGACTGTTATT	706
151	ETRRGDLSLQ	517	GAGACGCGTAGAGGAGACCTGTCGCTTCAG	707
152	NNARGDQSMH	518	AACAACGCAAGAGGAGACCAATCAATGCAC	708
153	TDRRGDSSAL	519	ACGGATAGGAGAGGAGACTCTAGTGCGCTT	709
154	SSQRGDLTGV	520	TCAAGCCAAAGAGGAGACTTGACAGGTGTG	710
155	QTARGDVMVH	521	CAGACGGCTAGAGGAGACGTTATGGTTCAT	711
156	VSQRGDLNAV	522	GTGTCGCAGAGAGGAGACCTGAATGCTGTT	712
157	TMTRGDLAAN	523	ACGATGACCAGAGGAGACCTCGCTGCTAAC	713
158	NASRGDHSSL	524	AATGCTTCGAGAGGAGACCATTTCGTCGTTG	714
159	SNTRGDMGLT	525	TCAAACACCAGAGGAGACATGGGCCTCACG	715
160	MYSRGDTHSL	526	ATGTATTCGAGAGGAGACACTCATAGTCTG	716
161	ADQRGDRAPL	527	GCGGATCAGAGAGGAGACAGGGCTCCGCTT	717
162	QERRGDYTSM	382	CAAGAAAGGAGAGGAGACTACACCTCTATG	718

163	SQNRGDLANT	528	TCCCAAAACAGAGGAGACCTAGCCAACACG	719
164	EKLRGDLHST	389	GAGAAGTTGAGAGGAGACCTTCATTCGACT	720
165	QGGRGDLSTL	404	CAAGGCGGAAGAGGAGACCTGAGTACACTG	721
166	SNRRGDTEMQ	529	TCGAATAGGAGAGGAGACACTGAGATGCAG	722
167	SGSRGDVSAL	530	TCGGGTAGTAGAGGAGACGTGAGTGCTTTG	723
168	ESTRGDRGTL	531	GAGTCGACGAGAGGAGACCGTGGTACGCTG	724
169	SAVRGDAALH	532	TCGGCGGTGAGAGGAGACGCGGCGCTTCAT	725
170	LSSRGDVNRL	533	CTGAGCAGCAGAGGAGACGTTAACCGCCTT	726
171	EQRRGDIQTI	534	GAGCAGAGGAGAGGAGACATTCAGACTATT	727
172	AAYRGDAHVL	485	GCTGCGTATAGAGGAGACGCGCATGTTCTT	728
173	SPVRGDH GAL	535	TCGCCGGTGAGAGGAGACCATGGGGCTTTG	729
174	DSRRGDYANL	409	GATTCGAGGAGAGGAGACTATGCGAATCTG	730
175	LSRRGDYQEL	536	TTGAGTCGGAGAGGAGACTATCAGGAGTTG	731
176	SYARGDVHSI	420	TCCTACGCAAGAGGAGACGTCCACTCCATC	732
177	DSRRGDASYH	537	GACTCACGCAGAGGAGACGCGTCGTACCAC	733
178	NHQRGDLSSS	538	AACCACCAAAGAGGAGACCTGAGCTCGAGT	734
179	SSTRGDHLSL	451	TCCTCAACGAGAGGAGACCACCTGTCTTTG	735
180	SWNRGDISGL	539	TCGTGGAACAGAGGAGACATATCTGGCCTT	736
181	TGTRGDLGTM	540	ACGGGTACTAGAGGAGACCTGGGGACGATG	737
182	QQLRGDTHTL	541	CAGCAGCTTAGAGGAGACACGCATACTCTT	738
183	AGLRGDRDSL	542	GCGGGGTTGAGAGGAGACCGTGATTCGCTT	739
184	QVYRGDRDQL	543	CAGGTTTATAGAGGAGACCGGGATCAGTTG	740
185	AGVRGDRV TI	544	GCAGGAGTAAGAGGAGACAGAGTGACCATC	741
186	NSARGDLLHS	545	AACTCAGCCAGAGGAGACCTTCTGCACTCC	742
187	NHSRGDLTGV	546	AACCACAGTAGAGGAGACCTGACAGGCGTT	743
188	NAYRGDTS AF	547	AACGCTTACAGAGGAGACACATCCGCGTTC	744
189	SANRGDIMHT	548	TCGGCTAACAGAGGAGACATAATGCACACG	745
190	QSARGDLVSY	549	CAATCCGCCAGAGGAGACCTCGTCAGTTAC	746
191	DSRRGDASYH	537	GATAGTAGGAGAGGAGACGCTAGTTATCAT	747
192	SFVRGDRV TL	550	TCGTTTGTGAGAGGAGACGTTCGTACGCTG	748
193	SDMRGDRSVY	551	AGCGACATGAGAGGAGACCGATCTGTGTAC	749
194	SGIRGDRYPI	552	TCCGGAATCAGAGGAGACCGCTACCCAATA	750
195	SNVRGDM AHS	553	TCCAACGTCAGAGGAGACATGGCTCACAGC	751
196	TEVRGDRS QV	446	ACTGAGGTTAGAGGAGACCGTTCGCAGGTT	752
197	ASSRGDLQQT	554	GCGAGCAGCAGAGGAGACCTGCAACAAACG	753
198	QSARGDLVSY	549	CAGTCTGCTAGAGGAGACCTTGTGTCTTAT	754
199	DASRGDR TSL	445	GACGCATCTAGAGGAGACCGAACATCCCTC	755
200	NSVRGDLNQT	555	AACAGTGTCAGAGGAGACCTCAACCAA ACT	756

Tabla: Insertos de n-meros y/o motivos RGD específicos del músculo esquelético de mayor rango

Insertos de n-meros y/o motivos RGD específicos del músculo esquelético de mayor rango			
Variante	SEQ ID NO.:	Variante	SEQ ID NO.:
TTGRGDQARL	757	TNARGDYTAL	881
TTLRGDHSQL	758	AEGRGDTRGS	882
TNLRGDYQLT	759	TNIRGDQSSV	883
STSRGDYVTH	760	VDRRGDTMTM	884
MPARGDLVQT	761	QIGRGDVTPL	885
SGVRGDLAV	762	MQARGDLLGV	886
SNERGDQHRL	763	NTQRGDYASV	887
STLRGDYAVS	764	SDTRGDRITQ	888
SNARGDIMTT	765	SAIRGDYRDV	889
EASRGDLQMR	766	VGVRGDVHPL	890
TYARGDLSGH	767	TVLRGDAERL	891
DSSRGDRSSV	768	ASTRGDLSGQ	892
SQSRGDLVPL	769	DSRRGDGQNL	893
SATRGDYSIL	770	IDKRGDIQGL	894
QATRGDLQHT	771	TVTRGDLLVN	895
HDDRGRDRML	772	DSTRGDRLGL	896
SSHRGDLLAT	773	AANRGDYASL	897
SYQRGDQHNM	774	RDYRGDTSSL	898
SHQRGDYNTL	775	SNIRGDASLH	899
MDQRGDMSVV	776	NLQRGDRTDF	900
QIARGDLHVP	777	NASRGDHSSM	901
TYTRGDQHMM	778	TSMRGDYTHV	902
DASRGDRTSL	779	TSRRGDLNDV	903
SDRRGDLHPQ	780	QSHRGDVQSL	904
SATRGDHSTL	781	STTRGDYQSV	905
AYQRGDFTSV	782	YSTRGDHAML	906
TGNRGDLQSV	783	TSARGDLIHT	907
AWRRGDLENA	784	ATARGDRESF	908
NAARGDHGLL	785	ASTRGDYSTM	909
SYSRGDHQAL	786	SNNRGDVQRL	910
DGVRGDRTVV	787	ERLRGDQHII	911
SSERGDKMST	788	SSIRGDHATL	912
TSMRGDYTHV	789	NPTRGDIATV	913
SGVRGDRIII	790	MSTRGDL SVN	914
ENRRGDAQLL	791	MDRRGDITYA	915
TVYRGDREQH	792	NATRGDLMSA	916
LDRRGDLLNS	793	SDHRGDRTYQ	917
ESVRGDLRST	794	NWVRGDLSTA	918
DKYRGDQRGL	795	SSHRGDLSAT	919
TDRRGDAHIL	796	NATRGDYREI	920
SQTRGDTSLM	797	DTLRGDLQTA	921
DATRGDTRML	798	IAVRGDLTPV	922
SMQRGDLTHA	799	TLLRGDLAHS	923
SGTRGDTLIL	800	MNTRGDHTVL	924
ANTRGDHQNF	801	TGHRGDI AVY	925
TSQRGDHTQL	802	TSNRGDQMSN	926
SHWRGDTSSL	803	SATRGDHTAI	927

