

CÁPSIDES VARIANTES DE VIRUS ADENOASOCIADOS Y MÉTODOS DE USO DE ESTAS

[001] De conformidad con 35 USC, artículo 119 (e), la presente solicitud reivindica prioridad a la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/336.441 presentada el 13 de mayo de 2016; la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/378.106 presentada el 22 de agosto de 2016; la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/384.590 presentada el 7 de septiembre de 2016; la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/454.612 presentada el 3 de febrero de 2017; cuyas divulgaciones completas se incorporan a la presente por referencia.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DE UN LISTADO DE SECUENCIAS PROPORCIONADO COMO ARCHIVO DE TEXTO

[002] En la presente se proporciona un Listado de Secuencias como un archivo de texto, "4D_ST25.txt", creado el 12 de mayo de 2017 y que tiene un tamaño de 198 KB. Los contenidos del archivo de texto se incorporan por referencia en la presente en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[003] La invención divulgada en la presente se refiere en general al campo de los viriones de virus adenoasociados (AAV) que comprenden proteínas de la cápside variante y a la generación de dichas cápsides variantes utilizando técnicas de evolución dirigida.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[004] Las enfermedades retinianas hereditarias abarcan un grupo grande de enfermedades genéticas heterogéneas que afectan a aproximadamente 1 de cada 3000 personas (más de 2 millones de personas en todo el mundo) y son una causal importante de pérdida grave de la visión o ceguera. Las enfermedades retinianas multifactoriales complejas, como la degeneración macular húmeda relacionada con la edad (WAMD) y la retinopatía diabética (DR) afectan a aun más personas; 1,7 millones de estadounidenses padecen en la actualidad una pérdida grave de la visión central asociada a la WAMD y casi un tercio de los adultos mayores de 40 años con diabetes poseen discapacidad visual. Estas enfermedades suelen estar asociadas a la disfunción o la muerte de uno o más tipos de células de la retina, en algunos casos debido a la

ausencia de expresión o función de una proteína clave, por ejemplo, RPE65 en LCA2, en otros casos debido a mutaciones genéticas que crean productos genéticos tóxicos, por ejemplo, mutaciones dominantes que afectan el plegamiento de la proteína rodopsina, o en otros casos debido a cambios en la fisiología retiniana inducidos por la expresión ectópica de una proteína, por ejemplo, VEGF en WAMD.

[005] Un enfoque para abordar esta gran necesidad no médica es el tratamiento mediado por el virus adenoasociado (AAV) basado en genes, en la que se utiliza un virus adenoasociado recombinante (rAAV) para administrar un gen a uno o más tipos de células en la retina, por ejemplo, para reemplazar un gen faltante, para corregir un gen defectuoso dominante o para proporcionar una plantilla para el tratamiento continuo con proteínas. Si bien el tratamiento génico basado en AAV ha sido cada vez más exitoso, todavía está lleno de deficiencias con respecto a las propiedades de vectores virales, que incluyen, por ejemplo, actuar sobre las células deseadas de la retina con alta eficiencia. Por ejemplo, se identificaron y caracterizaron múltiples serotipos de AAV de primates homólogos y numerosos serotipos de primates no humanos, en donde el AAV2 fue el mejor caracterizado entre los serotipos de AAV y el primero en ser adaptado como vehículo de administración de genes en el ojo. Sin embargo, no se ha informado que estos AAV (incluido el AAV2) sean eficaces en la transducción de los tipos de células más profundas de la retina cuando se administran por vía intravítrea. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de nuevas variantes de AAV con capacidades de transducción superiores que proporcionen una administración más eficaz basada en genes a las células de la retina para el tratamiento de enfermedades oculares. Existe una necesidad en la técnica de dichas variantes de AAV que exhiben un perfil de transducción retiniana mejorado, en algunos casos en general, en otros casos preferentemente a ciertos tipos de células retinianas, en comparación con AAV de tipo silvestre y variantes de AAV como se conocen en la técnica.

[006] El AAV natural es un virus de ADN monocatenario que contiene tres marcos de lectura abiertos: *rep*, *cap* y *aap*. El primer gen, *rep*, codifica cuatro proteínas necesarias para la replicación del genoma (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40), el segundo, *cap*, expresa tres proteínas estructurales (VP1-3) que se ensamblan para formar la cápside viral, y el tercero expresa la proteína activadora del ensamblaje (AAP) que es esencial para el ensamblaje de la cápside. El AAV depende de la presencia de un virus auxiliar, como un adenovirus o herpesvirus, para la replicación activa. En ausencia de un virus auxiliar, el AAV establece un estado latente en el que su genoma se mantiene de manera episomal o se integra en el cromosoma anfitrión en el locus AAVS1.

[007] Se pueden usar técnicas de evolución dirigida *in vitro* e *in vivo* para seleccionar las variantes de AAV que ofrecen una mejora con respecto a los vectores de administración de genes basados en AAV actuales. Dichas técnicas de evolución dirigida son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 2014/194132 y Kotterman & Schaffer (Nature Review Genetics, AOP, publicada en línea el 20 de mayo de 2014; doi: 10.1038/nrg3742), las cuales se incorporan en la presente en su totalidad por referencia. La evolución dirigida es un enfoque de ingeniería de la cápside que emula la evolución natural a través de rondas iterativas de procesos de diversificación y selección genética, lo que permite la acumulación de mutaciones beneficiosas que mejoran progresivamente la función de una biomolécula tal como un virión basado en AAV. En este enfoque, los genes *cap* de AAV de tipo silvestre se diversifican para crear grandes genotecas que se empaquetan para generar genotecas de partículas virales, y se aplica presión selectiva para aislar variantes únicas con fenotipos superiores que pueden superar las barreras de administración de genes.

[008] Las variantes de AAV se han divulgado, por ejemplo, en las patentes estadounidenses número 9.193.956; 9.186.419; 8.632.764; 8.663.624; 8.927.514; 8.628.966; 8.263.396; 8.734.809; 8.889.641; 8.632.764; 8.691.948; 8.299.295; 8.802.440; 8.445.267; 8.906.307; 8.574.583; 8.067.015; 7.588.772; 7.867.484; 8.163.543; 8.283.151; 8.999.678; 7.892.809; 7.906.111; 7.259.151; 7.629.322; 7.220.577; 8.802.080; 7.198.951; 8.318.480; 8.962.332; 7.790.449; 7.282.199; 8.906.675; 8.524.446; 7.712.893; 6.491.907; 8.637.255; 7.186.522; 7.105.345; 6.759.237; 6.984.517; 6.962.815; 7.749.492; 7.259.151; y 6.156.303; números de publicación estadounidenses 2013/0295614; 2015/0065562; 2014/0364338; 2013/0323226; 2014/0359799; 2013/0059732; 2014/0037585; 2014/0056854; 2013/0296409; 2014/0335054 2013/0195801; 2012/0070899; 2011/0275529; 2011/0171262; 2009/0215879; 2010/0297177; 2010/0203083; 2009/0317417; 2009/0202490; 2012/0220492; 2006/0292117; y 2004/0002159; números de publicación europeos 2692731 A1; 2383346 B1; 2359865 B1; 2359866 B1; 2359867 B1; and 2357010 B1; 1791858 B1; 1668143 B1; 1660678 B1; 1664314 B1; 1496944 B1; 1456383 B1; 2341068 B1; 2338900 B1; 1456419 B1; 1310571 B1; 1456383 B1; 1633772 B1; y 1135468 B1; y números de publicación internacionales (PCT) WO 2014/124282; WO 2013/170078; WO 2014/160092; WO 2014/103957; WO 2014/052789; WO 2013/174760; WO 2013/123503; WO 2011/038187; y WO 2008/124015; WO 2003/054197; sin embargo, ninguna de estas referencias describe las formas de realización y/o características y/o composición de estructuras de materia

de las variantes de AAV que se describen en la presente.

[0009] Todos los documentos y referencias citados en la presente y en los documentos de patente a los que se hace referencia se incorporan en la presente como referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0010] En la presente se proporcionan proteínas de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante que tienen una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos en relación con una proteína de la cápside del AAV parental, que, cuando está presente en un virión del AAV, confiere un aumento de la infectividad de uno o más tipos de células retinianas en comparación con la infectividad de las células retinianas por un virión de AAV que comprende una proteína de cápside de AAV parental no modificada. También se proporcionan viriones de AAV recombinantes y composiciones farmacéuticas de estos que comprenden una proteína de la cápside de AAV variante como se describe en la presente, métodos para producir viriones y proteínas de la cápside de rAAV variante, y métodos para usar estos viriones y proteínas de la cápside de rAAV en la investigación y en la práctica clínica, por ejemplo, en la administración de secuencias de ácido nucleico a una o más células de la retina para el tratamiento de trastornos y enfermedades de la retina.

[0011] En algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan proteínas de la cápside del virus adenoasociado (AAV) variante, en donde estas proteínas de la cápside de AAV variante tienen una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos en relación con una cápside del AAV parental, que, cuando están presentes en un virión de AAV, confieren un aumento en la infectividad de uno o más tipos de células retinianas (por ejemplo, una célula fotorreceptora [por ejemplo, bastones; conos], una célula ganglionar de la retina [RGC], una célula glial [por ejemplo, una célula glial Müller, una célula microglial], una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal y/o una célula epitelial pigmentaria de la retina [RPE]) en comparación con la infectividad de las células retinianas por un virión de AAV que comprende una proteína de cápside de AAV parental que no comprende la modificación de la secuencia de aminoácidos.

[0012] En algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan viriones de AAV recombinante (rAAV), estos viriones de rAAV comprenden una proteína de la cápside variante como se describe en la presente, en donde los viriones de rAAV exhiben una infectividad incrementada de uno o más tipos de células retinianas (por ejemplo, una célula fotorreceptora [por ejemplo, bastones; conos], una célula ganglionar de la retina [RGC], una célula glial [por ejemplo, una célula glial Müller, una célula microglial], una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal, y/o una célula epitelial

pigmentaria de la retina[RPE]) en relación con la infectividad de la célula retiniana por un virión de AAV que comprende una proteína de cápside de AAV parental correspondiente no modificada. En algunas formas de realización, el virión de rAAV exhibe un aumento en la infectividad de todas las células retinianas en relación con el virión de AAV que comprende la proteína de la cápside del AAV parental. En otras formas de realización, el virión de rAAV exhibe un aumento en la infectividad de ciertos tipos de células de la retina pero no de otras en relación con el virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV parental. Dicho de otra manera, el virión de rAAV exhibe una mayor infectividad que es preferencial para ciertos tipos de células retinianas pero no para otras, por ejemplo, el rAAV demuestra una infectividad preferencialmente mayor de uno o más tipos de células seleccionadas de células fotorreceptoras, células ganglionares de la retina, células gliales, células bipolares, células amacrinas, células horizontales y/o células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE), pero no demuestra un aumento de la infectividad de todos los tipos de células.

[0013] En algunas formas de realización, el virión de rAAV comprende un ácido nucleico heterólogo. En algunas de dichas formas de realización, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que codifica un polipéptido. En otras de dichas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que no codifica un polipéptido, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico heterólogo, un agente de interferencia de ARN, un ARN guía para una nucleasa, etc.

[0014] En la presente además se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los viriones de rAAV infecciosos objeto de la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0015] También se proporciona el uso de un virión de rAAV que comprende una proteína de la cápside variante como se describe en la presente en un método para administrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana (tal como una célula retiniana) poniendo en contacto la célula diana con el virión de rAAV. En algunas formas de realización, la célula diana está *in vivo*, por ejemplo, en el ojo de una persona que necesita tratamiento para una enfermedad ocular. En otras formas de realización, la célula diana está *in vitro*.

[0016] También se proporcionan métodos para tratar una enfermedad ocular administrando a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de viriones de rAAV que comprenden una proteína de la cápside variante como se describe en la presente o una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de los viriones de rAAV.

[0017] También se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una

secuencia que codifica una proteína de la cápside de AAV variante como se describe en la presente y una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico aislado. En otras formas de realización, el ácido nucleico aislado y/o la célula anfitriona aislada comprenden el rAAV.

