

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que comprende una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en donde la inserción es en el AAV2 o una posición correspondiente en una porción de la cápside de un serotipo de AAV de tipo silvestre que no sea AAV2 o una variante de AAV, y en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en ISDQTKH (SEQ ID NO:14), QADTTKN (SEQ ID NO:13), ASDSTKA (SEQ ID NO:15), NQDYTKT (SEQ ID NO:16), HDITKNI (SEQ ID NO:17), HPDTTKN (SEQ ID NO:18), HQDTTKN (SEQ ID NO:19), NKTTNKD (SEQ ID NO:20), ISNENEH (SEQ ID NO:21), QANANEN (SEQ ID NO:22), GKSKVID (SEQ ID NO:23), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25), KDRAPST (SEQ ID NO:26), LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27), LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29), LAASDSTKAA (SEQ ID NO:30), LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31), LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32), LAHPDTTKNA (SEQ ID NO:33), LAHQDTTKNA (SEQ ID NO:34), LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35), LPISNENEHA (SEQ ID NO:36), LPQANANENA (SEQ ID NO:37), LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38), LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39), LAPNSTHGSA (SEQ ID NO:40) y LAKDRAPSTA (SEQ ID NO:41).

2. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína de la cápside comprende una o más mutaciones puntuales en relación con AAV2 o una o más mutaciones puntuales correspondientes en relación con otros serotipos de AAV de tipo silvestre o variantes de AAV.

3. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 2, en donde una o más mutaciones puntuales se seleccionan del grupo que consiste en M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, N312K, P363L, D368H, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V708I, V719M, S721L, y L735Q.

4. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inserción peptídica se inserta siguiendo cualquiera de los aminoácidos en las posiciones 570-671 en VP1 de AAV2 o una posición correspondiente en otro serotipo de AAV de tipo silvestre o variante de AAV.

5. La variante AAV de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la inserción peptídica se inserta después del aminoácido 587 en VP1 de AAV2 o una posición correspondiente en otro serotipo de AAV.

6. Un virión infeccioso del virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende: (a) una proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación

1, y un ácido nucleico heterólogo.

7. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un agente de interferencia de ARN o un polipéptido.

8. Un método para administrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana, que comprende poner en contacto una célula diana con el virión del rAAV de acuerdo con la reivindicación 7.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la célula diana es una célula retiniana.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la célula diana está *in vitro*.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la célula diana está *in vivo*.

12. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de la proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) que comprende una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en donde la inserción es en el AAV2 o una posición correspondiente en una porción de la cápside de un serotipo de AAV de tipo silvestre diferente de AAV2 o una variante de AAV, y en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en ISDQTKH (SEQ ID NO:14), QADTTKN (SEQ ID NO:13), ASDSTKA (SEQ ID NO:15), NQDYTKT (SEQ ID NO:16), HDITKNI (SEQ ID NO:17), HPDTTKN (SEQ ID NO:18), HQDTTKN (SEQ ID NO:19), NKTTNKD (SEQ ID NO:20), ISNENEH (SEQ ID NO:21), QANANEN (SEQ ID NO:22), GKSKVID (SEQ ID NO:23), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25), KDRAPST (SEQ ID NO:26), LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27), LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29), LAASDSTKAA (SEQ ID NO:30), LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31), LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32), LAHPDTTKNA (SEQ ID NO:33), LAHQDTTKNA (SEQ ID NO:34), LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35), LPISNENEHA (SEQ ID NO:36), LPQANANENA (SEQ ID NO:37), LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38), LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39), LAPNSTHGSA (SEQ ID NO:40) y LAKDRAPSTA (SEQ ID NO:41).

13. Una célula anfitriona aislada que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12.

14. Una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que comprende una inserción peptídica con respecto a una proteína de la cápside de AAV parental correspondiente a dos aminoácidos adyacentes en una posición entre los

aminoácidos 570 y 611 de VP1 de AAV2, en donde la inserción comprende la secuencia de aminoácidos X1X2DX3TKX4, y en donde X1 se selecciona de N, A y H; X2 se selecciona de Q, P y S; X3 se selecciona de T, Y y S; y X4 se selecciona de T, N y A.

15. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en ASDSTKA (SEQ ID NO:15), NQDYTKT (SEQ ID NO:16), HQDTTKN (SEQ ID NO:19), y HPDTTKN (SEQ ID NO:18).

16. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la inserción peptídica está flanqueada por los aminoácidos LA en el terminal N y el aminoácido A en el terminal C.

17. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la inserción peptídica es entre los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de AAV2 o una posición correspondiente en otro serotipo de AAV de tipo silvestre o variante de AAV.