ISGRGDRQEL	804	SSVRGDREHA	928
SVLRGDIGTI	805	TNSRGDLVVH	929
QDSRGDLSGK	806	ETRRGDLSSQ	930
KPIRGDGAEL	807	TYARGDITLT	931
TYMRGDLQHT	808	SASRGDTLHL	932
TELRGDLSSST	809	DNQRGDLSSR	933
SAMRGDHAVAL	810	TQSRGDLRDA	934
SWVRGDASTL	811	ENRRGDLTNA	935
QYARGDPHAL	812	TSIRGDISSV	936
STNRGDIVVH	813	ISARGDTMTL	937
VNIRGDLHQT	814	SRVRGDQDHW	938
REYRGDSSIL	815	SGNRGDIASY	939
STLRGDBGSM	816	NEQRGDRYNH	940
SSQRGDITAH	817	EALRGDVRL	941
TEFRGDRSTV	818	VDRRGDYTQM	942
TSTRGDYVTV	819	NNVRGDYTSV	943
NHLRGDVSAI	820	QTYRGDASVL	944
LERRGDLVST	821	SNYRGDHGSL	945
NEYRGDHSHP	822	TSSRGDLREV	946
NWQRGDTSTL	823	QYTRGDVSNL	947
TDSRGDRTVL	824	SDLRGDVRRER	948
YAVRGDQHTI	825	QNARGDTTAL	949
FGVRGDTRDL	826	NSLRGDRDTM	950
SSARGDTGML	827	SNSRGDQAQV	951
SAMRGDQMGQ	828	EATRGDRSTL	952
SHTRGDLVTT	829	VPQRGDITNL	953
VTTRGDTAIL	830	DKIRGDLRSI	954
EPTRGDRHSI	831	SAARGDYSIV	955
GSQRGDLVL	832	VGLRGDLIGQ	956
QHYRGDLSTT	833	QAGRGDLTVI	957
METRGDRQQL	834	SKTRGDFQEA	958
EALRGDKVVL	835	GTARGDYSML	959
NAVRGDQSYV	836	ISTRGDLVTI	960
SPLRGDNRAL	837	TGTRGDREYM	961
ENRRGDTHAL	838	MTTRGDLSIT	962
NSQRGDLTGT	839	STSRGDMTSV	963
QYAPSQGTV	840	GPARGDFTSS	964
DNSRGDHSRL	841	VDRRGDLGHV	965
NTHRGDYASI	842	NSGRGDMSQL	966
HTTRGDQQPL	843	SQGRGDLERY	967
EWRRGDQTAL	844	VFGRGDQYTL	968
TAVRGDQTTV	845	IVGRGDLHLQ	969
EYLRGDRISQ	846	SYSRGDTSRL	970
SRYRGDQETI	847	MSSRGDRATI	971
ASLRGDTVTL	848	MSSRGDLTRV	972
VGVRGDShVL	849	QHTRGDFGNL	973
TNSRGDHTSL	850	ETRRGDLSSQ	974
VDQRGDQRAL	851	TGTRGDLRAI	975
ASVRGDRLDV	852	QMARGDLSTA	976
TSYRGDLSSN	853	LVERGDRIMN	977
TSDRGDSSNR	854	GLVRGDLNAR	978
SYMRGDLDMR	855	NNPRGDLSSV	979
TDVRGDRSMI	856	HEKRGDLSNS	980

SYVRGDSSTV	857	SQARGDLHQT	981
QVYRGDRESV	858	FTGRGDLRTA	982
TDRRGDAVSF	859	QSIRGDTGHL	983
TNSRGDLHTT	860	SAGRGDMSVL	984
EAIRGDFKTL	861	SERRGDEHKW	985
TGIRGDTAGL	862	TTGRGDLVSL	986
TSSRGDVQSL	863	LGLRGDQIGQ	987
SSRRGDTNEL	864	VALRGDLTHQ	988
SNARGDHTPL	865	MIGRGDQAPL	989
SELRGDRSPY	866	FQARGDHSTL	990
VHARGDTSIM	867	NSVRGDHSSL	991
SALRGDHGTL	868	WPNRGDLQST	992
QTGRGDIAGM	869	SASRGDYQTL	993
TVARGDQIRL	870	TMQRGDLHTI	994
TNSRGDSVAL	871	TALRGDLAGT	995
QNARGDSAVI	872	VNARGDFSQT	996
HYLRGDTTTL	873	GWIRGDRTSM	997
ANARGDLQNT	874	TFSRGDHTVL	998
QNIRGDIRTV	875	SGARGDLVGV	999
AALRGDHGQM	876	NNVRGDYTSV	1000
TTDRGDL SAR	877	QTARGDHVVL	1001
LNVRGDLVHT	878	TLIRGDLTRS	1002
YSTRGDHTVL	879	VTTRGDRLEL	1003
TNARGDLTVS	880		

Tabla: Insertos de n-meros y/o motivos RGD específicos del músculo esquelético de mayor rango

5

Insertos de n-meros y/o motivos RGD específicos del músculo esquelético de mayor rango			
Variante	SEQ ID NO.:	Variante	SEQ ID NO.:
EASRGDLQMR	1004	TNARGDY TAL	1127
TYARGDL SGH	1005	AEGRGDTRGS	1128
DSSRGDRSSV	1006	TNIRGDQSSV	1129
SQSRGDLVPL	1007	VDRRGDTMTM	1130
MPARGDLVQT	1008	QIGRGDVTPL	1131
SGVRGDLAV	1009	MQARGDLLGV	1132
SNERGDQHRL	1010	NTQRGDYASV	1133
STLRGDYAVS	1011	SDTRGDRTITQ	1134
SNARGDIMTT	1012	SAIRGDYRDV	1135
TTGRGDQARL	1013	VGVRGDVHPL	1136
TTLRGDHS QL	1014	TVLRGDAERL	1137
TNLRGDYQLT	1015	ASTRGDL SGQ	1138
STSRGDYVTH	1016	DSRRGDGQNL	1139
SATRGDYSIL	1017	IDKRGD IQGL	1140
QATRGDLQHT	1018	TVTRGDLLVN	1141
HDDRGRDRML	1019	DSTRGDRLGL	1142
SSHRGDL LAT	1020	AANRGDYASL	1143
SYQRGDQHNM	1021	RDYRGDTSSL	1144
SHQRGDYNTL	1022	SNIRGDASLH	1145
MDQRGDMSVV	1023	NLQRGDRTDF	1146
QIARGDLHVP	1024	NASRGDHSSM	1147

TYTRGDQHMM	1025	TSMRGDYTHV	1148
DASRGDRTSL	1026	TSRRGDLNDV	1149
SDRRGDLHPQ	1027	QSHRGDVQSL	1150
SATRGDHSTL	1028	STTRGDYQSV	1151
AYQRGDFTSV	1029	YSTRGDHAML	1152
TGNRGDLQSV	1030	TSARGDLIHT	1153
AWRRGDLENA	1031	ATARGDRESF	1154
NAARGDHGLL	1032	ASTRGDYSTM	1155
SYSRGDHQAL	1033	SNNRGDVQRL	1156
DGVRGDRTVV	1034	ERLRGDQHII	1157
SSERGDKMST	1035	SSIRGDHATL	1158
TSMRGDYTHV	1036	NPTRGDIATV	1159
SGVRGDRIII	1037	MSTRGDL SVN	1160
ENRRGDAQLL	1038	MDRRGDITYA	1161
TVYRGDREQH	1039	NATRGDLMSA	1162
LDRRGDLLNS	1040	SDHRGDRTYQ	1163
ESVRGDLRST	1041	NWVRGDLSTA	1164
DKYRGDQRGL	1042	SSHRGDL SAT	1165
TDRRGDAHIL	1043	NATRGDYREI	1166
SQTRGDTSLM	1044	DTLRGDLQTA	1167
DATRGDTRML	1045	IAVRGDLTPV	1168
SMQRGDLTHA	1046	TLLRGDLAHS	1169
SGTRGDTLIL	1047	MNTRGDHTVL	1170
ANTRGDHQNF	1048	TGHRGDI AVY	1171
TSQRGDHTQL	1049	TSNRGDQMSN	1172
SHWRGDTSSL	1050	SATRGDHTAI	1173
ISGRGDRQEL	1051	SSVRGDREHA	1174
SVLRGDIGTI	1052	TNSRGDLVVH	1175
QDSRGDL SGK	1053	ETRRGDLSSQ	1176
KPIRGDGAEL	1054	TYARGDITLT	1177
TYMRGDLQHT	1055	SASRGDTLHL	1178
TELRGDL SST	1056	DNQRGDLSSR	1179
SAMRGDHAVL	1057	TQSRGDLRDA	1180
SWVRGDASTL	1058	ENRRGDLTNA	1181
QYARGDPHAL	1059	TSIRGDISSV	1182
STNRGDIVVH	1060	ISARGDTMTL	1183
VNIRGDLHQT	1061	SRVRGDQDHW	1184
REYRGDSSIL	1062	SGNRGDIASY	1185
STLRGDGSM	1063	NEQRGDRYNH	1186
SSQRGDITAH	1064	EALRGDV RAL	1187
TEFRGDRSTV	1065	VDRRGDYTQM	1188
TSTRGDYVTV	1066	NNVRGDYTSV	1189
NHLRGDVSAI	1067	QTYRGDASVL	1190
LERRGDLVST	1068	SNYRGDHGSL	1191
NEYRGDHSHP	1069	TSSRGDLREV	1192
NWQRGDTSTL	1070	QYTRGDVSNL	1193
TDSRGDRTVL	1071	SDLRGDV RER	1194
YAVRGDQHTI	1072	QNARGDTTAL	1195
FGVRGDRDRL	1073	NSLRGDRDTM	1196
SSARGDTGML	1074	SNSRGDQAQV	1197
SAMRGDQMGQ	1075	EATRGDRSTL	1198
SHTRGDLVTT	1076	VPQRGDITNL	1199
VTTRGDTAIL	1077	DKIRGDLRSI	1200