[0018] En algunos aspectos, la proteína de la cápside de AAV variante comprende una inserción de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos (un "péptido heterólogo" o "inserción peptídica") en el bucle GH de la proteína de la cápside, en relación con una proteína de la cápside del AAV parental, en la que la proteína de la cápside variante, cuando está presente en un virión del AAV, confiere un aumento de la infectividad de una célula retiniana en comparación con la infectividad de una célula retiniana por un virión del AAV que comprende la proteína de la cápside del AAV correspondiente. En algunas formas de realización, el péptido comprende la secuencia seleccionada del grupo que consta de QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), 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). En algunas formas de realización, el péptido consta, básicamente, de la secuencia seleccionada del grupo que consta de QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), 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). En algunos aspectos, la proteína de la cápside del AAV variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en relación con una proteína de la cápside del AAV parental, en donde la proteína de la cápside variante, cuando está presente en un virión de AAV, confiere un aumento de la infectividad de una célula retiniana en comparación con la infectividad una célula retiniana por un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside del AAV parental.

[0019] En aspectos relacionados, la proteína de la cápside del AAV variante comprende una inserción peptídica y una o más sustituciones de aminoácidos en relación con una proteína de la cápside del AAV parental, en donde la proteína de la cápside variante, cuando está presente en un virión de AAV, confiere un aumento de la infectividad de una célula retiniana en comparación con la infectividad una célula retiniana por un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside del AAV parental.

[0020] En la presente además se divulga una proteína de la cápside de AAV variante que comprende el péptido heterólogo LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) y una sustitución de P34A en relación con el AAV2.

[0021] En la presente además se divulga una proteína de la cápside de AAV variante que comprende el péptido heterólogo LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) y las sustituciones de aminoácidos N312K, N449D, N551S, I698V y L735Q en relación con AAV2.

[0022] En la presente además se divulgan métodos para la fabricación y/o la administración de un rAAV que comprende una cápside de AAV variante como se describe en la presente. Además, en la presente se proporcionan kits que comprenden un rAAV que comprende una cápside de AAV variante como se describe en la presente y para su uso en los métodos descritos en la presente.

[0023] En otras formas de realización, el virión de AAV que comprende la proteína de la cápside variante en los párrafos anteriores puede incorporar cualquiera de las formas de realización anteriores o divulgadas posteriormente. De hecho, se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, para mayor claridad, se describen en la presente en el contexto de formas de realización independientes, también se pueden proporcionar en combinación en una sola forma de realización. Por el contrario, varias características de la invención, que se describen, a los fines de brevedad, en el contexto de una única forma de realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las formas de realización que pertenecen a la invención están abarcadas específicamente por la invención y se divulgan en la presente como si todas y cada una de las combinaciones se hubieran divulgado de forma individual y explícita. Además, todas las

subcombinaciones de las diversas formas de realización y elementos de estas también están abarcadas específicamente por la invención y se divulgan en la presente como si todas y cada una de estas subcombinaciones se divulgaran de forma individual y explícita en la presente.

[0024] El Resumen de la Invención no pretende definir las reivindicaciones ni pretende limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

[0025] Otras características y ventajas de la invención divulgadas en la presente serán evidentes a partir de las siguientes Figuras, Descripción Detallada y Reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0026] La invención se comprende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. La patente o la solicitud contienen al menos un dibujo a color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos en color, previa solicitud y pago de la tarifa correspondiente. Se enfatiza que, de acuerdo con la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características se amplían o se reducen arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras.

[0027] La **Figura 1** representa formas de realización de una metodología de evolución dirigida. La etapa (a) representa la generación de una genoteca de cápside viral que comprende combinaciones de técnicas de mutación de ADN y genes *cap*. La etapa (b) representa el empaquetamiento de los virus de tal manera que cada partícula viral está purificada y compuesta por una cápside mutante que rodea el gen *cap* que codifica esa cápside. La genoteca de la cápside se coloca luego bajo presión selectiva *in vitro* o *in vivo*. En este aspecto de la tecnología de evolución dirigida, los tejidos o el material celular de interés se recolectan para el aislamiento de variantes de AAV que han infectado exitosamente esa diana, y los virus exitosos se recuperan. La etapa (c) representa el enriquecimiento de la etapa 1 de clones exitosos a través de la selección repetida. La etapa (d) representa el enriquecimiento de la etapa 2 de los genes *cap* seleccionados que se someten a rediversificación y etapas de selección adicionales para aumentar de forma iterativa la capacidad viral. La etapa (e) representa las variantes, identificadas como coincidencias durante las etapas de selección de vectores 1 y 2, que se fabricarán como vectores de AAV recombinantes y se caracterizarán por el nivel de transducción de diversos tipos de células y tejidos diana. Por la naturaleza del proceso de evolución dirigida de AAV, las variantes que se describen en la presente ya han demostrado la capacidad de transducir células retinianas y administrar un

genoma (el genoma que codifica el gen *cap* de la variante) durante el proceso de selección.

[0028] La **Figura 2** proporciona un esquema retiniano de montaje plano que muestra dónde se recolectan las muestras a partir de las cuales se amplifican los genomas virales en una amplia área de la retina.

[0029] La **Figura 3** muestra una amplificación por PCR de los genomas virales de la capa de células ganglionares (GCL), la capa nuclear interna (INL), el fotorreceptor/capa nuclear externa (ONL) y la capa del epitelio pigmentario de la retina (RPE) del tejido retiniano de una ronda representativa de selección. Tanto el ojo derecho (imagen superior) como el ojo izquierdo (imagen inferior) se inyectaron con la genoteca. Se tomaron muestras de la retina interna (in.), la retina media (med.) y la retina externa/periférica (ext.). Las bandas dentro de cajas rojas representan la amplificación exitosa de genomas virales.

[0030] La **Figura 4A-4D** muestra la frecuencia de los motivos dentro del análisis de secuenciación. La Figura 4A proporciona el análisis de secuenciación de la Ronda 3. La Figura 4B proporciona el análisis de secuenciación de la Ronda 4. La Figura 4C proporciona el análisis de secuenciación de la Ronda 5. La Figura 4D proporciona el análisis de secuenciación de la Ronda 6.

[0031] La **Figura 5** proporciona un modelo tridimensional representativo de AAV2 que contiene un heptámero aleatorio después del aminoácido 587.

[0032] La **Figura 6** proporciona una alineación de AAV de tipo silvestre SEQ ID NOS: 1-11 que muestra las ubicaciones de aminoácidos entre los serotipos de tipo silvestre (naturales) AAV1, AAV2, AAV3A, AAV3B y AAV4-10.

[0033] La **Figura 7** proporciona imágenes de fluorescencia del fondo de ojo tomadas con un Heidelberg Spectralis™ de la retina de un mono verde africano después de la administración intravítrea de 2×10^{11} genomas vectoriales (vg) de AAV2 que administran un transgén de GFP bajo el control del promotor CMV (AAV2.CMV.GFP). Se tomaron imágenes al inicio (A) y a los 14 días (B), 28 días (C) y 42 días (D) posteriores a la inyección.

[0034] La **Figura 8** proporciona imágenes de fluorescencia del fondo de ojo tomadas con un Heidelberg Spectralis™ de la retina de un mono verde africano después de la administración intravítrea de 2×10^{11} genomas vectoriales (vg) de la variante novedosa de AAV LAISDQTKHA + P34A que administra un transgén de GFP bajo el control del promotor CMV (LAISDQTKHA+P34A.CMV.GFP). Se tomaron imágenes al inicio (A) y a los 14 días (B), 28 días (C) y 42 días (D) posteriores a la inyección.

[0035] La **Figura 9** proporciona imágenes de fluorescencia del fondo de ojo tomadas con un Heidelberg Spectralis™ de las retinas de monos *Macaca fascicularis* luego de la administración intravítrea de la variante novedosa de AAV LAISDQTKHA+P34A que administra un transgén de GFP bajo el control del promotor CAG (LAISDQTKHA+P34A.CAG.EGFP). (A) La retina de un mono inyectado por vía intravítrea con 2×10^{11} vg de vector, con imágenes tomadas a los 14 días (A1), 21 días (A2) y 28 días (A3) posteriores a la inyección. (B) La retina de un mono inyectado por vía intravítrea con 1×10^{12} vg de vector, con imágenes tomadas a los 14 días (B1) y 21 días (B2) posteriores a la inyección.

[0036] Las **Figuras 10A-10E** proporcionan los resultados del análisis inmunohistoquímico de la retina de un mono inyectado por vía intravítrea con 1×10^{12} vg de la variante novedosa de AAV LAISDQTKHA+P34A que administra un transgén de GFP bajo el control del promotor CAG, analizados tres semanas después de la inyección. Toda la inmunohistoquímica se proporciona junto con la imagen de fluorescencia del fondo de ojo correspondiente, con un recuadro rojo para indicar aproximadamente dónde se realizó el análisis en la retina. Figura 10A: Se observó una transducción robusta del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y fotorreceptores usando un anticuerpo específico para GFP (rojo). La inmunotinción del fotorreceptor de cono usando un anticuerpo opsina M/L se muestra en blanco. Figuras 10B y 10C: Se observó una transducción robusta del fotorreceptor de bastón y cono (Figura 10B) y RPE (Figura 10C) mediante fluorescencia directa de EGFP (verde) y mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico para GFP (rojo). Los melanosomas en RPE aparecen en negro en la imagen. Figura 10D: Se observó la transducción de fotorreceptores de cono (identificados por opsina M/L, blanco) y de células ganglionares de la retina (RGC) en y alrededor de la fovea por fluorescencia de EGFP directa (verde) y por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico para GFP (rojo). Las imágenes en los paneles del medio muestran un aumento mayor (63X) del área indicada por un cuadro blanco en el panel izquierdo. Figura 10E: Se observó la transducción de células ganglionares de la retina (RGC) y la capa de células ganglionares de la retina mediante fluorescencia de EGFP directa (paneles derechos, verde; el panel inferior derecho es un aumento de 63X del panel superior derecho); el panel superior izquierdo muestra la región bajo iluminación de campo luminoso.

[0037] Las **Figuras 11A-11F** proporcionan datos sobre la transducción de células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE) humanas *in vitro* por el virus AAV recombinante que comprende la variante novedosa de cápside de AAV

LAISDQTKHA+P34A y un transgén de GFP bajo el control del promotor CAG. Las células que se diferenciaron como células RPE de una línea de células madre embrionarias humanas (Figuras 11A y 11C) o de células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos humanos (FB-iPSC) (Figuras 11B y 11D) se infectaron con la variante novedosa de AAV LAISDQTKHA+P34A.CAG.GFP o el control de tipo silvestre AAV2.CAG.GFP. Figuras 11A y 11B: Las imágenes de inmunofluorescencia de los cultivos celulares 7 días después de la infección a una MOI de 500 demuestran que la variante novedosa de cápside de AAV (paneles de la izquierda) transduce células RPE mejor que la cápside de AAV2 de tipo silvestre (paneles de la derecha). Figuras 11C y 11D: La cuantificación del porcentaje de células RPE positivas para GFP en cada cultivo mediante citometría de flujo revela que la variante novedosa de cápside de AAV proporciona una mejora significativa, dependiente de la dosis, en la cantidad de células transducidas sobre la cápside de AAV2 de tipo silvestre independientemente de la fuente celular. Figuras 11E y 11F: La cuantificación de la cantidad de GFP en cada cultivo por transferencia Western revela que la variante novedosa de AAV proporciona una mejora significativa en la expresión del transgén sobre la cápside de tipo silvestre independientemente de la fuente celular.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0038] Antes de que se describan los presentes métodos y composiciones, debe entenderse que esta invención no se limita a un método o composición particular descrito, y, como tal, puede variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir formas de realización particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[0039] La invención divulgada en la presente se ilustra en las figuras y la descripción. Sin embargo, aunque se ilustran formas de realización particulares en las figuras, no se pretende limitar la invención a la forma de realización específica o las formas de realización ilustradas y/o divulgadas. Más bien, la invención divulgada en la presente pretende abarcar todas las modificaciones, construcciones alternativas y equivalentes que incluyen el espíritu y el alcance de la invención. Como tales, las figuras pretenden ser ilustrativas y no restrictivas.