18. Un virión infeccioso del virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende: (a) una proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 15, y un ácido nucleico heterólogo.

19. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende un agente de interferencia de ARN o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

20. Un método para administrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con el virión de rAAV de acuerdo con la reivindicación 18.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la célula diana es una célula retiniana.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la célula diana está *in vitro* o *in vivo*.

23. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un virus adenoasociado (AAV) variante que comprende una inserción peptídica con respecto a una proteína de la cápside de AAV parental entre dos aminoácidos adyacentes en una posición entre los aminoácidos 570 y 611 de VP1 de AAV2, en donde la inserción comprende la secuencia de aminoácidos X1X2DX3TKX4, y en donde X1 se selecciona de N, A y H; X2 se selecciona de Q, P y S; X3 se selecciona de T, Y y S; y X4 se selecciona de T, N y A.

24. Una célula anfitriona aislada que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 23.

25. Una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que comprende una inserción peptídica con respecto a una proteína de la cápside de AAV parental correspondiente a dos aminoácidos adyacentes en una posición entre los aminoácidos 570 y 611 de VP1 de AAV2, en donde la inserción comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en HDITKNI (SEQ ID NO:17), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25), NKTTNKD (SEQ ID NO:20), PISNENEH (SEQ ID NO:64), y PQANANEN (SEQ ID NO:63).

26. Una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que comprende i) una secuencia de aminoácidos de AAV al menos 90 % idéntica a un AAV de tipo silvestre seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-10 y 11; y ii) una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en P34A, S109T+V708I, P34A+R484S, A593E+N596D, V708I+V719M, S109T+A493V+A593E+V708I, V708I+R733C, Q164K, y I698V, en donde una o más sustituciones son relativas a AAV2 o una o más sustituciones correspondientes son relativas a otros serotipos de AAV.

27. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la proteína de la cápside comprende una inserción peptídica.

28. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en ISDQTKH (SEQ ID NO:14), QADTTKN (SEQ ID NO:13), ASDSTKA (SEQ ID NO:15), NQDYTKT (SEQ ID NO:16), HDITKNI (SEQ ID NO:17), HPDTTKN (SEQ ID NO:18), HQDTTKN (SEQ ID NO:19), NKTTNKD (SEQ ID NO:20), ISNENEH (SEQ ID NO:21), QANANEN (SEQ ID NO:22), GKSKVID (SEQ ID NO:23), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25), KDRAPST (SEQ ID NO:26), LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27), LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29), LAASDSTKAA (SEQ ID NO:30), LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31), LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32), LAHPDTTKNA (SEQ ID NO:33), LAHQDTTKNA (SEQ ID NO:34), LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35), LPISNENEHA (SEQ ID NO:36), LPQANANENA (SEQ ID NO:37), LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38), LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39), LAPNSTHGSA (SEQ ID NO:40) y LAKDRAPSTA (SEQ ID NO:41).

29. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la secuencia de aminoácidos de AAV es al menos 95 % idéntica a la del AAV de tipo silvestre.

30. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la secuencia de aminoácidos de AAV es al menos 99 % idéntica a la del AAV de tipo silvestre.

31. El AAV variante de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la proteína de

la cápside es una proteína de la cápside ancestral.

32. Un virión infeccioso del virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende: (a) una proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 27, y un ácido nucleico heterólogo.

33. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un agente de interferencia de ARN o un polipéptido.

34. Un método para administrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con el virión de rAAV de acuerdo con la reivindicación 32.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la célula diana es una célula retiniana.

36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en donde la célula retiniana se selecciona del grupo que consiste en células ganglionares retinianas, células amacrinas, células horizontales, células bipolares, células fotorreceptoras, células gliales de Müller, células microgliales y epitelio pigmentario retinal.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la célula diana está *in vitro*.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en donde la célula diana está *in vivo*.

39. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a un AAV de tipo silvestre seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-12 o un AAV variante; y ii) una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en P34A, S109T+V708I, P34A+R484S, A593E+V708I, A593E+N596D, V708I+V719M, V708I+G727D, S109T+A493V+A593E+V708I, V708I+R733C, Q164K, y I698V.

40. Una célula anfitriona aislada que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 39.

41. Una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside y b) una o más mutaciones puntuales, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en ISDQTKH (SEQ ID NO:14) y LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), y en donde al menos una o más de las mutaciones puntuales es P34A.

42. Una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside y b) una o más mutaciones puntuales, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en ISDQTKH (SEQ ID NO:14) y LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), y en donde una o más de las mutaciones puntuales se selecciona del grupo que consiste en M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, N312K, P363L, D368H, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V719M, S721L, y L735Q.

43. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside y b) dos o más mutaciones puntuales, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en ISDQTKH (SEQ ID NO:14) y LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28).

44. La cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 43, en donde al menos una de las dos o más mutaciones puntuales es V708I.

45. Una proteína de la cápside de AAV variante que tiene a) una inserción peptídica LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) entre los aminoácidos 587 y 588 de SEQ ID NO:2 y b) una sustitución de aminoácidos P34A en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV es idéntica a la SEQ ID NO:2.

46. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, y b) una o más mutaciones puntuales, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en QADTTKN (SEQ ID NO:13) y LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27), y en donde una o más mutaciones puntuales se seleccionan del grupo que consiste en M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, N312K, P363L, D368H, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V719M, S721L, y L735Q.

47. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside y b) dos o más mutaciones puntuales, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en QADTTKN (SEQ ID NO:13) y LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27).

48. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 47, en donde al menos una de las dos o más mutaciones puntuales se selecciona del grupo que consiste en S109T y V708I.

49. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 47, en donde al menos dos de las dos o más mutaciones puntuales son S109T y V708I.

50. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende la secuencia de aminoácidos LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27).

51. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, y b) una o más mutaciones puntuales, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39) y TNRTSPD (SEQ ID NO:24), y en donde una o más mutaciones puntuales se seleccionan del grupo que consiste en M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, N312K, P363L, D368H, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V719M, S721L, L735Q y combinaciones de estas.

52. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, y b) dos o más mutaciones puntuales, en donde la inserción o mutaciones son en AAV2 o una posición correspondiente en una porción de la cápside de un serotipo de AAV distinto de AAV2, y en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en TNRTSPD (SEQ ID NO:24) y LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39).

53. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 52, en donde al menos una de las dos o más mutaciones puntuales es V708I.

54. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende la secuencia de aminoácidos LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39).

55. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside y b) una o más mutaciones puntuales, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en GKSKVID (SEQ ID NO:23) y LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38).

56. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 55, en donde una o más mutaciones puntuales se seleccionan del grupo que consiste en M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, N312K, P363L, D368H, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V708I, V719M, S721L, y L735Q.

57. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende la secuencia de aminoácidos LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38).

58. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en NQDYTKT (SEQ ID NO:16) y LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31).

59. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la proteína además comprende una o más mutaciones puntuales seleccionadas del grupo que consiste en M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, P363L, D368H, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V708I, V719M, S721L, y L735Q, relativas a AAV2 o una posición correspondiente en una porción de cápside de un serotipo de AAV distinto de AAV2.

60. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 58, en donde la proteína comprende además dos o más mutaciones puntuales, y en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en NQDYTKT (SEQ ID NO:16) y LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31).

61. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 60, en donde al menos una de las dos o más mutaciones puntuales es N312K.

62. Una proteína de la cápside de AAV variante que comprende una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en donde la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en HDITKNI (SEQ ID NO:17) y LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32).

63. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 62, en donde la proteína además comprende una o más mutaciones puntuales seleccionadas del grupo que consiste en M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, P363L, D368H, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V719M, S721L, y L735Q, relativa a AAV2 o una posición correspondiente en una porción de cápside de un serotipo de AAV distinto de AAV2.

64. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 62, en donde la proteína comprende dos o más mutaciones puntuales, en donde la inserción o las mutaciones se encuentran en AAV2 o una posición correspondiente en una porción de la cápside de un serotipo de AAV distinto de AAV2.

65. La proteína de la cápside de AAV variante de acuerdo con la reivindicación 64, en donde al menos una de las dos o más mutaciones puntuales es V708I.

66. Una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que comprende la secuencia SEQ ID NO:58 y uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: alanina (A) en 264, alanina (A) en 266, serina (S) en 268, alanina (A) en 448, treonina (T) en 459, arginina (R) en 460, alanina (A) en 467, serina (S) en 470, asparagina (N) en 471, alanina (A) en 474, serina (S) en 495, asparagina (D) en 516, asparagina (D) en 533, glutamina (Q) en 547, alanina (A) en 551, alanina (A) en 555, ácido glutámico (E) en 557, metionina (M) en 561, serina (S) en 563, glutamina (Q) en 577, serina (S) en 583, valina (V) en 593, treonina (T) en 596, alanina (A) en 661, valina (V) en 662, treonina (T) en 664, prolina (P) en 665, treonina (T) en 710, ácido aspártico (D) en 717, asparagina (N) en 718, ácido glutámico (E) en 719, y serina (S) en 723.