EPTRGDRHSI	1078	SAARGDYSIV	1201
GSQRGDLVL	1079	VGLRGDLIGQ	1202
QHYRGDLSTT	1080	QAGRGDLTVI	1203
METRGDRQQL	1081	SKTRGDFQEA	1204
EALRGDKVVL	1082	GTARGDY SML	1205
NAVRGDQSYV	1083	ISTRGDLVTI	1206
SPLRGDNRAL	1084	TGTRGDREYM	1207
ENRRGDTHAL	1085	MTTRGDLSIT	1208
NSQRGDLTGT	1086	STSRGDMTSV	1209
DNSRGDHSRL	1087	GPARGDFTSS	1210
NTHRGDYASI	1088	VDRRGDLGHV	1211
HTTRGDQQPL	1089	NSGRGDMSQL	1212
EWRRGDQTAL	1090	SQGRGDLERY	1213
TAVRGDQTTV	1091	VFGRGDQYTL	1214
EYLRGDRISQ	1092	IVGRGDLHLQ	1215
SRYRGDQETI	1093	SYSRGDTSRL	1216
ASLRGDTVTL	1094	MSSRGDRATI	1217
VGVRGDSHVL	1095	MSSRGDLTRV	1218
TNSRGDHTSL	1096	QHTRGDFGNL	1219
VDQRGDQRAL	1097	ETRRGDLSSQ	1220
ASVRGDLVDV	1098	TGTRGDLRAI	1221
TSYRGDLSSN	1099	QMARGDLSTA	1222
TSDRGDSSNR	1100	LVERGDRIMN	1223
SYMRGDLDMR	1101	GLVRGDLNAR	1224
TDVRGDRSMI	1102	NNPRGDLSSV	1225
SYVRGDSSTV	1103	HEKRGDLSNS	1226
QVYRGDRESV	1104	SQARGDLHQT	1227
TDRRGDAVSF	1105	FTGRGDLRTA	1228
TNSRGDLHTT	1106	QSIRGDTGHL	1229
EAIRGDFKTL	1107	SAGRGDMSVL	1230
TGIRGDTAGL	1108	SERRGDEHKW	1231
TSSRGDVQSL	1109	TTGRGDLVSL	1232
SSRRGDTNEL	1110	LGLRGDQIGQ	1233
SNARGDHTPL	1111	VALRGDLTHQ	1234
SELRGDRSPY	1112	MIGRGDQAPL	1235
VHARGDTSIM	1113	FQARGDHSTL	1236
SALRGDHGTL	1114	NSVRGDHSSL	1237
QTGRGDIAGM	1115	WPNRGDLQST	1238
TVARGDQIRL	1116	SASRGDYQTL	1239
TNSRGDSVAL	1117	TMQRGDLHTI	1240
QNARGDSAVI	1118	TALRGDLAGT	1241
HYLRGDTTTL	1119	VNARGDFSQT	1242
ANARGDLQNT	1120	GWIRGDRTSM	1243
QNIRGDIRTV	1121	TFSRGDHTVL	1244
AALRGDHGQM	1122	SGARGDLVGV	1245
TTDRGDL SAR	1123	NNVRGDYTSV	1246
LNVRGDLVHT	1124	QTARGDHVVL	1247
YSTRGDHTVL	1125	TLIRGDLTRS	1248
TNARGDLTVS	1126	VTTRGDRLEL	1249

Promotor

La invención puede contener un promotor específico de músculo u otro promotor. El promotor puede estar ligado a la secuencia de ácido nucleico para que la transcripción se produzca preferentemente dentro de los miocitos. Las regiones del promotor permiten a las células huésped replicar el ácido nucleico administrado por el AAV solo en los tipos celulares y tejidos u órganos donde se debe crear la proteína deseada. En este caso, se incluye el promotor específico de músculo porque se desea principalmente que las proteínas sólo se traduzcan en los miocitos. La especificidad del tipo de célula en el que se administra el ácido nucleico y, por lo tanto, se traducen las proteínas es deseable debido a los efectos adversos que pueden resultar de la administración del ácido nucleico y su traducción en células en las que ese ácido nucleico y, por lo tanto, la proteína, no son necesarios.

En algunas formas de realización, el promotor específico de músculo produce mayor potencia de las células musculares, especificidad de las células musculares, inmunogenicidad reducida o cualquier combinación de estas características. De acuerdo con la presente los términos "específico de músculo", "especificidad de la célula muscular", "potencia de la célula muscular", "específico de miocito" y similares, se refieren a la mayor especificidad, selectividad o potencia de las fracciones de direccionamiento específicas de músculo y composiciones que incorporan dichas fracciones de direccionamiento específicas de músculo de la presente invención para los miocitos en relación con las células no musculares. En algunas formas de realización, la especificidad, o selectividad, o potencia celular, o una combinación de estas características de una fracción dirigida específica de músculo o composición que incorpora una fracción dirigida específica de músculo descrita en la presente es al menos 2 a al menos 500 veces más específica, selectiva y/o potente para/en una célula muscular en relación con una célula no muscular.

En algunas formas de realización, el promotor selectivo de miocitos utilizado es MHCK7. MHCK7 es un promotor de 770 pares de bases de longitud que es lo suficientemente pequeño como para ser incluido en un vector de AAV. MHCK7 dirige la expresión en el músculo esquelético y cardíaco, tanto rápido como lento, con baja expresión en el hígado, el pulmón y el bazo. Es menos activo en el músculo liso. El promotor MHCK7 está asociado con altos niveles de expresión en los músculos esqueléticos, incluido el diafragma, e incluye un potenciador para impulsar especialmente la expresión en el corazón, mientras que la expresión en tejidos no diana es mínima.

En algunas formas de realización, los promotores descritos en la presente se insertan en una proteína AAV (por ejemplo, una proteína de la cápside de AAV) con

especificidad reducida (o sin interacción detectable, medible o clínicamente relevante) para uno o más tipos de células no musculares. Los ejemplos de tipos de células no musculares incluyen, entre otros, células del hígado, riñón, pulmón, corazón, bazo, sistema nervioso central o periférico, células óseas, inmunitarias, estomacales, intestinales, oculares, cutáneas, etc. En algunas formas de realización, las células no musculares son células hepáticas.

El término “operablemente unido” se refiere a la asociación de dos o más moléculas de ácido nucleico en un solo fragmento de ácido nucleico, de modo que la función de una se ve afectada por la otra.

Otros ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen la secuencia promotora U6, la secuencia promotora MHCK7, la secuencia promotora CK6, la secuencia promotora tMCK, la secuencia promotora CK5, la secuencia promotora MCK, la secuencia promotora HAS, la secuencia promotora MPZ, la secuencia promotora de desmina, la secuencia promotora APOA2, la secuencia promotora hAAT, la secuencia promotora INS, la secuencia promotora IRS2, la secuencia promotora MYH6, la secuencia promotora MYL2, la secuencia promotora TNNI3, la secuencia promotora SYN1, la secuencia promotora GFAP, la secuencia promotora NES, la secuencia promotora MBP o la secuencia promotora TH.

Los promotores específicos de músculo están descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional WO 2020/006458 y WO 2021/126880, las cuales quedan incorporadas a la presente como referencia.

Otros promotores específicos de músculo están descritos en la Patente Estadounidense Número 9.133.482; Patente Estadounidense Número 10.105.453; Patente Estadounidense Número 10.301.367; Publicación de Patente Estadounidense Número 2020-0360534; Publicaciones de Patente Internacional por el PCT Números WO 2020/006458; WO 2021/035120; WO 2021/053124; y WO 2021/077000, que se incorporan a la presente como referencia.