[0040] Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese rango también se divulga específicamente. Cada rango menor entre cualquier valor establecido o valor

intermedio en un rango establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido se incluye dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el rango, y cada rango donde cualquiera, ninguno o ambos de los límites se incluyen en los rangos más pequeños también se incluyen dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango establecido. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

[0041] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona del oficio de nivel medio a quien se dirige la presente invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen algunos métodos y materiales potenciales y preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan la presente por referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones. Se entiende que la presente divulgación reemplaza cualquier divulgación de una publicación incorporada en la medida en que exista una contradicción.

[0042] Como resultará evidente para la persona del oficio de nivel medio al leer la presente divulgación, cada una de las formas de realización individuales descritas e ilustradas en la presente tiene componentes y características distintas que pueden separarse o combinarse fácilmente con las características de cualquiera de las otras varias formas de realización sin alejarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método enumerado se puede llevar a cabo en el orden de eventos indicado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

[0043] Se observa que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un virión de AAV recombinante" incluye una pluralidad de dichos viriones y la referencia a "la célula fotorreceptora" incluye la referencia a una o más células fotorreceptoras y sus equivalentes conocidos por la persona de oficio de nivel medio, y así sucesivamente. Además, se observa que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de dicha terminología exclusiva como "únicamente", "solamente" y similares en relación con la enumeración de los elementos en las reivindicaciones, o el uso de

una limitación "negativa".

[0044] Las publicaciones analizadas en la presente se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

DEFINICIONES

[0045] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que les otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio a quien pertenece la presente tecnología.

[0046] El virus adenoasociado es un parvovirus no patógeno compuesto por un genoma de ADN monocatenario de 4,7 kb dentro de una cápside icosaédrica no envuelta. El genoma contiene tres marcos de lectura abiertos (ORF) flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR) que funcionan como el origen viral de la replicación y la señal de empaquetamiento. El ORF *rep* codifica cuatro proteínas no estructurales que desempeñan un papel en la replicación viral, la regulación transcripcional, la integración específica del sitio y el ensamblaje de viriones. La ORF *cap* codifica tres proteínas estructurales (VP 1-3) que se ensamblan para formar una cápside viral de 60 mer. Finalmente, un ORF presente como marco de lectura alternativo dentro del gen *cap* produce la proteína activadora del ensamblaje (AAP), una proteína viral que localiza las proteínas de la cápside del AAV en el núcleo y funciona en el proceso de ensamblaje de la cápside.

[0047] Existen varios serotipos naturales ("de tipo silvestre") y más de 100 variantes conocidas de AAV, cada una de las cuales difiere en la secuencia de aminoácidos, particularmente en las regiones hipervariables de las proteínas de la cápside y, por lo tanto, en sus propiedades de administración de genes. Ningún AAV se ha asociado a ninguna enfermedad humana, lo que hace que el AAV recombinante sea atractivo para aplicaciones clínicas.

[0048] Para los fines de la divulgación de la presente, la terminología "AAV" es una abreviatura de virus adenoasociados, que incluye, entre otros, el virus en sí y sus derivados. Salvo que se indique lo contrario, la terminología se refiere a todos los subtipos o serotipos y las formas recombinantes y competentes para la replicación. El término "AAV" incluye, entre otros, AAV tipo 1 (AAV-1 o AAV1), AAV tipo 2 (AAV-2 o AAV2), AAV tipo 3A (AAV-3A o AAV3A), AAV tipo 3B (AAV-3B o AAV3B), AAV tipo 4

(AAV-4 o AAV4), AAV tipo 5 (AAV-5 o AAV5), AAV tipo 6 (AAV-6 o AAV6), AAV tipo 7 (AAV-7 o AAV7), AAV tipo 8 (AAV-8 o AAV8), AAV tipo 9 (AAV-9 o AAV9), AAV tipo 10 (AAV-10 o AAV10 o AAVrh10), AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV caprino, AAV equino, AAV primate, AAV no primate y AAV ovino. "AAV primate" se refiere a AAV que infecta primates, "AAV no primate" se refiere a AAV que infecta mamíferos no primates, "AAV bovino" se refiere a AAV que infecta mamíferos bovinos, etc.

[0049] Las secuencias genómicas de varios serotipos de AAV, así como las secuencias de las repeticiones terminales (TR) nativas, las proteínas Rep y las subunidades de la cápside son conocidas en la técnica. Dichas secuencias se pueden encontrar en la literatura o en bases de datos públicas como GenBank. Véanse, por ejemplo, los números de acceso de GenBank NC_002077.1 (AAV1), AF063497.1 (AAV1), NC_001401.2 (AAV2), AF043303.1 (AAV2), J01901.1 (AAV2), U48704.1 (AAV3A), NC_001729.1 (AAV3A), AF028705.1 (AAV3B), NC_001829.1 (AAV4), U89790.1 (AAV4), NC_006152.1 (AA5), AF085716.1 (AAV-5), AF028704.1 (AAV6), NC_006260.1 (AAV7), AF513851.1 (AAV7), AF513852.1 (AAV8) NC_006261.1 (AAV-8), AY530579.1 (AAV9), AAT46337 (AAV10) y AAO88208 (AAVrh10); cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en la presente para explicar las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de AAV. Véase también, por ejemplo, Srivastava et al. (1983) J. Virology 45:555; Chiorini et al. (1998) J. Virology 71:6823; Chiorini et al. (1999) J. Virology 73:1309; Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virología 73:939; Xiao et al. (1999) J. Virology 73:3994; Muramatsu et al. (1996) Virology 221:208; Shade et al. (1986) J. Virol. 58:921; Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad Sci. EE.UU. 99: 11854; Moris et al. (2004) Virology 33:375-383; las publicaciones de patentes internacionales WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y la patente estadounidense N.º 6.156.303.

[0050] Las secuencias de proteínas de la cap (cápside) naturales asociadas a los serotipos de AAV son conocidas en la técnica e incluyen las descritas en la presente como AAV1 (SEQ ID NO:1), AAV2 (SEQ ID NO:2), AAV3A (SEQ ID NO:3), AAV3B (SEQ ID NO:4), AAV4 (SEQ ID NO:5), AAV5 (SEQ ID NO:6), AAV6 (SEQ ID NO:7), AAV7 (SEQ ID NO:8), AAV8 (SEQ ID NO:9), AAV9 (SEQ ID NO:10), AAV10 (SEQ ID NO:11), y AAVrh10 (SEQ ID NO:12). Los términos "proteína de cápside de AAV variante" o "variante de AAV" se refieren a una proteína de la cápside de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una modificación o sustitución (incluida la eliminación, inserción, mutación puntual, etc.) con respecto a una secuencia de proteína de la cápside de AAV natural o "de tipo silvestre", por ejemplo, como se indica en la SEQ ID NO:1-12 en la presente. Una variante de la proteína de la cápside de AAV

puede tener aproximadamente 80 % de identidad o más con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de tipo silvestre, por ejemplo, 85 % de identidad o más, 90 % de identidad o más, o 95 % de identidad o más con la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de tipo silvestre, por ejemplo, 98 % o 99 % de identidad con la proteína de la cápside de tipo silvestre. Una variante de la proteína de la cápside de AAV puede no ser una proteína de la cápside de tipo silvestre.

[0051] Para los fines de la divulgación de la presente, "virión de AAV" o "partícula viral de AAV" se refiere a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de la cápside de AAV y un polinucleótido de AAV encapsidado.

[0052] A los fines de la divulgación de la presente, la terminología "rAAV" es una abreviatura que se refiere a virus adenoasociado recombinante. "Recombinante", tal como se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de varias combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligadura, y otros procedimientos que resultan en una construcción que es distinta de un polinucleótido encontrado en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos incluyen respectivamente réplicas de la construcción de polinucleótidos original y la progenie de la construcción del virus original.

[0053] El término "vector de rAAV" abarca los viriones de rAAV (es decir, partículas virales de rAAV) (por ejemplo, un virión infeccioso de rAAV), que por definición incluye un polinucleótido de rAAV; y también abarca polinucleótidos que codifican rAAV (por ejemplo, un polinucleótido monocatenario que codifica rAAV [ss-rAAV]; un polinucleótido bicatenario que codifica rAAV [ds-rAAV], por ejemplo, plásmidos que codifican rAAV y similares).

[0054] Si un virión de AAV comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo silvestre, por ejemplo, un transgén para ser administrado a una célula diana, un agente de ARNi o un agente CRISPR para ser administrado a una célula diana, etc.), se suele denominar "virión de AAV recombinante (rAAV)" o "partícula viral de rAAV". En general, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos uno, y generalmente por dos, secuencias de repetición de terminales invertidas (ITR) de AAV.

[0055] El término "empaquetamiento" se refiere a una serie de eventos intracelulares que resultan en el ensamblaje y encapsidación de una partícula de AAV. Los genes "*rep*" y "*cap*" de AAV se refieren a secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas de replicación y encapsidación de virus adenoasociados. Los *rep* y *cap* de AAV se

denominan en la presente "genes empaquetadores" de AAV.

[0056] La terminología "virus auxiliar" para AAV se refiere a un virus que permite que el AAV (por ejemplo, AAV de tipo silvestre) sea replicado y empaquetado por una célula de mamífero. Una variedad de dichos virus auxiliares para AAV son conocidos en la técnica, incluyendo adenovirus, herpesvirus y poxvirus tales como el vaccinia virus. Los adenovirus abarcan varios subgrupos diferentes, aunque el adenovirus tipo 5 del subgrupo C es el más utilizado. Numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar son conocidos y están disponibles en depósitos como el ATCC. Los virus de la familia del herpes incluyen, por ejemplo, los virus del herpes simple (HSV) y los virus de Epstein-Barr (EBV), así como los virus citomegalovirus (CMV) y los virus de la pseudorrabia (PRV); que también están disponibles en depósitos como ATCC.

[0057] La terminología "función(es) de virus auxiliar" se refiere a la(s) función(es) codificada(s) en el genoma de un virus auxiliar que permite la replicación y el empaquetado de AAV (junto con otros requisitos para la replicación y empaquetamiento descritos en la presente). Como se describe en la presente, la "función del virus auxiliar" se puede proporcionar de varias maneras, incluso proporcionando virus auxiliares o proporcionando, por ejemplo, secuencias de polinucleótidos que codifican la función o las funciones necesarias para una célula productora *in trans*. Por ejemplo, un plásmido u otro vector de expresión que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una o más proteínas adenovirales se transfecta en una célula productora junto con un vector rAAV.

[0058] La expresión partícula viral "infecciosa" o virus "infeccioso" comprende una cápside viral ensamblada de manera competente, capaz de administrar un componente polinucleótido a una célula para la cual la especie viral es trópica. El término no implica necesariamente ninguna capacidad de replicación del virus. Los ensayos para el recuento de partículas virales infecciosas se describen en otra parte en la presente divulgación y en la técnica. La infectividad viral se puede expresar como la proporción de partículas virales infecciosas y partículas virales totales. Los métodos para determinar la proporción de partículas virales infecciosas y partículas virales totales son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Grainger et al. (2005) Mol. Ther. 11: S337 (que describe un ensayo de título infeccioso TCID₅₀); y Zolotukhin et al. (1999) Gene Ther. 6:973. Véanse también los ejemplos.

[0059] El término "tropismo", como se usa en la presente, se refiere al direccionamiento preferencial de un virus (por ejemplo, un AAV) a células de una especie anfitriona particular o de tipos celulares particulares dentro de una especie anfitriona. Por ejemplo,

un virus que puede infectar células del corazón, pulmón, hígado y músculo tiene un tropismo más amplio (es decir, aumentado) en relación con un virus que solo puede infectar células pulmonares y musculares. El tropismo también puede incluir la dependencia de un virus de tipos particulares de moléculas de superficie celular del anfitrión. Por ejemplo, algunos virus pueden infectar solo células con glucosaminoglucanos en la superficie, mientras que otros pueden infectar solo células con ácido siálico (dichas dependencias pueden evaluarse utilizando varias líneas celulares deficientes en clases particulares de moléculas como posibles células anfitrionas para determinar la infección viral). En algunos casos, el tropismo de un virus describe las preferencias relativas del virus. Por ejemplo, un primer virus puede infectar todo tipo de células, pero es mucho más exitoso en infectar aquellas células con glucosaminoglucanos en la superficie. Se puede considerar que un segundo virus tiene un tropismo similar (o idéntico) al primer virus si el segundo virus también prefiere las mismas características (por ejemplo, el segundo virus también es más exitoso en la infección de esas células con glucosaminoglucanos en la superficie), incluso si las eficiencias de transducción absoluta no son similares. Por ejemplo, el segundo virus puede ser más eficiente que el primer virus para infectar todos los tipos de célula evaluados, pero si las preferencias relativas son similares (o idénticas), se puede considerar que el segundo virus tiene un tropismo similar (o idéntico) al del primer virus. En algunas formas de realización, el tropismo de un virión que comprende una proteína de la cápside de AAV variante, objeto de la presente, no se altera en relación con un virión natural. En algunas formas de realización, el tropismo de un virión que comprende una proteína de la cápside de AAV variante, objeto de la presente, se amplía (es decir, se expande) en relación con un virión natural. En algunas formas de realización, el tropismo de un virión que comprende una proteína de la cápside de AAV variante, objeto de la presente, se reduce en relación con un virión natural.

[0060] La terminología virus "competente para la replicación" (por ejemplo, un AAV competente para la replicación) se refiere a un virus fenotípicamente de tipo silvestre que es infeccioso y que también puede replicarse en una célula infectada (es decir, en presencia de un virus auxiliar o funciones de virus auxiliar). En el caso del AAV, la competencia de replicación generalmente requiere la presencia de genes de empaquetamiento de AAV funcionales. En general, los vectores rAAV como se describen en la presente son incompetentes para la replicación en células de mamíferos (especialmente en células humanas) en virtud de la falta de uno o más genes de empaquetamiento de AAV. Típicamente, dichos vectores rAAV carecen de secuencias

de genes de empaquetamiento de AAV para minimizar la posibilidad de que se generen AAV competentes para la replicación mediante la recombinación entre los genes de empaquetamiento de AAV y un vector rAAV entrante. En muchas formas de realización, las preparaciones de vector rAAV como se describen en la presente son aquellas que contienen pocos o ningún AAV competente para la replicación (rcAAV, también denominados RCA) (por ejemplo, menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^2 partículas de rAAV, menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^4 partículas de rAAV, menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10 partículas de rAAV, menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^{12} partículas de rAAV, o ningún rcAAV).

[0061] El término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, incluidos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de estos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, y puede estar interrumpido por componentes no nucleótidos. Si está presente, las modificaciones en la estructura del nucleótido se pueden impartir antes o después del ensamblaje del polímero. El término polinucleótido, como se usa en la presente, se refiere indistintamente a moléculas bicatenarias y monocatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier forma de realización en la presente que comprenda un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas complementarias monocatenarias conocidas o predichas para constituir la forma bicatenaria.

[0062] Un polinucleótido o polipéptido tiene un cierto porcentaje de "identidad de secuencia" con otro polinucleótido o polipéptido, lo que significa que, cuando están alineados, ese porcentaje de bases o aminoácidos es el mismo cuando se comparan las dos secuencias. La similitud de secuencia se puede determinar de varias maneras diferentes. Para determinar la identidad de la secuencia, las secuencias se pueden alinear utilizando los métodos y programas informáticos, incluido BLAST, disponibles en Internet en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Otro algoritmo de alineación es FASTA, disponible en el paquete Genetics Computing Group (GCG), de Madison, Wisconsin, EE. UU., una subsidiaria de Oxford Molecular Group, Inc. Otras técnicas de alineación se describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, EE. UU. Los programas de alineación que permiten espacios vacíos en la secuencia son de particular interés. Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite espacios vacíos en las alineaciones de secuencias. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). Además, el programa GAP que utiliza el método de alineación de

Needleman y Wunsch puede utilizarse para alinear secuencias. Véase J. Mol. Biol. 48: 443- 453 (1970).

[0063] El término "gen" se refiere a un polinucleótido que realiza una función de algún tipo en la célula. Por ejemplo, un gen puede contener un marco de lectura abierto que sea capaz de codificar un producto génico. Un ejemplo de un producto génico es una proteína, que se transcribe y traduce del gen. Otro ejemplo de un producto génico es un ARN, por ejemplo, un producto de ARN funcional, por ejemplo, un aptámero, un ARN de interferencia, un ARN ribosomal (rARN), un ARN de transferencia (tARN), un ARN no codificante (ncARN), un ARN guía para nucleasas, etc., que se transcribe pero no se traduce.

[0064] La terminología "producto de expresión génica" o "producto génico" se refiere a una molécula que resulta de la expresión de un gen particular, como se definió anteriormente. Los productos de expresión génica incluyen, por ejemplo, un polipéptido, un aptámero, un ARN de interferencia, un ARN mensajero (mARN), un rARN, un tARN, un ARN no codificante (ncARN) y similares.

[0065] El término "agente siARN" ("interferente pequeño" o "ARN de interferencia corto" [o siARN]) es un dúplex de ARN de nucleótidos que se dirige a un interés genético (un "gen diana"). Un "dúplex de ARN" se refiere a la estructura formada por el apareamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN, formando una región de ARN bicatenario (dsARN). siARN está "dirigido" a un gen porque la secuencia de nucleótidos de la parte dúplex del ARNip es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen seleccionado. En algunas formas de realización, la longitud del dúplex de los siARN es inferior a 30 nucleótidos. En algunas formas de realización, el dúplex puede tener 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, la longitud del dúplex es de 19-25 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, el direccionamiento de genes mediado por siARN se logra a través del uso de interferencia de ARN dirigida por ADN (ddARNi), que es una técnica de silenciamiento génico que utiliza construcciones de ADN para activar las vías de interferencia de ARN (ARNi) endógenas de una célula animal. Dichas construcciones de ADN están diseñadas para expresar ARN bicatenarios autocomplementarios, típicamente ARN de horquilla corta (shARN), que una vez procesados provocan el silenciamiento de un gen o genes diana. Cualquier ARN, incluidos mARN endógenos o ARN virales, puede silenciarse mediante el diseño de construcciones para expresar ARN bicatenario complementario al mARN diana deseado. Como tal, la porción dúplex de ARN de un agente siARN puede ser parte

de una estructura de horquilla corta denominada shARN. Además de la parte dúplex, la estructura de horquilla puede contener una parte de bucle posicionada entre las dos secuencias que forman el dúplex. El bucle puede variar en longitud. En algunas formas de realización, el bucle es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos de longitud. La estructura de horquilla también puede contener porciones salientes de 3' o 5'. En algunas formas de realización, el saliente es un saliente de 3' o 5' de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud. En general, el nivel de producto de expresión (por ejemplo, mRNA, polipéptido, etc.) de un gen diana es reducido por un agente siARN (por ejemplo, un siARN, un shARN, etc.) que contiene secuencias específicas de nucleótidos bicatenarios que son complementarias con al menos un segmento largo de 19-25 nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de 20-21 nucleótidos) del transcripto del gen diana, incluida la región 5' no traducida (UT), el ORF o la región 3' UT. En algunas formas de realización, los ARN cortos de interferencia tienen una longitud de aproximadamente 19-25 nt. Véanse, por ejemplo, las solicitudes WOO/44895, W099/32619, WO01/75164, WO01/92513, WO01/29058, WO01/89304, WO02/16620, y WO02/29858; y la publicación de patente estadounidense N.º 20040023390 para descripciones de la tecnología de siARN. El siARN y/o shARN pueden estar codificados por una secuencia de ácido nucleico, y la secuencia de ácido nucleico también puede incluir un promotor. La secuencia de ácido nucleico también puede incluir una señal de poliadenilación. En algunas formas de realización, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación mínima sintética.

[0066] La terminología "ARN antisentido" abarca el ARN que es complementario a un producto de expresión génica. Por ejemplo, un ARN antisentido dirigido a un mRNA específico es un agente basado en ARN (o puede ser un ARN modificado) que es complementario al mRNA, donde la hibridación del ARN antisentido al mRNA altera la expresión del mRNA (por ejemplo, a través de la alteración de la estabilidad del ARN, la alteración de la traducción del ARN, etc.). También se incluyen en el "ARN antisentido" los ácidos nucleicos que codifican un ARN antisentido.

[0067] Con respecto a los "agentes CRISPR/Cas9", el término "CRISPR" abarca las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas en intervalos regulares/sistemas asociados a CRISPR (Cas) que evolucionaron para proporcionar a las bacterias y las arqueas inmunidad adaptativa contra virus y plásmidos utilizando ARN CRISPR (crARN) para guiar el silenciamiento de los ácidos nucleicos invasores. La proteína Cas9 (o su equivalente funcional y/o variante de esta, es decir, proteína similar a Cas9) contiene naturalmente actividad de endonucleasa de ADN que depende de la asociación de la

proteína con dos moléculas de ARN sintéticas o naturales llamadas crARN y tracrARN (también llamadas ARN guía). En algunos casos, las dos moléculas están unidas de manera covalente para formar una molécula única (también llamada ARN guía único ["sgARN"]). Por lo tanto, la proteína Cas9 o similar a Cas9 se asocia a un ARN dirigido a ADN (cuyo término abarca tanto la configuración del ARN guía de dos moléculas como la configuración del ARN guía de una sola molécula), que activa la proteína Cas9 o similar a Cas9 y guía a la proteína a una secuencia de ácido nucleico diana.

[0068] Si la proteína Cas9 o similar a Cas9 conserva su función enzimática natural, escindirán el ADN diana para crear una ruptura bicatenaria, que puede producir la alteración del genoma (es decir, edición: delección, inserción [cuando está presente un polinucleótido donante], reemplazo, etc.), y alterar así la expresión génica. Algunas variantes de Cas9 (cuyas variantes están abarcadas por la expresión "similar a Cas9") se han alterado de tal manera que tienen una actividad de escisión del ADN disminuida (en algunos casos, escinden una sola cadena en lugar de ambas cadenas del ADN diana, mientras que, en otros casos, se ha reducido significativamente a ninguna actividad de escisión del ADN). Las proteínas similares a Cas9 con actividad de escisión del ADN disminuida (incluso sin actividad de escisión del ADN) aún pueden guiarse a un ADN diana para bloquear la actividad de la ARN polimerasa. De manera alternativa, la proteína Cas9 o similar a Cas9 puede modificarse mediante la fusión de un dominio de activación de la transcripción VP64 a la proteína Cas9 y la coadministración de la proteína de fusión con una proteína auxiliar MS2-P65-HSF1 y un ARN guía único que comprende aptámeros del ARN MS2 en el tetrabucle y el tallo-bucle para formar un complejo de mediador de activación sinérgica (Cas9-SAM) en la célula que activa la transcripción. De este modo, las proteínas similares a Cas9 enzimáticamente inactivas pueden dirigirse a una ubicación específica en un ADN diana mediante un ARN dirigido a ADN con el fin de bloquear o activar la transcripción del ADN diana. La expresión "agentes CRISPR/Cas9", como se usa en la presente, abarca todas las formas de CRISPR/Cas9 como se describieron anteriormente o como se conocen en la técnica.

[0069] Se puede encontrar información detallada sobre los agentes CRISPR, por ejemplo, en (a) Jinek et. al., Science. 17 de agosto de 2012; 337(6096):816-21: "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity"; (b) Qi et al., Cell. 28 de febrero de 2013; 152(5): 1173-83: "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression", y (c) la solicitud de patente estadounidense N.º 13/842.859 y número de solicitud PCT de patente PCT/US13/32589; los cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Por lo tanto, el término "agente CRISPR", como se usa en la presente, abarca cualquier agente (o ácido nucleico que codifica dicho agente), que comprende secuencias naturales y/o sintéticas, que pueden usarse en el sistema basado en Cas9 [por ejemplo, una proteína Cas9 o similar a Cas9]; cualquier componente de un ARN dirigido a ADN, por ejemplo, un ARN similar a crARN, un ARN similar a tracrARN, un ARN guía único, etc.; un polinucleótido donante; y similares).