Puede ser conveniente utilizar un promotor de la ARN polimerasa II o III; estos son conocidos por el experto en la materia y han sido analizados, por ejemplo, en Kornberg 1999. Sin embargo, las transcripciones de una ARN polimerasa II a menudo tienen terminadores de transcripción complejos y las transcripciones están poliadeniladas; esto puede dificultar los requisitos de la cadena de miARN, ya que sus extremos 5' y 3' deben definirse con precisión para lograr la estructura secundaria requerida para producir una molécula funcional. Sin embargo, estos inconvenientes pueden evitarse. Si se utiliza un

promotor de la ARN polimerasa II o III, el polinucleótido que codifica la cadena de miARN también puede codificar ribozimas de autoprocesamiento y puede estar operativamente unido a un promotor de la ARN polimerasa II o III; como tal, el polinucleótido codifica una cadena de pre-miARN que comprende la cadena de miARN y las ribozimas de autoprocesamiento, en tanto, cuando se transcribe, la cadena de miARN es liberada por las ribozimas de autoprocesamiento de la transcripción de la cadena pre-miARN.

Preferentemente, en una composición de acuerdo con la presente invención, el vector de AAV está compuesto por un promotor de la ARN polimerasa II o III, y codifica una cadena de pre-miARN que comprende la cadena de miARN y ribozimas de autoprocesamiento, en tanto, cuando se transcribe, la cadena de miARN es liberada por las ribozimas de autoprocesamiento de la transcripción de la cadena de pre-miARN. Convenientemente, múltiples cadenas de pre-miARN y múltiples ribozimas de autoprocesamiento pueden ser codificadas por un solo polinucleótido, unido operativamente a uno o más promotores de la ARN polimerasa II.

Se han descrito promotores de la ARN polimerasa II o III inducibles y/o específicos de tejido. Los promotores de la ARN polimerasa son conocidos en la técnica y están descritos con mayor detalle en la Publicación de Patente Estadounidense 11.149.288, que se incorpora a la presente como referencia.

Proteína de la cápside

La proteína de la cápside es la envoltura o recubrimiento del virus que permite su transporte al huésped. Sin esta proteína, los ácidos nucleicos serían destruidos por el huésped sin entrar en las células huésped ni iniciar la transcripción y la traducción. La proteína de la cápside puede tener la conformación natural de un AAV natural o estar modificada.

En ciertos ejemplos de formas de realización, la proteína de la cápside del AAV es una proteína de la cápside de AAV modificada que tiene una captación reducida o eliminada en una célula no muscular en comparación con un polipéptido de la cápside de AAV de tipo salvaje correspondiente.

En algunas formas de realización, el polinucleótido codificante de la cápside del AAV modificado se puede incluir en un polinucleótido que está configurado para ser un donante del genoma del AAV en un sistema de vector de AAV que se puede usar para generar las partículas de AAV modificadas que se describen en otras secciones de la presente. En algunas formas de realización, el polinucleótido codificante de la cápside del

AAV modificado se puede acoplar operativamente a una cola de poliadenilación.. En algunas formas de realización, la cola de poliadenilación puede ser una cola de poliadenilación SV40. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica la cápside del AAV se puede acoplar operativamente a un promotor. En algunas formas de realización, el promotor puede ser un promotor específico de tejido. En algunas formas de realización, el promotor específico de tejido es específico para músculo (por ejemplo, músculo cardíaco, esquelético y/o liso), neuronas y células de soporte (por ejemplo, astrocitos, células gliales, células de Schwann, etc.), grasa, bazo, hígado, riñón, células inmunes, células del líquido cefalorraquídeo, células del líquido sinovial, células de la piel, cartílago, tendones, tejido conectivo, hueso, páncreas, glándula suprarrenal, célula sanguínea, células de la médula ósea, placenta, células endoteliales y combinaciones de las mismas. En algunas formas de realización, el promotor puede ser un promotor constitutivo. Los promotores específicos de tejido y los promotores constitutivos adecuados están descritos en otras secciones de la presente, son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Los promotores específicos de músculo adecuados incluyen, entre otros, CK8, MHCK7, el promotor de mioglobina (Mb), promotor de desmina, promotor de creatina quinasa muscular (MCK) y variantes de los mismos, y el promotor sintético SPC5-12.

En la presente se describen varias formas de realización de cápsides virales modificadas, como las cápsides de virus adenoasociados (AAV), que pueden diseñarse para conferir tropismo específico de célula, como tropismo específico de músculo, a una partícula viral modificada. Las cápsides virales modificadas pueden ser cápsides lentivirales, retrovirales, adenovirales o de AAV. Las cápsides modificadas se pueden incluir en una partícula viral modificada (por ejemplo, una partícula viral lentiviral, retroviral, adenoviral o AAV modificada) y pueden conferir tropismo específico de célula, inmunogenicidad reducida o ambos a la partícula viral modificada. Las cápsides virales modificadas descritas en la presente pueden incluir una o más proteínas de cápsides virales modificadas descritas en la presente que pueden contener una fracción de direccionamiento específica de músculo que contiene o está compuesta por un motivo número descrito en otras secciones de la presente.

La cápside viral y/o las proteínas de la cápside viral modificadas pueden ser codificadas por uno o más polinucleótidos de la cápside viral modificados. En algunas formas de realización, el polinucleótido de la cápside viral modificado es un polinucleótido de la cápside de AAV modificado, un polinucleótido de la cápside lentiviral modificado,

un polinucleótido de la cápside retroviral modificado o un polinucleótido de la cápside de adenovirus modificado. En algunas formas de realización, un polinucleótido de cápside viral modificado (por ejemplo, un polinucleótido de cápside de AAV modificado, un polinucleótido de cápside lentiviral modificado, un polinucleótido de cápside retroviral modificado o un polinucleótido de cápside de adenovirus modificado) puede incluir una
5 señal de poliadenilación 3'. La señal de poliadenilación puede ser una señal de poliadenilación de SV40.

Las cápsides virales modificadas pueden ser variantes de la cápside viral de tipo salvaje. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las cápsides de AAV modificadas
10 pueden ser variantes de las cápsides de AAV de tipo salvaje. En algunas formas de realización, las cápsides de AAV de tipo salvaje pueden estar compuestas por las proteínas de la cápside VP1, VP2, VP3 o una combinación de las mismas. En otras palabras, las cápsides de AAV modificadas pueden incluir una o más variantes de proteínas de la cápside VP1 de tipo salvaje, VP2 de tipo salvaje y/o VP3 de tipo salvaje. En algunas formas de
15 realización, el serotipo de la cápside del AAV de tipo salvaje de referencia puede ser AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-8, AAV-9 o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el serotipo de la cápside del AAV de tipo salvaje puede ser AAV-9. Las cápsides de AAV modificadas pueden tener un tropismo diferente al de la cápside del AAV de tipo salvaje de referencia.

La cápside viral modificada puede contener entre 1 y 60 proteínas de cápside
20 modificadas. En algunas formas de realización, las cápsides virales modificadas pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 proteínas de la cápside modificadas. En algunas
25 formas de realización, la cápside viral modificada puede contener 0-59 proteínas de la cápside viral de tipo salvaje. En algunas formas de realización, la cápside viral modificada puede contener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, o 59 proteínas de la cápside viral de tipo
30 salvaje.

En algunas formas de realización, la cápside del AAV modificada puede contener 1-60 proteínas de la cápside modificadas. En algunas formas de realización, las cápsides de AAV modificadas pueden contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41,

42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 proteínas de la cápside modificadas. En algunas formas de realización, la cápside del AAV modificada puede contener 0-59 proteínas de la cápside del AAV de tipo salvaje. En algunas formas de realización, la cápside del AAV modificada puede contener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
5 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, o 59 proteínas de la cápside del AAV de tipo salvaje.

En algunas formas de realización, la proteína de la cápside viral modificada puede tener un motivo de aminoácidos *n*-mero, donde *n* puede ser por lo menos 3 aminoácidos.
10 En algunas formas de realización, *n* puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 aminoácidos. En algunas formas de realización, una cápside de AAV modificada puede tener un motivo de aminoácidos de 6 o 7 meros. En algunas formas de realización, el motivo de aminoácido *n*-mero se puede insertar entre dos aminoácidos en la proteína viral de tipo salvaje (VP) (o proteína de la cápside). En algunas formas de realización, el motivo *n*-mero
15 se puede insertar entre dos aminoácidos en una región de aminoácidos variable en una proteína de la cápside viral.