[0070] Por "nucleasas de dedo de zinc" (ZFN) se entiende las endonucleasas de ADN artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión de ADN de dedo de zinc a un dominio de escisión de ADN. Las ZFN pueden diseñarse por ingeniería para dirigirse a secuencias de ADN deseadas, y esto permite que las nucleasas de dedos de zinc escindan secuencias diana únicas. Cuando se introducen en una célula, las ZFN se pueden usar para editar el ADN diana en la célula (por ejemplo, el genoma de la célula) mediante la inducción de roturas bicatenarias. Para obtener más información sobre el uso de ZFN, consulte, por ejemplo: Asuri et al., *Mol Ther.* Febrero de 2012; 20(2):329-38; Bibikova et al. *Science*. 2 de mayo de 2003; 300(5620):764; Wood et al. *Science*. 15 de julio de 2011; 333(6040):307; Ochiai et al. *Genes Cells*. Agosto de 2010; 15(8):875-85; Takasu et. al., *Insect Biochem Mol Biol*. Octubre de 2010; 40(10):759-65; Ekker et al., *Zebrafish 2008 Summer*; 5(2): 121-3; Young et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de abril de 2011; 108(17):7052-7; Goldberg et al., *Cell*. 5 de marzo de 2010; 140(5):678-91; Geurts et al., *Science*. 24 de julio de 2009; 325(5939):433; Flisikowska et al., *PLoS One*. 2011; 6(6):e21045. doi: 10.1371/journal.pone.0021045. Epub 13 de junio de 2011; Hauschild et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 de julio de 2011; 108(29): 12013-7; y Yu et al., *Cell Res*. Noviembre de 2011; 21(11): 1638-40; los cuales se incorporan en la presente como referencia por sus enseñanzas relacionadas con las ZFN. El término "agente ZFN" abarca una nucleasa de dedo de zinc y/o un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una nucleasa de dedo de zinc.

[0071] La terminología "nucleasa efectora similar a activador de transcripción" o agentes "TALEN" se refiere a las nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN) que son endonucleasas de ADN artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión de ADN de efector TAL (similar a activador de transcripción) a un dominio de escisión de ADN. Los TALENS pueden modificarse por ingeniería genética con rapidez para unirse prácticamente a cualquier secuencia de ADN deseada y, cuando se introducen en una célula, los TALEN se pueden usar para editar el ADN diana en la célula (por ejemplo, el genoma de la célula) mediante la inducción de roturas

bicatenarias. Para obtener más información sobre el uso de TALEN, consulte, por ejemplo: Hockemeyer et al. Nat Biotechnol. 7 de julio de 2011; 29(8):731-4; Wood et al. Science. 15 de julio de 2011; 333(6040): 307; Tesson et al. Nat Biotechnol. 5 de agosto de 2011; 29(8):695-6; y Huang et al., Nat Biotechnol. 5 de agosto de 2011; 29(8):699-700; los cuales se incorporan en la presente como referencia por sus enseñanzas relacionadas con los TALEN. El término "agente TALEN" abarca un TALEN y/o un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un TALEN.

[0072] La terminología "elemento de control" o "secuencia de control" se refiere a una secuencia de nucleótidos involucrada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, incluida la replicación, duplicación, transcripción, empalme, traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar la frecuencia, la velocidad o la especificidad del proceso, y puede ser de naturaleza potenciadora o inhibitoria. Los elementos de control conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN capaz, en ciertas condiciones, de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificante que generalmente se ubica corriente abajo (en la dirección 3') del promotor. Los promotores pueden actuar de forma ubicua, es decir, activos en muchos tipos de células, por ejemplo, promotores CAG o CMV; o ser específicos para tejidos o células, por ejemplo, el promotor rho, que es activo en bastones, o el promotor de opsina, que es activo en conos.

[0073] La terminología "unido operativamente" o "unido operablemente" se refiere a una juxtaposición de elementos genéticos, en donde los elementos están en una relación que les permite operar de la manera esperada. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una región de codificación si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia de codificación. Puede haber residuos intermedios entre el promotor y la región de codificación siempre que se mantenga esta relación funcional.

[0074] La terminología "vector de expresión" abarca un vector que comprende una región polinucleotídica que codifica un polipéptido de interés, y se usa para efectuar la expresión de la proteína en una célula diana deseada. Un vector de expresión también puede comprender elementos de control unidos operativamente a la región de codificación para facilitar la expresión de la proteína en la diana. La combinación de elementos de control y un gen o genes a los que están unidos operativamente para la expresión a veces se denomina "casete de expresión", un gran número de los cuales son conocidos y están disponibles en la técnica o pueden construirse fácilmente a partir

de componentes disponibles en la técnica.

[0075] El término "heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia de codificación nativa y unido operativamente a una secuencia de codificación con la que no se encuentra unido de forma natural es un promotor heterólogo. Así, por ejemplo, un rAAV que incluye una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un producto génico heterólogo es un rAAV que incluye un polinucleótido que normalmente no se incluye en un AAV natural de tipo silvestre, y el producto génico heterólogo codificado es un producto génico normalmente no codificado por un AAV natural, de tipo silvestre.

[0076] La terminología "alteración genética" y "modificación genética" (y sus variantes gramaticales) se usa indistintamente en la presente para referirse a un proceso en donde un elemento genético (por ejemplo, un polinucleótido) se introduce en una célula mediante un proceso diferente de la mitosis o meiosis. El elemento puede ser heterólogo a la célula, o puede ser una copia adicional o una versión mejorada de un elemento ya presente en la célula. La alteración genética puede efectuarse, por ejemplo, transfectando una célula con un plásmido recombinante u otro polinucleótido a través de cualquier proceso conocido en la técnica, tal como electroporación, precipitación con fosfato de calcio, o el contacto con un complejo de polinucleótido-liposoma. La alteración genética también puede efectuarse, por ejemplo, mediante transducción o infección con un virus de ADN o ARN o un vector viral. En general, el elemento genético se introduce en un cromosoma o minicromosoma en la célula; pero cualquier alteración que cambie el fenotipo y/o genotipo de la célula y su progenie se incluye en este término.

[0077] Con respecto a la modificación celular, la terminología "genéticamente modificada" o "transformada" o "transfectada" o "transducida" por ADN exógeno (por ejemplo, a través de un virus recombinante) se refiere a cuando dicho ADN se ha introducido dentro de la célula. La presencia del ADN exógeno resulta en un cambio genético permanente o transitorio. El ADN transformante puede o no integrarse (unirse de manera covalente) al genoma de la célula. Un "clon" es una población de células derivadas de una sola célula o un antepasado común mediante mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de un crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

[0078] Como se usa en la presente, se dice que una célula está alterada, transducida,

modificada genéticamente o transformada "establemente" con una secuencia genética si la secuencia está disponible para realizar su función durante el cultivo extendido de la célula *in vitro* y/o durante un período prolongado de tiempo *in vivo*. En general, dicha célula está alterada (modificada genéticamente) "hereditariamente" en el sentido de que se introduce una alteración genética que también es heredable por la progenie de la célula alterada.

[0079] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que ha sido modificado; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, fosforilación o conjugación con un componente de etiquetado. Los polipéptidos tales como los polipéptidos antiangiogénicos, los polipéptidos neuroprotectores y similares, cuando se analizan en el contexto de la administración de un producto génico a un sujeto mamífero, y las composiciones para estos, se refieren al polipéptido intacto respectivo, o cualquier fragmento o derivado modificado por ingeniería genética del este, que conserva la función bioquímica deseada de la proteína intacta. De manera similar, las referencias a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos antiangiogénicos, ácidos nucleicos que codifican polipéptidos neuroprotectores y otros ácidos nucleicos de este tipo para uso en la administración de un producto génico a un sujeto mamífero (que pueden denominarse "transgenes" para ser administrados a una célula receptora) incluyen polinucleótidos que codifican el polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado modificado por ingeniería genética que posea la función bioquímica deseada.

[0080] Como se usa en la presente, un plásmido, ácido nucleico, vector, virus, virión, célula anfitriona, proteína u otra sustancia "aislados" se refiere a una preparación de la sustancia desprovista de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes donde la sustancia o una sustancia similar ocurren naturalmente o se preparan inicialmente. Así, por ejemplo, una sustancia aislada se puede preparar utilizando una técnica de purificación para enriquecerla a partir de una mezcla de origen. El enriquecimiento se puede medir de forma absoluta, como el peso por volumen de solución, o se puede medir en relación con una segunda sustancia, potencialmente interferente, presente en la mezcla de origen. Los enriquecimientos crecientes de las formas de realización de la presente divulgación son cada vez más aislados. Un plásmido, ácido nucleico, vector, virus, célula anfitriona u otra sustancia aislada se purifica en algunas formas de realización, por ejemplo, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % de pureza, al menos aproximadamente 90 % de pureza, al

menos aproximadamente 95 % de pureza, al menos aproximadamente el 98 % de pureza, o al menos aproximadamente el 99 %, o más, de pureza.

[0081] Tal como se usa en la presente, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir de forma completa o parcial una enfermedad o síntoma de esta y/o puede ser terapéutico en términos de curar de forma parcial o completa una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad (y/o los síntomas causados por la enfermedad) se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o en riesgo de adquirirla, pero que aún no se le haya diagnosticado; (b) inhibir la enfermedad (y/o los síntomas causados por la enfermedad), es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad (y/o los síntomas causados por la enfermedad), es decir, causar la regresión de la enfermedad (y/o los síntomas causados por la enfermedad), es decir, mejorar la enfermedad y/o uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, las composiciones y los métodos, objeto de la presente, pueden dirigirse hacia el tratamiento de enfermedades de la retina. Los métodos no limitativos para evaluar enfermedades de la retina y su tratamiento incluyen medir la función de la retina y sus cambios, por ejemplo, cambios en la agudeza visual (por ejemplo, la mejor agudeza visual corregida [BCVA], ambulación, navegación, detección de objetos y discriminación), cambios en el campo visual (por ejemplo, perimetría del campo visual estático y cinético), examen clínico (por ejemplo, examen con lámpara de hendidura de los segmentos anterior y posterior del ojo), respuesta electrofisiológica a todas las longitudes de onda de la luz y la oscuridad (por ejemplo, todas las formas de electrorretinografía [ERG] [campo completo, multifocal y patrón], todas las formas de potencial evocado visual [VEP], electrooculografía [EOG], visión del color, adaptación a la oscuridad y/o sensibilidad al contraste; medición de los cambios en la anatomía o la salud mediante mediciones anatómicas y/o fotográficas, por ejemplo, tomografía de coherencia óptica [OCT]), fotografía de fondo de ojo, oftalmoscopia por escáner láser con óptica adaptativa, fluorescencia y/o autofluorescencia; medición de la motilidad ocular y movimientos oculares (por ejemplo, nistagmo, preferencia de fijación y estabilidad), medición de resultados informados (cambios informados por el paciente en conductas y actividades visuales y no visuales, resultados informados por el paciente [PRO], evaluaciones basadas en cuestionarios de calidad de vida, actividades diarias) y mediciones de la función neurológica (por ejemplo, imágenes de resonancia magnética

funcional [MRI]).

[0082] Los términos "individuo", "anfitrión", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente y se refieren a un mamífero, incluidos, entre otros, seres humanos; primates no humanos, incluidos los simios; animales deportivos mamíferos (por ejemplo, caballos); animales de granja mamíferos (por ejemplo, ovejas, cabras, etc.); mascotas mamíferas (perros, gatos, etc.); y roedores (por ejemplo, ratones, ratas, etc.).

[0083] En algunas formas de realización, el individuo es un ser humano que ha estado expuesto previamente de forma natural a AAV y, como resultado, posee anticuerpos anti-AAV (es decir, anticuerpos neutralizantes de AAV). En algunas formas de realización, el individuo es un ser humano al que se le ha administrado previamente un vector AAV (y como resultado puede poseer anticuerpos anti-AAV) y necesita una nueva administración del vector para el tratamiento de una afección diferente o para el tratamiento adicional de la misma afección. En función de resultados positivos en ensayos clínicos que involucran la administración de genes mediante AAV, por ejemplo, al hígado, músculo y retina, todos tejidos afectados por anticuerpos neutralizantes contra este vehículo, existen muchas aplicaciones terapéuticas/enfermedades diana.

[0084] El término "cantidad eficaz" como se usa en la presente es una cantidad suficiente para producir resultados clínicos beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los fines de la presente divulgación, una cantidad eficaz de un compuesto (por ejemplo, un virión de rAAV infeccioso) es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, prevenir, retardar o retrasar la progresión de un estado de enfermedad particular (y/o los síntomas asociados a este) (por ejemplo, una enfermedad de la retina). Por consiguiente, una cantidad eficaz de un virión de rAAV infeccioso es una cantidad del virión rAAV infeccioso capaz de administrar eficazmente un ácido nucleico heterólogo a una célula diana (o células diana) del individuo. Las cantidades eficaces se pueden determinar de manera preclínica, por ejemplo, detectando en la célula o el tejido el producto génico (ARN, proteína) que está codificado por la secuencia de ácido nucleico heterólogo usando técnicas que son bien comprendidas en la técnica, por ejemplo, RT-PCR, transferencia de Western, ELISA, fluorescencia u otras lecturas de informes, y similares. Las cantidades eficaces se pueden determinar clínicamente, por ejemplo, detectando un cambio en la aparición o progresión de la enfermedad usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, autofluorescencia del fondo de ojo, angiografía con fluoresceína, OCT, microperimetría, óptica adaptativa, etc. y similares, como se describe en la presente y como se conoce en la técnica.

[0085] La terminología "célula retiniana" se refiere en la presente a cualquiera de los tipos de células que comprenden la retina, tales como, entre otras, células ganglionares de la retina (RG), células amacrinas, células horizontales, células bipolares, células fotorreceptoras, células gliales de Müller, células microgliales, y epitelio pigmentario de la retina (RPE). La terminología "células fotorreceptoras" se refiere en la presente a, entre otras, células bastón, o "bastones" y células cono o "conos". La terminología "células de Müller" o "glía de Müller" se refiere a las células gliales que sirven de soporte para las neuronas en la retina de los vertebrados.

[0086] La terminología "evolución dirigida" se refiere a una metodología de ingeniería de cápside, *in vitro* y/o *in vivo*, que emula la evolución natural a través de rondas iterativas de diversificación genética y procesos de selección, y acumula así mutaciones beneficiosas que mejoran progresivamente la función de una biomolécula. La evolución dirigida a menudo implica un método *in vivo* denominado "biopanning" para la selección de variantes de AAV de una genoteca cuyas variantes poseen un nivel más eficiente de infectividad sobre un tipo de célula o tejido de interés.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0087] Los virus adenoasociados (AAV) son una familia de parvovirus con un genoma de ADN monocatenario de 4,7 kb contenido dentro de una cápside no envuelta. El genoma viral de un AAV natural tiene 2 repeticiones terminales invertidas (ITR), que funcionan como el origen viral de replicación y señal de empaquetamiento, y flanquean 2 marcos de lectura abierta (ORF) primarios: *rep* (proteínas codificantes que funcionan en la replicación viral, la regulación transcripcional, integración específica del sitio y ensamblaje del virión) y *cap*. La ORF *cap* codifica 3 proteínas estructurales que se ensamblan para formar una cápside viral de 60 mer. Se han aislado muchas variantes y serotipos de AAV naturales, y ninguno se ha asociado a enfermedades humanas.

[0088] Se pueden usar versiones recombinantes de AAV como vectores de administración de genes, donde se inserta un marcador o gen terapéutico de interés entre las ITR en lugar de *rep* y *cap*. Se ha demostrado que estos vectores transducen células que se dividen y células que no se dividen *in vitro* e *in vivo* y pueden dar como resultado una expresión estable del transgén durante años en tejido postmitótico. Véase, por ejemplo, Knipe DM, Howley PM. *Fields' Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA, EE. UU., 2007; Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 11854–9; Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 1965; **149**:

754–6; Hoggan MD, Blacklow NR, Rowe WP. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966; **55**: 1467–74; Blacklow NR, Hoggan MD, Rowe WP. Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967; **58**: 1410–5; Bantel-Schaal U, zur Hausen H. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 1984; **134**: 52–63; Mayor HD, Melnick JL. Small deoxyribonucleic acid-containing viruses (picodnavirus group). *Nature* 1966; **210**: 331–2; Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 2004; **330**: 375–83; Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 2004; **11**: 805–10.

[0089] El AAV recombinante (denominado en la presente como "AAV") ha producido resultados prometedores en un número creciente de ensayos clínicos. Sin embargo, existen impedimentos para la administración de genes que pueden limitar la utilidad del AAV, como las respuestas inmunitarias anticápside, la baja transducción de ciertos tejidos, una incapacidad para la administración dirigida a tipos celulares específicos y una capacidad de carga relativamente baja. En muchas situaciones, el conocimiento mecanicista es insuficiente para potenciar eficazmente el diseño racional con la capacidad de mejorar el AAV. Como alternativa, la evolución dirigida ha surgido como estrategia para crear variantes de AAV novedosas que satisfacen necesidades biomédicas específicas. Las estrategias de evolución dirigida aprovechan los procesos de diversificación y selección genética para permitir la acumulación de mutaciones beneficiosas que mejoran progresivamente la función de una biomolécula. En este proceso, los genes *cap* de AAV de tipo silvestre se diversifican mediante varios enfoques para crear grandes genotecas que se empaquetan para generar genotecas de partículas virales, y luego se aplica presión selectiva para aislar nuevas variantes que pueden superar las barreras de administración de genes. Es importante destacar que la base mecánica que subyace a un problema de administración de genes no necesita ser conocida para llevar a cabo la evolución dirigida de la función, lo que puede acelerar el desarrollo de vectores mejorados.

[0090] Típicamente, las variantes descritas en la presente se generaron mediante el uso de una genoteca y/o genotecas de AAV. Dicha genoteca o genotecas de AAV se generan mediante la mutación del gen *cap*, el gen que codifica las proteínas estructurales de la cápside de AAV, mediante un rango de técnicas de evolución dirigida conocidas y fácilmente disponibles para la persona del oficio de nivel medio del campo

de la modificación por ingeniería de genomas virales. Véanse, por ejemplo, Bartel et al. Am. Soc. Gene Cell Ther. 15th Annu. Meet. 20, S140 (2012); Bowles, D. et al. J. Virol. 77, 423-432 (2003); Gray et al. Mol. Ther. 18, 570-578 (2010); Grimm, D. et al. J. Virol. 82, 5887-5911; Koerber, J. T. et al. Mol. Ther. 16, 1703-1709 (2008); Li W. et al. Mol. Ther. 16, 1252-1260 (2008); Koerber, J. T. et al. Methods Mol. Biol. 434, 161-170 (2008); Koerber, J. T. et al. Hum. Gene Ther. 18, 367-378 (2007); y Koerber, J. T. et al. Mol. Ther. 17, 2088-2095 (2009). Dichas técnicas son, entre otras, las siguientes: i) PCR propensa a errores para introducir mutaciones puntuales aleatorias en el marco de lectura abierto (ORF) *cap* de AAV a una velocidad predeterminedada y modificable; ii) recombinación viral *in vitro* o *in vivo* o "combinación aleatoria de ADN" para generar quimeras aleatorias de genes *cap* de AAV para producir una genoteca con múltiples serotipos de AAV; iii) inserciones peptídicas aleatorias en sitios definidos de la cápside mediante la ligadura de oligonucleótidos degenerados en el ORF *cap*; iv) inserciones definidas de secuencias que codifican péptidos en ubicaciones aleatorias del ORF *cap* del AAV utilizando mutagénesis de transposón; v) reemplazo de bucles de superficie de cápsides de AAV con genotecas de secuencias de péptidos diseñadas mediante bioinformación en función del nivel de conservación de cada posición de aminoácido entre serotipos naturales de AAV y variantes para generar genotecas de "intercambio de bucle"; vi) sustitución aleatoria de aminoácidos en las posiciones de degeneración entre los serotipos de AAV para generar genotecas de variantes ancestrales (Santiago-Ortiz et al., 2015); y una combinación de dichas técnicas.

[0091] La combinación aleatoria de ADN genera quimeras que combinan sus propiedades parentales de maneras únicas y a menudo beneficiosas; sin embargo, algunas pueden ser incapaces de empaquetar, lo que, en efecto, reduce la diversidad de la genoteca. La concentración de diversidad de la genoteca se logra a través de técnicas de inserción peptídicas tales como, por ejemplo, las iii-iv) anteriores. La diversidad de la genoteca también se concentra en las técnicas como la v) anterior, y dicha concentración se dirige a múltiples regiones hipervariables, que se encuentran en bucles expuestos en la superficie, de la cápside de AAV. Si bien muchas de las técnicas generan cápsides variantes con solo un área pequeña de la cápside mutada, estas técnicas pueden combinarse con estrategias de mutagénesis adicionales para modificar la cápside completa.

[0092] Una vez que la genoteca o las genotecas de AAV se generan, los virus se empaquetan, de modo que cada partícula de AAV esté purificada y compuesta por una cápside mutante que rodea un gen *cap* que codifica esa cápside. Las variantes de la

genoteca se someten luego a técnicas de presión selectiva *in vitro* y/o *in vivo* conocidas y fácilmente disponibles para las personas del oficio de nivel medio en el campo de AAV. Véanse, por ejemplo, Maheshri, N. et al. *Nature Biotech.* 24, 198-204 (2006); Dalkara, D. et al. *Sci. Transl. Med.* 5, 189ra76 (2013); Lisowski, L. et al. *Nature.* 506, 382-286 (2013); Yang, L. et al. *PNAS.* 106, 3946-3951 (2009); Gao, G. et al. *Mol. Ther.* 13, 77-87 (2006); y Bell, P. et al. *Hum. Gene. Ther.* 22, 985-997 (2011). Por ejemplo, entre otras, las variantes de AAV se pueden seleccionar utilizando i) columnas de afinidad en donde la elución de diferentes fracciones produce variantes con propiedades de unión alteradas; ii) células primarias, aisladas de muestras de tejido o líneas celulares inmortales que imitan el comportamiento de las células en el cuerpo humano, que producen variantes de AAV con mayor eficacia y/o especificidad de tejido; iii) modelos animales, que imitan un entorno clínico de tratamiento génico, que producen variantes de AAV que han infectado con éxito el tejido diana; iv) modelos de xenoinjertos humanos que producen variantes de AAV que tienen células humanas injertadas infectadas; y/o una combinación de dichas técnicas de selección.

[0093] Una vez que se seleccionan los virus, se pueden recuperar mediante técnicas conocidas como, por ejemplo, replicación mediada por adenovirus, amplificación por PCR, secuenciación y clonación de última generación, y similares. Los clones de virus luego son enriquecidos a través de rondas repetidas de las técnicas de selección, y el ADN de AAV se aísla para recuperar genes *cap* variantes seleccionados de interés. Dichas variantes seleccionadas pueden someterse a modificaciones o mutaciones adicionales y, como tales, servir como un nuevo punto de partida para otras etapas de selección para aumentar de forma iterativa la aptitud viral del AAV. Sin embargo, en ciertos casos, se han generado cápsides exitosas sin mutación adicional.

[0094] Las variantes de AAV divulgadas en la presente se generaron al menos en parte mediante el uso de una metodología de evolución dirigida *in vivo*, como las técnicas descritas anteriormente, que incluyen el uso de escaneos de retina en primates después de la administración intravítrea. Como tal, las cápsides variantes de AAV descritas en la presente comprenden una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos que confieren una transducción más eficaz de las células retinianas de primate que una proteína de la cápside de AAV parental correspondiente. Como se usa en la presente, una "proteína de la cápside del AAV parental correspondiente" se refiere a una proteína de la cápside del AAV del mismo serotipo de AAV de tipo silvestre o variante que la proteína de la cápside del AAV variante, objeto de la presente, pero que no comprende una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside

del AAV variante, objeto de la presente.