En algunas formas de realización, el motivo *n*-mero se puede insertar entre dos aminoácidos en una región de aminoácidos variable en una proteína de la cápside de AAV. El núcleo de cada proteína viral del AAV de tipo salvaje contiene un motivo de barril beta
20 de ocho cadenas (betaB a betaI) y una hélice alfa (alfaA) que se conservan en las cápsides autónomas del parvovirus (véase, por ejemplo, DiMattia et al. 2012. J. Virol. 86(12):6947-6958). Las regiones variables estructurales (RV) se encuentran en los bucles superficiales que conectan las hebras beta, las cuales se agrupan para producir variaciones locales en la superficie de la cápside. Los AAV tienen 12 regiones variables (también conocidas como
25 regiones hipervariables) (véase por ejemplo, Weitzman and Linden. 2011. “Adeno-Associated Virus Biology.” In Snyder, R.O., Moullier, P. (eds.) Totowa, NJ: Humana Press). En algunas formas de realización, es posible insertar uno o más motivos *n*-meros entre dos aminoácidos en una o más de las 12 regiones variables en las proteínas de la cápside del AAV de tipo salvaje. En algunas formas de realización, el o los motivos *n*-
30 meros pueden insertarse respectivamente entre dos aminoácidos en VR-I, VR-II, VR-III, VR-IV, VR-V, VR-VI, VR-VII, VR-III, VR-IX, VR-X, VR-XI, VR-XII, o una combinación de los mismos. En algunas formas de realización, el *n*-mero se puede insertar entre dos aminoácidos en el VR-III de una proteína de la cápside. En algunas formas de realización, la cápside modificada puede tener un *n*-mero insertado entre dos aminoácidos

contiguos cualesquiera entre los aminoácidos 262 y 269, entre dos aminoácidos contiguos cualesquiera entre los aminoácidos 327 y 332, entre dos aminoácidos contiguos cualesquiera entre los aminoácidos 382 y 386, entre dos aminoácidos contiguos cualesquiera entre los aminoácidos 452 y 460, entre dos aminoácidos contiguos
5 cualesquiera entre los aminoácidos 488 y 505, entre dos aminoácidos contiguos cualesquiera entre los aminoácidos 545 y 558, entre dos aminoácidos contiguos cualesquiera entre los aminoácidos 581 y 593, entre dos aminoácidos contiguos cualesquiera entre los aminoácidos 704 y 714 de una proteína viral AAV9. En algunas formas de realización, la cápside modificada puede tener un n-mero insertado entre los
10 aminoácidos 588 y 589 de una proteína viral AAV9. En algunas formas de realización, la cápside modificada puede tener un motivo de 7 meros insertado. entre los aminoácidos 588 y 589 de una proteína viral AAV9. En otras formas de realización, el motivo insertado es un motivo de 10 meros, con el reemplazo de los aminoácidos 586-88 y una inserción antes de 589. La SEQ ID NO. 1 es una secuencia de la cápside de AAV9 de referencia para al
15 menos hacer referencia a los sitios de inserción antes expuestos. Se apreciará que los n-meros se pueden insertar en posiciones análogas en las proteínas virales AAV de otros serotipos.. En algunas formas de realización según se ha expuesto, el o los *n*-meros pueden insertarse entre dos aminoácidos contiguos dentro de la proteína viral del AAV y en algunas formas de realización la inserción se lleva a cabo en una región variable.

20 En algunas formas de realización, los primeros 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de un motivo n-mero pueden reemplazar 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de un polipéptido en el que está insertado y que precede al sitio de inserción. En algunas formas de realización, los aminoácidos del motivo n-mero que reemplazan 1 o más aminoácidos del polipéptido en el que se inserta el motivo n-mero aparecen antes o inmediatamente antes de un “RGD” en un motivo n-mero.
25 Por ejemplo, en uno o más de los insertos de 10 meros, los tres primeros aminoácidos mostrados pueden reemplazar de 1 a 3 aminoácidos en un polipéptido en el que se insertan. Utilizando un AAV como otro ejemplo no limitativo, uno o más de los motivos n-mero pueden insertarse, por ejemplo, en el polipéptido de la cápside de AAV9 entre los aminoácidos 588 y 589, y el inserto puede reemplazar los aminoácidos 586, 587 y 588, de
30 modo que el aminoácido inmediatamente anterior al motivo n-mero tras la inserción sea el residuo 585. Se advertirá que este principio puede aplicarse en cualquier otro contexto de inserción y no se limita necesariamente a la inserción entre los residuos 588 y 589 de una cápside de AAV9 o una posición equivalente en otra cápside de AAV. Además, se apreciará

que, en algunas formas de realización, ningún aminoácido del polipéptido en el que se inserta el motivo n-mero se reemplaza por dicho motivo.

En algunas formas de realización, las cápsides de AAV u otras cápsides o composiciones virales pueden ser específicas de músculo. En algunas formas de realización, la especificidad muscular del AAV modificado u otra cápside viral u otra composición se confiere mediante un motivo n-mérico específico de músculo incorporado en el AAV modificado u otra cápside viral u otra composición descrita en la presente. Sin pretender limitarse a la teoría, se cree que el motivo n-mero confiere una estructura 3D a o dentro de un dominio o región de la cápside de AAV modificada u otra cápside viral u otra composición de modo que la interacción de la partícula viral u otra composición que contiene la cápside de AAV modificada u otra cápside viral u otra composición descrita en la presente ha aumentado o mejorado las interacciones (por ejemplo, aumentado la afinidad) con un receptor de la superficie celular y/u otra molécula en la superficie de una célula muscular. En algunas formas de realización, el receptor de la superficie celular es un receptor de AAV (AAVR). En algunas formas de realización, el receptor de la superficie celular es un receptor de AAV específico de células musculares. En algunas formas de realización, el receptor o molécula de la superficie celular es un receptor de la superficie celular u otra molécula expresada selectivamente en la superficie de una célula muscular. En algunas formas de realización, el receptor o molécula de la superficie celular es una integrina o un dímero del mismo.. En algunas formas de realización, el receptor o molécula de la superficie celular es un heterodímero de integrina Vb6.

En algunas formas de realización, una partícula viral modificada específicamente para el músculo u otra composición descrita en la presente que contiene la cápside específica de músculo, motivo n-mero, o fracción de dirección específica al músculo descrita en la presente puede tener una mayor captación, tasa de administración, tasa de transducción, eficiencia, cantidad o una combinación de estas características en una célula muscular en comparación con otros tipos de células y/u otras partículas de virus (incluidos, entre otros, los AAV) y otras composiciones que no contienen el motivo n-mero específico de músculo de la presente invención.

Se desarrollaron cápsides de AAV específicas de músculo de primera y segunda generación utilizando un promotor específico de músculo y las bibliotecas de cápsides resultantes se examinaron en ratones y primates no humanos conforme lo descrito en otras secciones de la presente y/o por ejemplo, en las Solicitudes de Patente Provisional

Estadounidense Números 62/899.453, 62/916.207, 63/018.454, 63/242.008, y Número 63/345.14.

Composición farmacéutica

5 Algunas formas de realización de la invención pueden incluir cualquier forma aceptable de proporcionar el vector de AAV a un sujeto. Por ejemplo, el vector de AAV puede proporcionarse al sujeto en forma de una composición o formulación que comprende el vector de AAV. El vector de expresión de la presente invención puede formularse y administrarse para tratar una variedad de estados de enfermedad por cualquier medio que
10 produzca contacto del ingrediente activo con el sitio de acción del agente en el cuerpo del sujeto. Las composiciones, polinucleótidos, polipéptidos, partículas, células, sistemas de vectores y combinaciones de los mismos descritos en la presente pueden estar contenidos en una formulación, tal como una formulación farmacéutica. En algunas formas de realización, las formulaciones se pueden usar para generar polipéptidos y otras partículas
15 que incluyen una o más fracciones dirigidas a músculos específicos descritas en la presente. En algunas formas de realización, las formulaciones pueden administrarse a un sujeto que las necesite. En algunas formas de realización, el o los componentes del sistema de cápside de AAV modificada, células modificadas, partículas de la cápside de AAV modificadas, y/o combinaciones de los mismos descritos en la presente pueden incluirse
20 en una formulación que puede administrarse a un sujeto o a una célula. En algunas formas de realización, la formulación es una formulación farmacéutica. Uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente pueden administrarse a un sujeto que lo necesite, o a una célula como ingrediente activo, por ejemplo, en una formulación farmacéutica. Así, también se
25 describen formulaciones farmacéuticas que contienen una cantidad de uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células o combinaciones de los mismos descritos en la presente. En algunas formas de realización, la formulación farmacéutica puede contener una cantidad efectiva de uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente. Las formulaciones
30 farmacéuticas descritas en la presente pueden administrarse a un sujeto que las necesite o a una célula.