[0095] En algunas formas de realización, la proteína de la cápside del AAV variante, objeto de la presente, comprende un péptido heterólogo de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos insertados mediante un enlace covalente en un bucle GH, o bucle IV, de la proteína de la cápside del AAV en relación con una proteína de la cápside del AAV parental correspondiente. Por el "bucle GH", o bucle IV, de la proteína de la cápside del AAV se entiende la porción accesible al solvente denominada en la técnica como el bucle GH, o bucle IV, de la proteína de la cápside del AAV. Para el bucle GH/bucle IV de la cápside de AAV, véanse, por ejemplo, van Vliet et al. (2006) *Mol. Ther.* 14:809; Padron et al. (2005) *J. Virol.* 79:5047; y Shen et al. (2007) *Mol. Ther.* 15:1955. Así, por ejemplo, el sitio de inserción puede estar, aproximadamente, entre los aminoácidos 411-650 de una proteína de la cápside de AAV VP1. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 571-612 de AAV1 VP1, aminoácidos 570-611 de AAV2 VP1, entre los aminoácidos 571-612 de AAV3A VP1, entre los aminoácidos 571-612 de AAV3B VP1, entre los aminoácidos 569-610 de AAV4 VP1, entre los aminoácidos 560-601 de AAV5 VP1, entre los aminoácidos 571 a 612 de AAV6 VP1, entre los aminoácidos 572 a 613 de AAV7 VP1, entre los aminoácidos 573 a 614 de AAV8 VP1, entre los aminoácidos 571 a 612 de AAV9 VP1, o entre los aminoácidos 573 a 614 de AAV10 VP1, o los aminoácidos correspondientes de cualquiera de sus variantes. Las personas del oficio de nivel medio sabrían, basándose en una comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside de varios serotipos de AAV, donde un sitio de inserción "correspondiente a los aminoácidos de AAV2" estaría en una proteína de la cápside de cualquier serotipo de AAV. Consulte también la Figura 6 para ver una alineación de la SEQ ID NOS:1-11 de AAV de tipo silvestre, que proporciona ubicaciones de aminoácidos entre los serotipos de tipo silvestre (naturales) AAV1, AAV2, AAV3A, AAV3B y AAV4-10.

[0096] En ciertas formas de realización, el sitio de inserción es un sitio de inserción único entre dos aminoácidos adyacentes ubicados entre los aminoácidos 570-614 de VP1 de cualquier serotipo de AAV de tipo silvestre o variante de AAV, por ejemplo, el sitio de inserción está entre dos aminoácidos adyacentes ubicados entre los aminoácidos 570-610, aminoácidos 580-600, aminoácidos 570-575, aminoácidos 575-580, aminoácidos 580-585, aminoácidos 585-590, aminoácidos 590-600, o aminoácidos 600-614, de VP1 de cualquier serotipo o variante de AAV. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 580 y 581, los aminoácidos 581 y 582, los aminoácidos 583 y 584, los aminoácidos 584 y 585, los aminoácidos 585 y 586, los

aminoácidos 586 y 587, los aminoácidos 587 y 588, aminoácidos 588 y 589, o aminoácidos 589 y 590. El sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 575 y 576, los aminoácidos 576 y 577, los aminoácidos 577 y 578, los aminoácidos 578 y 579, o los aminoácidos 579 y 580. El sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 590 y 591, los aminoácidos 591 y 592, los aminoácidos 592 y 593, los aminoácidos 593 y 594, los aminoácidos 594 y 595, los aminoácidos 595 y 596, los aminoácidos 596 y 597, los aminoácidos 597 y 598, aminoácidos 598 y 599, o aminoácidos 599 y 600. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 587 y 588 de AAV2, entre los aminoácidos 590 y 591 de AAV1, entre los aminoácidos 588 y 589 de AAV3A, entre los aminoácidos 588 y 589 de AAV3B, entre los aminoácidos 584 y 585 de AAV4, entre los aminoácidos 575 y 576 de AAV5, entre los aminoácidos 590 y 591 de AAV6, entre los aminoácidos 589 y 590 de AAV7, entre los aminoácidos 590 y 591 de AAV8, entre los aminoácidos 588 y 589 de AAV9, o entre los aminoácidos 588 y 589 de AAV10.

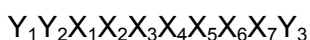
[0097] En algunas formas de realización, una inserción peptídica divulgada en la presente tiene una longitud de 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 8 aminoácidos, 9 aminoácidos, 10 aminoácidos, 11 aminoácidos, 12 aminoácidos, 13 aminoácidos, 14 aminoácidos, 15 aminoácidos, 16 aminoácidos, 17 aminoácidos, 18 aminoácidos, 19 aminoácidos o 20 aminoácidos. En otra forma de realización, una inserción peptídica divulgada en la presente comprende de 1 a 4 aminoácidos espaciadores en el terminal amino (terminal N) y/o en el terminal carboxilo (terminal C) de cualquiera de las inserciones peptídicas descritas en la presente. Los aminoácidos espaciadores de ejemplo incluyen, entre otros, leucina (L), alanina (A), glicina (G), serina (S), treonina (T) y prolina (P). En ciertas formas de realización, una inserción peptídica comprende 2 aminoácidos espaciadores en el terminal N y 2 aminoácidos espaciadores en el terminal C. En otras formas de realización, una inserción peptídica comprende 2 aminoácidos espaciadores en el terminal N y 1 aminoácido espaciador en el terminal C.

[0098] Las inserciones peptídicas descritas en la presente no se han descrito y/o insertado previamente en una cápside de AAV. Sin la intención de limitarse por ninguna teoría, la presencia de cualquiera de las inserciones peptídicas descritas puede actuar para disminuir la afinidad de la cápside variante con el sulfato de heparina, lo que probablemente reduce la unión a la matriz extracelular en el frente de la retina de primate. Además, los motivos de inserción peptídicas descritos en la presente pueden otorgar una transducción mejorada de células retinianas de primates mediante la adición de un dominio de unión a receptor de la superficie celular.

[0099] En algunas formas de realización preferidas, el péptido de inserción comprende

una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las fórmulas a continuación.

[00100] En algunos aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 10 aminoácidos de longitud, de la Fórmula 1a:



Donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X_1 se selecciona de Gln, Asn, His, Ile y Ala

X_2 se selecciona de Ala, Gln, Asp, Ser, Lys y Pro

X_3 se selecciona de Asp, Ile, Thr y Asn

X_4 se selecciona de Thr, Ser, Tyr, Gln, Glu y Ala

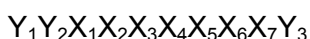
X_5 se selecciona de Thr, Lys y Asn

X_6 se selecciona de Lys, Asn y Glu

X_7 se selecciona de Asn, Thr, Ile, His, Asp y Ala.

[00101] En ciertas formas de realización, el péptido de inserción de la Fórmula 1a comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), ASDSTKA (SEQ ID NO:15), NQDYTKT (SEQ 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), y QANANEN (SEQ ID NO:22).

[00102] En otros aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 10 aminoácidos de longitud, de la Fórmula 1b:



Donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X_1 se selecciona de Gln, Asn, His e Ile

X_2 se selecciona de Ala, Gln, Asp y Ser

X_3 se selecciona de Asp y Ile

X_4 se selecciona de Thr, Tyr y Gln

X_5 se selecciona de Thr y Lys

X_6 se selecciona de Lys y Asn

X_7 se selecciona de Asn, Thr, Ile y His

[00103] En ciertas formas de realización, el péptido de inserción de la Fórmula 1b comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), NQDYTKT (SEQ NO:16), HDITKNI (SEQ ID NO:17), y HQDTTKN (SEQ ID NO:19).

[00104] En otros aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 10

aminoácidos de longitud, de la Fórmula 1c



Donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X_1 se selecciona de Gln, Asn, His e Ile

X_2 se selecciona de Ala, Gln y Ser

X_3 se selecciona de Thr, Tyr y Gln

X_4 se selecciona de Asn, Thr y His

[00105] En ciertas formas de realización, el péptido de inserción de la Fórmula 1c comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), NQDYTKT (SEQ NO:16), y HQDTTKN (SEQ ID NO:19).

[00106] En otros aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 10 aminoácidos de longitud, de la Fórmula 1d:



Donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X_1 se selecciona de Gln y Ile

X_2 se selecciona de Ala y Ser

X_3 se selecciona de Thr y Gln

X_4 se selecciona de Asn y His

[00107] En ciertas formas de realización, el péptido de inserción de Fórmula 1d comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13) y ISDQTKH (SEQ ID NO:14).

[00108] En otros aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 11 aminoácidos de longitud, de la Fórmula 1e



Donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X_1 se selecciona de Gln y Ile

X_2 se selecciona de Ala y Ser

X_3 se selecciona de Glu y Ala

X_4 se selecciona de Asn y His

[00109] En otras formas de realización, un péptido de inserción de la Fórmula 1e comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de ISNENEH (SEQ ID NO:21), y QANANEN (SEQ ID NO:22).

[00110] En otra forma de realización adicional, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 11 aminoácidos de longitud, de la Fórmula IIa:



Donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X_1 se selecciona entre Q, N, A, H e I;

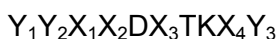
X_2 se selecciona de Q, A, P y S;

X_3 se selecciona de T, Y, S y Q; y

X_4 se selecciona de T, N, A y H.

[00111] En una forma de realización adicional de una inserción peptídica de una secuencia de aminoácidos de la fórmula $X_1X_2DX_3TKX_4$, la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), ASDSTKA, NQDYTKT (SEQ NO:16), HQDTTKN (SEQ ID NO:19), y HPDTTKN (SEQ ID NO:18).

[00112] En algunas de dichas formas de realización, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 11 aminoácidos de longitud, de la Fórmula IIb:



[00113] Donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X_1 se selecciona de N, A, y H;

X_2 se selecciona de Q, P y S;

X_3 se selecciona de T, Y y S; y

X_4 se selecciona de T, N y A.

[00114] En una forma de realización adicional de una inserción peptídica de una secuencia de aminoácidos de la fórmula $X_1X_2DX_3TKX_4$, la inserción peptídica se selecciona del grupo que consiste en ASDSTKA, NQDYTKT (SEQ NO:16), HQDTTKN (SEQ ID NO:19), y HPDTTKN (SEQ ID NO:18).

[00115] En otras formas de realización, el péptido de inserción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de KDRAPST (SEQ ID NO:26), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25) y GKSKVID (SEQ ID NO:23).

[00116] En algunas formas de realización, el péptido de inserción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de ASDSTKA (SEQ ID NO:15), QANANEN (SEQ ID NO:22), QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), 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), GKSKVID

(SEQ ID NO:23), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25) y KDRAPST (SEQ ID NO:26).

[00117] En otras formas de realización preferidas, el péptido de inserción tiene de 1 a 3 aminoácidos espaciadores (Y_1 - Y_3) en el terminal amino y/o carboxilo de una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), 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) y KDRAPST (SEQ ID NO:26). En algunas de dichas formas de realización, el péptido de inserción se selecciona del grupo que consiste en: 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).