 En algunas formas de realización, la cantidad del o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células, partículas de virus, nanopartículas, otras partículas de administración y combinaciones de los mismos descritos en la presente contenidos en la

formulación farmacéutica puede oscilar entre aproximadamente 1 pg/kg y aproximadamente 10 mg/kg en base al peso corporal del sujeto que lo necesita o el peso corporal promedio de la población de pacientes específica a la que se puede administrar la formulación farmacéutica. La cantidad del o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente en la formulación farmacéutica puede oscilar entre aproximadamente 1 pg y aproximadamente 10 g, entre aproximadamente 10 nL y aproximadamente 10 mL. En las formas de realización donde la formulación farmacéutica contiene una o más células, la cantidad puede oscilar entre aproximadamente 1 célula y 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} o más células. En las formas de realización donde la formulación farmacéutica contiene una o más células, la cantidad puede oscilar entre aproximadamente 1 célula y 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} o más células por nL, μ L, mL, o L.

En las formas de realización donde se incluyen partículas de la cápside de AAV modificadas en la formulación, la formulación puede contener entre 1 y 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} , 1×10^{18} , 1×10^{19} , o 1×10^{20} unidades de transducción (TU)/mL de las partículas de la cápside del AAV modificadas. En algunas formas de realización, la formulación puede oscilar entre 0,1 y 100 mL en volumen y puede contener entre 1 y 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} , 1×10^{18} , 1×10^{19} , o 1×10^{20} unidades de transducción (TU)/mL de las partículas de la cápside del AAV modificadas.

Portadores farmacéuticamente aceptables e ingredientes y agentes auxiliares

En ciertas formas de realización, la formulación farmacéutica que contiene una cantidad de uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células, partículas de virus, nanopartículas, otras partículas de administración y combinaciones de los mismos descritos en la presente puede incluir además un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, entre otros, agua, soluciones salinas, alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos

grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona, que no reaccionen de forma perjudicial con la composición activa.

Las formulaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionen de manera perjudicial con la composición activa.

En algunas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente pueden presentarse en una forma de dosificación. Las formas de dosificación se pueden adaptar para su administración por cualquier vía apropiada. Las vías adecuadas incluyen, entre otras, la oral (incluida bucal o sublingual), rectal, epidural, intracraneal, intraocular, inhalada, intranasal, tópica (incluida bucal, sublingual o transdérmica), vaginal, intrauretral, parenteral, intracraneal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intraósea, intracardíaca, intraarticular, intracavernosa, intratecal, intravítrea, intracerebral, gingival, subgingival, intracerebroventricular e intradérmica. Dichas formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica.

Las formas de dosificación adaptadas para administración oral pueden ser unidades de dosificación independientes tales como cápsulas, pellets o comprimidos, polvos o gránulos, soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles, o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite. En algunas formas de realización, las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administración oral además incluyen uno o más agentes que dan sabor, conservan, colorean o ayudan a dispersar la formulación farmacéutica. Las formas de dosificación preparadas para administración oral también pueden presentarse en forma de una solución líquida que puede administrarse como espuma, aerosol o solución líquida. En algunas formas de realización, la forma de dosificación oral puede contener entre 1 ng y 1000 g de una formulación farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva o una fracción apropiada de la proteína de fusión efectora dirigida y/o su complejo, o una composición que contiene uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente. La forma farmacéutica oral puede administrarse a un sujeto que la necesite.

Cuando resulte apropiado, las formas de dosificación descritas en la presente pueden ser microencapsuladas.

La forma de dosificación también se puede preparar para prolongar o sostener la liberación de cualquier ingrediente. En algunas formas de realización, el o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente pueden ser los ingredientes cuya liberación es retardada. En otras formas de realización, se

5 retrasa la liberación de un ingrediente auxiliar incluido opcionalmente. Los métodos adecuados para retrasar la liberación de un ingrediente incluyen, entre otros, el recubrimiento o la incrustación de los ingredientes en materiales como polímeros, ceras, geles, etc. Las formulaciones de dosificación de liberación retardada pueden prepararse conforme lo descrito en referencias estándar, como "Pharmaceutical dosage form tablets,"

10 eds. Liberman et. al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, y "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6th Edition, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995). Estas referencias proporcionan información sobre excipientes, materiales, equipos y procesos para preparar comprimidos y cápsulas y

15 formas farmacéuticas de liberación retardada de comprimidos y pellets, cápsulas y gránulos. La liberación retardada puede oscilar entre aproximadamente una hora y aproximadamente 3 meses o más.

Los ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen, entre otros, polímeros de celulosa tales como ftalato de acetato de celulosa, hidroxipropilcelulosa,

20 hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa; ftalato de acetato de polivinilo, polímeros y copolímeros de ácido acrílico y resinas metacrílicas comercializadas bajo la denominación comercial EUDRAGIT® (Roth Pharma, Westerstadt, Alemania), zeína, goma laca y polisacáridos.

Los recubrimientos se pueden formar con una proporción diferente de polímero

25 soluble en agua, polímeros insolubles en agua y/o polímeros dependientes del pH, con o sin excipiente no polimérico insoluble en agua/soluble en agua, para producir el perfil de liberación deseado. El recubrimiento se realiza sobre la forma de dosificación (matricial o simple) que incluye, pero no se limita a, comprimidos (comprimidos con o sin perlas recubiertas), cápsulas (con o sin perlas recubiertas), perlas, composiciones de partículas,

30 "ingrediente per se" formulado como, pero no limitado a, una forma de suspensión o como una forma de dosificación para espolvorear.

Las formas de dosificación adaptadas para administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, aerosoles o aceites. En algunas formas de realización para tratamientos de los ojos u otros tejidos

externos, por ejemplo la boca o la piel, las formulaciones farmacéuticas se aplican como una pomada o crema tópica. Cuando se formulan en una pomada, el o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente pueden formularse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. En algunas formas de realización, el ingrediente activo puede formularse en crema con una base de aceite en agua o de agua en aceite. Las formas de dosificación adaptadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas, píldoras y enjuagues bucales.

Las formas de dosificación adaptadas para administración nasal o por inhalación incluyen aerosoles, soluciones, gotas de suspensión, geles o polvos secos. En algunas formas de realización, el o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente que están contenidos en una forma de dosificación adaptada para inhalación están en una forma de tamaño de partícula reducido que se obtiene o se puede obtener por micronización. En algunas formas de realización, el tamaño de partícula del compuesto de tamaño reducido (por ejemplo, micronizado) o de su sal o solvato, se define por un valor D50 de aproximadamente entre 0,5 y aproximadamente 10 micrones, medido mediante un método apropiado conocido en la técnica. Las formas de dosificación adaptadas para la administración por inhalación también incluyen polvos o nieblas de partículas. Las formas farmacéuticas adecuadas, en las que el portador o excipiente es un líquido para la administración como aerosol nasal o gotas, incluyen soluciones o suspensiones acuosas u oleosas de un ingrediente activo. (por ejemplo, el o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente y/o el agente activo auxiliar), que pueden generarse mediante diversos tipos de aerosoles presurizados de dosis medida, nebulizadores o insufladores.

En algunas formas de realización, las formas de dosificación pueden ser formulaciones en aerosol adecuadas para la administración por inhalación. En algunas de estas formas de realización, la formulación en aerosol puede contener una solución o una suspensión fina de uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente y un disolvente acuoso o no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones en aerosol pueden presentarse en dosis únicas o múltiples, en forma estéril, en un envase sellado. Para algunas de estas formas de realización, el envase sellado es un dispensador nasal de dosis única o multidosis, o un dispensador de aerosol equipado con una válvula dosificadora (por ejemplo, un inhalador de dosis medida), que se descarta una vez que se haya agotado su contenido.

Cuando la forma de dosificación en aerosol está contenida en un dispensador de aerosol, el dispensador contiene un propelente adecuado bajo presión, como aire comprimido, dióxido de carbono o un propelente orgánico, incluido, entre otros, un hidrofluorocarbono. En otras formas de realización, las formas de dosificación de la formulación en aerosol se encuentran contenidas en un atomizador de bomba. La formulación en aerosol presurizada también puede contener una solución o suspensión de uno o más de los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente. En formas de realización adicionales, la formulación en aerosol también puede contener codisolventes y/o modificadores incorporados para mejorar, por ejemplo, la estabilidad y/o el sabor y/o las características de masa de las partículas finas (cantidad y/o perfil) de la formulación. La administración de la formulación en aerosol puede ser una vez al día o varias veces al día, por ejemplo 2, 3, 4 u 8 veces al día, en las que se administran 1, 2 o 3 dosis cada vez.

Para algunas formas de dosificación adecuadas o adaptadas para la administración inhalada, la formulación farmacéutica es una formulación inhalable de polvo seco. Además del o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente, un ingrediente activo auxiliar y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dicha forma de dosificación puede contener una base en polvo como lactosa, glucosa, trehalosa, manitol y/o almidón.. En algunas de estas formas de realización, el o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente está en forma de partículas reducidas en tamaño. En formas de realización adicionales, un modificador del rendimiento, como L-leucina u otro aminoácido, octaacetato de celobiosa y/o sales metálicas de ácido esteárico, como estearato de magnesio o calcio.

En algunas formas de realización, las formas de dosificación en aerosol se pueden organizar de modo que cada dosis medida de aerosol contenga una cantidad predeterminada de un ingrediente activo, tal como el o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descritos en la presente.

Las formas de dosificación adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosoles. Las formas farmacéuticas adaptadas para administración rectal incluyen supositorios o enemas.

Las formas de dosificación adaptadas para administración parenteral y/o adaptadas para cualquier tipo de inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraósea, epidural, intracardíaca, intraarticular,

intracavernosa, gingival, subgingival, intratecal, intravítrea, intracerebral e intracerebroventricular) pueden incluir soluciones de inyección estériles acuosas y/o no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del sujeto y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formas de dosificación adaptadas para administración parenteral pueden presentarse en envases de dosis unitarias únicas o de dosis múltiples, incluyendo pero no limitado a ampollas o viales sellados. Las dosis pueden liofilizarse y resuspenderse en un excipiente estéril para reconstituir la dosis antes de su administración. Es posible preparar soluciones y suspensiones para inyección extemporánea en diversas formas de realización, a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

Las formas de dosificación adaptadas para administración ocular pueden incluir soluciones estériles acuosas y/o no acuosas que opcionalmente pueden adaptarse para inyección, y que opcionalmente pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la composición sea isotónica con el ojo o el fluido contenido en el mismo o alrededor del ojo del sujeto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Para algunas formas de realización, la forma de dosificación contiene una cantidad predeterminada del o los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, células y combinaciones de los mismos descriptos en la presente por dosis unitaria. En algunas formas de realización, la cantidad predeterminada de tales dosis unitarias por lo tanto pueden administrarse una o más veces al día. Dichas formulaciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica.

Incorporación como referencia

A lo largo de esta divulgación se han incluido referencias y citas a otros documentos, como patentes, solicitudes de patentes, publicaciones de patentes, revistas, libros, artículos, contenidos web. Todos estos documentos quedan incorporados a la presente como referencia en su totalidad a todo efecto.

Equivalentes

Diversas modificaciones de la invención y muchas otras formas de realización de la misma, además de las ilustradas y descritas, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir del contenido completo de esta memoria, incluyendo las referencias a la

literatura científica y de patentes citadas. La materia de la presente contiene información importante, ejemplos y orientación que pueden adaptarse a la práctica de la invención en sus diversas formas de realización y equivalentes.

EJEMPLOS

5 Expresión in vitro de disferlina

Se generaron plásmidos de disferlina-inteína para experimentos *in vitro* en células de riñón embrionario humano (HEK293T).

10 **La Figura 4** es un diagrama de los plásmidos utilizados para transfectar células HK293T donde la disferlina-inteína se expresa bajo el control de un promotor CMV ubicuamente activo. Cada ácido nucleico está empaquetado entre regiones ITR y comprende elementos reguladores, incluido un promotor de citomegalovirus (CMV) y una cola de poli-A. Un ácido nucleico proporcionó la porción N-terminal de la proteína disferlina junto con la porción N-terminal de una inteína dividida mientras que un segundo ácido nucleico proporcionó la porción C-terminal de la proteína disferlina junto con la
15 porción C-terminal de una inteína dividida.

Se probaron 5 construcciones de inteínas diferentes: M86, Rma, Ssp, Npu, y Mja.

La Figura 5 es un western blot anti-HA de HEK293T transfectadas con los plásmidos disferlina-inteína.

20 **La Figura 6** es un western blot anti-FLAG de HEK293T transfectadas con los plásmidos disferlina-inteína.

Según lo ilustrado, cuando se proporcionaron las moléculas de ácido nucleico N-terminal y C-terminal *in vitro*, la proteína disferlina de longitud completa (~230 kDa) se formó en las células HEK293T, y la construcción Rma proporcionó resultados sólidos.

25 Se analizó además la construcción de inteína Rma para la expresión de la proteína disferlina en líneas celulares de mioblastos de ratón C2C12 diferenciados de tipo salvaje o deficientes en disferlina mediante transducción de AAV.

30 **La Figura 7** es un diagrama de las construcciones utilizadas para transducir las células C2C12. Cada ácido nucleico se empaqueta entre las regiones ITR. Un ácido nucleico proporcionó la porción N-terminal de la proteína disferlina junto con la porción N-terminal de la Rma-inteína, mientras que un segundo ácido nucleico proporcionó la porción C-terminal de la proteína disferlina junto con la porción C-terminal de la Rma-inteína.

La Figura 8 es un western blot anti-HA de miotubos C2C12 transducidos con AAV-disferlina-inteína.

La Figura 9 es un western blot anti-FLAG de miotubos C2C12 transducidos con AAV-disferlina-inteína.

5 **La Figura 10** es un Western blot de miotubos C2C12 deficientes en disferlina transducidos con el AAV-disferlina-inteína.

La Figura 11 es un Western blot de miotubos C2C12 deficientes en disferlina transducidos con el AAV-disferlina-inteína.

10 Según lo ilustrado, cuando se proporcionaron moléculas de ácido nucleico N-terminal y C-terminal de Rma-inteína *in vitro*, la proteína disferlina de longitud completa (~230 kDa) se formó en los miotubos C2C12 KO de disferlina. Sorprendentemente, la expresión de la proteína disferlina de longitud completa fue mayor que la expresión de disferlina en células de tipo salvaje no transducidas.

15 Expresión *in vivo* de disferlina

Se evaluó la expresión de disferlina de longitud completa en ratones con el alelo de distrofia muscular progresiva (prmd) de la cepa endogámica A/J (ratones BLA/J) *in vivo* tras la administración sistémica de la construcción MyoAAV-disferlina-inteína a una concentración de $1,6 \times 10^{13}$ vg/kg. Se utilizó un anticuerpo que reconoce la disferlina para
20 el análisis de la expresión de la proteína.

Los ratones se dividieron en dos grupos. Al grupo 1 se le extrajeron los tejidos 2 semanas luego de la inyección. Al grupo 2 se le extrajeron los tejidos 4 semanas luego de la inyección.

25 **La Figura 12** es un Western blot de la expresión de disferlina en ratones BLA/J *in vivo* luego de la administración del AAV-disferlina-inteína.

La Figura 13 es un gráfico de barras de la expresión de disferlina en ratones BLA/J *in vivo* luego de la administración de AAV-disferlina-inteína.

La Figura 14 es un Western blot de la expresión de disferlina en ratones BLA/J *in vivo* luego de la administración del AAV-disferlina-inteína.

30 **La Figura 15** es un gráfico de barras de la expresión de disferlina en ratones BLA/J *in vivo* luego de la administración de AAV-disferlina-inteína.

La disferlina de longitud completa se expresó en todos los grupos y en los tejidos del gastrocnemio. Para la semana 4, los ratones del Grupo 2 mostraron una mayor expresión de disferlina en el tejido del gastrocnemio que los ratones de tipo salvaje.

Expresión de inteína dividida

La disferlinopatía (LGMD2B, LGMDR1, miopatía de Myoshi) es una miopatía genética causada por mutaciones en el gen DYSF que provoca la ausencia de disferlina, una proteína de membrana implicada en la reparación de la membrana muscular (parche de membrana). La deficiencia de disferlina compromete la integridad del sarcolema y provoca degeneración muscular progresiva. La terapia de reemplazo génico es una estrategia terapéutica prometedora para la disferlinopatía. Sin embargo, la secuencia codificante de la disferlina (~6,2 kb) supera la capacidad de empaquetamiento de un único AAV. Para superar este obstáculo, se han propuesto estrategias de AAV dual basadas en la recombinación homóloga de dos genomas vector en mionúcleos para expresar la disferlina completa en músculos animales. El requisito de entregar los genomas vectoriales de los dos AAV a los mismos núcleos en las fibras musculares, así como la baja eficiencia de la recombinación homóloga en células post mitóticas, da como resultado una producción ineficaz de disferlina de longitud completa con este enfoque.

La presente invención proporciona una estrategia de AAV dual alternativa que utiliza inteínas divididas para expresar la disferlina de longitud completa.

Detalles experimentales

Se utilizó un sistema de vector dual en el que dos segmentos de la proteína disferlina se expresaron individualmente y la proteína de longitud completa se generó mediante empalme de proteínas en el citoplasma de la fibra muscular.

(1) Se analizaron *in vitro* múltiples inteínas divididas. Las células HEK293T se transfectaron con construcciones de inteína disferlina divididas. 72 horas después de la transfección, se recolectaron las células y se prepararon lisados de proteínas para el análisis Western blot.

(2) Se cultivaron mioblastos de ratón C2C12 deficientes en disferlina y se diferenciaron durante 96 horas. Los miotubos se transdujeron con vectores de disferlina MyoAAV divididos y se recolectaron 72 horas después de la transducción. La expresión de la proteína disferlina se evaluó mediante electroforesis capilar Jess.

(3) Se administraron vectores duales de disferlina MyoAAV por vía sistémica a ratones deficientes en disferlina (Bla/J) a una dosis de 1,6-13 vg/kg. La expresión de la proteína disferlina se midió mediante electroforesis capilar 2 y 4 semanas luego de la inyección.

(4) Se administraron vectores duales de MyoAAV sistémicamente en ratones Bla/J a una dosis de 1E13 vg/kg. Aproximadamente 9-10 semanas luego de la inyección, el músculo tibial anterior se tensó mediante ciclos repetitivos controlados de contracción excéntrica. Veinticuatro horas después de la lesión por distensión, se administró el colorante azul de Evan (EBD) por vía intraperitoneal. Entre 16 y 24 horas luego de la inyección de EBD, se recogieron tejidos para histología. La captación de EBD se evaluó mediante imágenes de fluorescencia y se cuantificó como medida de la falta de reparación de la membrana. Los tejidos también se analizaron mediante inmunofluorescencia para evaluar la expresión de disferlina.

La Figura 16 es un esquema de la estrategia de inteína dividida. La secuencia codificante de la disferlina humana se dividió en dos casetes AAV. Se agregaron inteínas divididas al final del extremo N-terminal de la disferlina y al inicio del extremo C-terminal de la disferlina. Las construcciones de disferlina dividida se empaquetaron en MyoAAV. Se coadministraron/transdujeron vectores duales, lo que resultó en la expresión de fragmentos de disferlina N-terminal + N-inteína y C-inteína + disferlina C-terminal y el posterior empalme de la proteína, lo que produjo la expresión de la proteína disferlina de longitud completa.

(1) Múltiples inteínas divididas analizadas in vitro

Se transfectaron células HEK293T con construcciones de inteína disferlina dividida. 72 horas después de la transfección, se recolectaron las células y se prepararon lisados de proteína para el análisis Western blot.

La Figura 17 es un análisis Western blot de inteínas de disferlina. Las células se transfectaron con construcciones individuales de disferlina N-terminal y C-terminal, o se cotransfectaron con construcciones de ambos extremos. La expresión de la proteína se evaluó mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico para disferlina N-terminal. El análisis *in vitro* identificó la inteína B dividida como la más eficiente para el empalme de la proteína disferlina. La inclusión de la inteína B resultó en la máxima expresión de la proteína disferlina de longitud completa (~237 kDa).

(2) Mioblastos de ratón C2C12 deficientes en disferlina

Se cultivaron mioblastos de ratón C2C12 deficientes en disferlina y se diferenciaron durante 96 horas. Los miotubos se transdujeron con vectores de disferlina MyoAAV

divididos duales y se recolectaron 72 horas después de la transducción. La expresión de la proteína disferlina se evaluó mediante electroforesis capilar Jess.

La Figura 18A-B muestra los resultados de la electroforesis capilar luego de la transducción de inteína dividida en miotubos de ratón. Los vectores MyoAAV individuales dan como resultado la expresión de fragmentos N-terminales y C-terminales de la proteína disferlina detectables mediante electroforesis capilar utilizando anticuerpos específicos para la disferlina N-terminal (**Figura 18A**) y C-terminal (**Figura 18B**). Los miotubos transducidos con vectores duales que contienen inteína B dividida expresan disferlina de longitud completa (~237 kDa).

(3) Vectores duales de disferlina administrados a ratones deficientes en disferlina 2 y 4 semanas luego de la inyección

Se administraron vectores duales de disferlina MyoAAV por vía sistémica a ratones deficientes en disferlina (Bla/J) a una dosis de 1,6-13 vg/kg. La expresión de la proteína disferlina se midió mediante electroforesis capilar 2 y 4 semanas luego de la inyección.

La Figura 19A-D muestra la expresión de disferlina en ratones deficientes tras la administración del vector. La expresión de la proteína disferlina en el gastrocnemio de ratones Bla/J tratados con MyoAAV duales (a 1,6E+13 vg/kg, 8E+12 vg/kg por vector) fue de ~40-60% en comparación con los niveles endógenos de proteína disferlina en ratones de tipo salvaje (WT) 2 semanas luego de la inyección y >100% en comparación con WT a las 4 semanas. La disferlina de longitud completa es detectable utilizando anticuerpos específicos tanto para disferlina N-terminal (**Figura 19A-B**) y C-terminal (**Figura 19C-D**).

(4) Vectores duales de disferlina administrados a ratones deficientes en disferlina entre 9 y 10 semanas luego de la inyección

Se administraron vectores duales MyoAAV sistémicamente a ratones Bla/J a una dosis de 1E13 vg/kg. Aproximadamente 9-10 semanas luego de la inyección, el músculo tibial anterior se tensó mediante ciclos repetitivos controlados de contracción excéntrica. Veinticuatro horas después de la lesión por distensión, se administró el colorante azul de Evan (EBD) por vía intraperitoneal. Entre 16 y 24 horas después de la inyección de EBD, se recogieron tejidos para histología. La captación de EBD se evaluó mediante imágenes de fluorescencia y se cuantificó como medida de la falta de reparación de la membrana. Los tejidos también se analizaron mediante inmunofluorescencia para evaluar la expresión de disferlina.

La Figura 20 muestra imágenes de la expresión de la proteína disferlina en el músculo tibial anterior tras la administración del vector. Se demostró una expresión generalizada de la proteína disferlina en todo el músculo tibial anterior (TA) de los animales Bla/J tratados. Tinción inmunofluorescente con disferlina del músculo TA de ratones C57BL/6 de tipo salvaje y ratones Bla/J tratados con vehículo o MyoAAV dual a $1\text{E}+13$ vg/kg ($5\text{E}+12$ vg/kg por vector).

La Figura 21 muestra imágenes de la reparación de la membrana en ratones luego de la administración del vector. Imágenes fluorescentes con colorante azul de Evans (EBD) de ratones Bla/J de tipo salvaje, tratados con vehículo y con MyoAAV dual, sometidos a distensión (TA derecho) y sin lesión (TA izquierdo). El TA dañado de los ratones tratados con vehículo contiene mayor número de fibras EBD+ en comparación con el TA de control, lo que indica una deficiencia en la reparación de la membrana tras la lesión por distensión. La tinción con EBD es similar para el TA dañado y el de control en ratones Bal/J de tipo salvaje y tratados con MyoAAV, lo que demuestra una reparación eficaz de la membrana luego de una lesión.

Las Figuras 22 A-B son gráficos que muestran la cuantificación de la reparación de la membrana en ratones luego de la administración del vector.

La comparación del porcentaje de área positiva de tinción con azul de Evans (EBD) en el TA dañado en comparación con el TA contralateral no lesionado dentro de cada grupo (**Figura 22A**) y el TA dañado entre todos los grupos (**Figura 22B**) muestra una diferencia significativa en el área EBD+ entre el TA dañado y el TA de control para los ratones tratados con el vehículo (A). También existe una diferencia significativa en el área EBD+ en el TA dañado de los ratones del vehículo en comparación con el TA dañado de los animales Bla/J tratados con WT o MyoAAV (B).

Análisis

Se demostró con éxito *in vitro* e *in vivo* la producción altamente eficiente de la proteína disferlina de longitud completa tras la administración de vectores duales MyoAAV que codifican fragmentos N-terminales y C-terminales de disferlina conjugados con inteínas divididas. El análisis *in vitro* de diferentes inteínas divididas identificó a la inteína B como la más eficaz para la expresión de disferlina de longitud completa. Con base en estos datos, se probó un candidato de MyoAAV dual que contenía la inteína B dividida en miotubos y mostró una alta eficiencia de reconstitución y producción de proteína disferlina de longitud completa. La administración sistémica de MyoAAV duales en ratones Bla/J a

dosis bajas resultó en una expresión fisiológica o suprafisiológica de disferlina de longitud completa en los músculos esqueléticos. El análisis de inmunofluorescencia mostró una expresión generalizada de disferlina en la mayoría de las fibras musculares, lo que mejoró la reparación de la membrana después de una lesión por distensión en los músculos Bla/J.

- 5 Los resultados proporcionan evidencia de la viabilidad de utilizar una estrategia de AAV dual que emplee inteínas divididas para la expresión efectiva de la proteína disferlina de longitud completa en el músculo distrófico tras la administración sistémica de MyoAAV en dosis bajas.

- 10 Las composiciones y métodos de la invención permiten la expresión mediante inteína dividida de la disferlina en las células musculares.