[00118] En algunas formas de realización, la proteína de la cápside de AAV variante, objeto de la presente, no incluye ninguna otra modificación de la secuencia de aminoácidos distinta de una inserción peptídica de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos en el bucle GH, o el bucle IV. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la proteína de cápside de AAV variante, objeto de la presente, comprende una inserción peptídica que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en QQADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), 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), y la cápside de AAV variante no incluye ninguna otra sustitución, inserción o

eliminación de aminoácidos (es decir, la proteína de la cápside de AAV variante comprende dicha inserción y es por lo demás idéntica a la correspondiente proteína de la cápside de AAV). Dicho de otra manera, la proteína de la cápside de AAV variante que comprende dicha inserción es, por lo demás, idéntica a la proteína de la cápside del AAV parental en la que se insertó el péptido. Como otro ejemplo, la proteína de la cápside de AAV variante, objeto de la presente, comprende una inserción peptídica que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), 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), NKT TNKD (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), LAPNSTHGS (SEQ ID NO:40) y LAKDRAPSTA (SEQ ID NO:41), en donde la inserción peptídica se ubica entre los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de la cápside de AAV2 o los aminoácidos correspondientes de una VP1 de otro AAV parental, por ejemplo, entre los aminoácidos 588 y 589 de VP1 de AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 o AAV9, entre los aminoácidos 586 y 587 de VP1 de AAV4, entre los aminoácidos 577 y 578 de VP1 de AAV5, entre los aminoácidos 589 y 590 de VP1 de AAV7, entre los aminoácidos 590 a 591 de VP1 de AAV8 o AAV10, etc., en donde la proteína de la cápside del AAV variante es por lo demás idéntica a la secuencia de la proteína de la cápside del AAV correspondiente, por ejemplo, de SEQ ID NOs:1-12.

[00119] En otras formas de realización, la proteína de la cápside de AAV variante, objeto de la presente, además de comprender una inserción peptídica, por ejemplo, como se describe en la presente o como se conoce en la técnica, en el bucle GH, comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 sustituciones o eliminaciones de aminoácidos, por ejemplo, de 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a 50, de

aproximadamente 50 a 100 sustituciones o eliminaciones de aminoácidos en comparación con la proteína de la cápside del AAV parental. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una proteína de cápside variante, objeto de la presente, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, o 98 % o más, por ejemplo, o 99 % de identidad con la correspondiente cápside del AAV parental, por ejemplo, una proteína de la cápside de tipo silvestre como se establece en las SEQ ID NOs:1-12.

[00120] En una forma de realización adicional, una o más sustituciones de aminoácidos se encuentran en los residuos de aminoácidos 1, 15, 34, 57, 66, 81, 101, 109, 144, 164, 176, 188, 196, 226, 236, 240, 250, 312, 363, 368, 449, 456, 463, 472, 484, 524, 535, 551, 593, 698, 708, 719, 721, y/o 735 de la proteína de la cápside de AAV2 VP1 como se numeró antes de la inserción del péptido, o los residuos de aminoácidos correspondientes de otra proteína de la cápside del AAV. En algunas de dichas formas de realización, una o más sustituciones de aminoácidos 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 de la proteína de la cápside de AAV2 VP1 como se enumera antes de la inserción del péptido, o los residuos de aminoácidos correspondientes de otra proteína de la cápside del AAV.

[00121] En una forma de realización preferida, se proporciona una proteína de cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en donde la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de ISDQTKH (SEQ ID NO:14), LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) y LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir, distinto de AAV2), en el que los aminoácidos sustituidos no aparecen naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. En algunas formas de realización, una o más sustituciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en: M1L+L15P+P535S, P34A, P34A+S721L, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, Q164K+V708I, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V,

I240T, N312K, N312K+N449D+D472N+N551S+I698V+L735Q, P363L, R484C+V708I, T456K y V708I. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV.

[00122] En una forma de realización particularmente preferida, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o que comprende, consiste esencialmente, o consiste en la secuencia de aminoácidos LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) o LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) entre los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de AAV2 o los aminoácidos correspondientes de otra cápside de AAV, y además comprende una sustitución de aminoácido P34A en el residuo 34 en relación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o el residuo correspondiente de otra cápside de AAV. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o más, de la identidad de la secuencia de aminoácidos en toda la longitud de la secuencia de aminoácidos que se indica en la SEQ ID NO:2 o la cápside de AAV parental correspondiente. En una forma de realización particularmente preferida, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKAAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGG
NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
KRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
GYFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLAISDQTKHARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPI

GTRYLTRNL (SEQ ID NO:42)

[00123] En otra forma de realización particularmente preferida, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o que comprende, consiste esencialmente, o consiste en la secuencia de aminoácidos LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) o LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) entre los aminoácidos 587 y 588 de la proteína de la cápside del AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende una sustitución del aminoácido N312K en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside del AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental y opcionalmente comprende además las sustituciones de aminoácidos N449D, D472N, N551S, I698V y/o L735Q en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o las sustituciones correspondientes en otro serotipo de AAV parental. En otra forma de realización particularmente preferida, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o comprende, consiste esencialmente, o consiste en la secuencia de aminoácidos LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) o LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende sustituciones de aminoácidos N312K, N449D, D472N, N551S, I698V y L735Q en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o sustituciones en los residuos correspondientes en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98% o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En una forma de realización particularmente preferida, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFG
NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPAGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
KRLNFGQTGDADSVDPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW

GYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLKFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTDT
PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRNQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLAISDQTKHARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEVQYTSNynksVNVDFTVDTNGVYSEPRP
IGTRYLTRNQ (SEQ ID NO:43)

[00124] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica localizada entre los aminoácidos 588 y 589 de VP1 de AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 o AAV9, los aminoácidos 586 y 587 de AAV4, los aminoácidos 577 y 578 de AAV5, aminoácidos 589 y 590 de AAV7, o aminoácidos 590 a 591 de AAV8 o AAV10, la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de ISDQTKH (SEQ ID NO:14), LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) y LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) y b) una sustitución de valina a isoleucina en el aminoácido 709 de AAV3A o AAV3B, una sustitución de alanina a isoleucina en la posición 709 de AAV1 o AAV6, una sustitución de asparagina a isoleucina en el aminoácido 707 de AAV4 o el aminoácido 709 de AAV9 o una sustitución de treonina a isoleucina en el aminoácido 710 de AAV7 o aminoácido 711 de AAV8 o AAV10 o una sustitución de glutamina a isoleucina en el aminoácido 697 de AAV5 y es opcionalmente, por lo demás, idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y 3-12. En formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o que comprende, consiste esencialmente, o consiste en la secuencia de aminoácidos LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) o LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) una sustitución de aminoácidos de valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína de la cápside variante comprende de 2 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos.

[00125] En otra forma de realización, la proteína de la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o que comprende, consiste esencialmente, o consiste en la secuencia de aminoácidos LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) o LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) una sustitución de aminoácidos de

valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y es por lo demás idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

[00126] En otra forma de realización, la proteína de la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o que comprende, consiste esencialmente, o consiste en la secuencia de aminoácidos LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) o LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y es por lo demás idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
NLGRAVFQAKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
KRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
GYFDNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLGISDQTKHARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVDFTVDTNGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:44)

[00127] En una forma de realización preferida, se proporciona una proteína de cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en donde la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13) y LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27), y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir, distinto de AAV2), en el que los aminoácidos sustituidos no aparecen naturalmente en las posiciones correspondientes:

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, L735Q y una combinación de estas, preferentemente seleccionada de S109T, P250S, A524T, A593E, I698V, V708I, y/o V719M. El sitio de inserción peptídica está ubicado preferentemente entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. En una forma de realización particularmente preferida, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos QADTTKN (SEQ ID NO:13) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende una sustitución de aminoácido I698V en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental, en donde los aminoácidos sustituidos no ocurren naturalmente en la posición correspondiente. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 98% o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la sustitución de aminoácidos correspondiente es una sustitución de aminoácidos I699V en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV3A, AAV3B o AAV9, una sustitución I687V en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV5, una sustitución I700V en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV7, una sustitución de I701V en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV8 o AAV10. En una forma de realización particularmente preferida, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

MAADGYLPDWLEDLTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFG
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPAGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
 KRLNFGQTGDADSVDPDPQPLGQPPAAPSGLGTTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
 SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW

GYFDENRFHCHFSRDLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSLNVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLAQADTTKNARQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFA
SFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPR
PIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:45)

[00128] En otras formas de realización preferidas, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos QADTTKN (SEQ ID NO:13) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende una sustitución de aminoácido V719M y opcionalmente una sustitución V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental, en donde los aminoácidos sustituidos no ocurren naturalmente en la posición correspondiente.

[00129] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica localizada entre los aminoácidos 588 y 589 de VP1 de AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 o AAV9, los aminoácidos 586 y 587 de AAV4, los aminoácidos 577 y 578 de AAV5, aminoácidos 589 y 590 de AAV7, o aminoácidos 590 a 591 de AAV8 o AAV10, la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13) y LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27) y b) una sustitución de valina a isoleucina en el aminoácido 709 de AAV3A o AAV3B, una sustitución de alanina a isoleucina en la posición 709 de AAV1 o AAV6, una sustitución de asparagina a isoleucina en el aminoácido 707 de AAV4 o el aminoácido 709 de AAV9 o una sustitución de treonina a isoleucina en el aminoácido 710 de AAV7 o aminoácido 711 de AAV8 o AAV10 o una sustitución de glutamina a isoleucina en el aminoácido 697 de AAV5. En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica ubicada entre los aminoácidos 588 y 589 de VP1 de AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 o AAV9, los aminoácidos 586 y 587 de AAV4, los aminoácidos 577 y 578 de AAV5, los aminoácidos 589 y 590 de AAV7, o los aminoácidos 590 a 591

de AAV8 o AAV10, en donde la inserción del péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de QADTTKN (SEQ ID NO:13) y LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27) y b) una sustitución de aminoácidos de serina a treonina en la posición 109 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV4, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10 o en la posición 108 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV5 o AAV6. En formas de realización preferidas, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos QADTTKN (SEQ ID NO:13) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y comprende una sustitución de serina a treonina en el aminoácido 109 (S109T) o una sustitución de aminoácidos de valina a isoleucina en el aminoácido 708 (V708I) en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos y tiene preferiblemente al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o más de identidad de secuencia de aminoácidos en toda la longitud de la secuencia de aminoácidos que se indica en la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización preferidas, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos QADTTKN (SEQ ID NO:13) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende una sustitución de serina a treonina en el aminoácido 109 y una sustitución de valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2.

[00130] En otra forma de realización, la proteína de la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos QADTTKN (SEQ ID NO:13) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) al menos una sustitución de aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos de la cápside variante no comprende una sustitución de aminoácidos de valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y no comprende una sustitución de serina por treonina en el aminoácido 109 en comparación con la secuencia de aminoácidos de

AAV2.

[00131] En otra forma de realización, la proteína de la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos TNRTSPD (SEQ ID NO:13) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

[00132] En otra forma de realización preferida, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de HDITKNI (SEQ ID NO:17), IAHDITKNIA (SEQ ID NO:60) y LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, N312K, P363L, D368H, R389S, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V708I, V719M, S721L, L735Q y una combinación de estas. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside del AAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de S109T, R389S, A593E y/o V708I. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. En una forma de realización preferida, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos HDITKNI (SEQ ID NO:17) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos IAHDITKNIA (SEQ ID NO:60) o LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y comprende una sustitución de aminoácidos en S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00133] En otra forma de realización más, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos HDITKNI (SEQ ID NO:17) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos IAHDITKNIA (SEQ ID NO:60) o LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFG
NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
KRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
GYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTTIANNL
TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN LAHDITKNIA RQAATADVNTQGVLPGMVWQDRD
VYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAKFASF
ITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIG
TRYLTRNL (SEQ ID NO:46)

[00134] En otras formas de realización, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAHDITKNIA entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) al menos una sustitución de aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos de la cápside variante no comprende una sustitución de aminoácido de valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. En otras formas de realización, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos DITKNIA (SEQ ID NO:61) o que comprende, que consiste esencialmente, o consiste en la secuencia de aminoácidos IAHDITKNIA (SEQ ID NO:60) o LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) una sustitución V708I en

comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. En otras formas de realización, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) dos o más sustituciones de aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido de valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2.

[00135] En otra forma de realización preferida, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de NQDYTKT (SEQ ID NO:16) y LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31), y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside del AAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de S109T, S109T+S463Y, D368H y V708I. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. En una forma de realización preferida, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos NQDYTKT (SEQ ID NO:16) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y comprende una sustitución de aminoácidos en V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización más, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de

aminoácidos NQDYTKT (SEQ ID NO:16) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDLTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
KRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
GYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN **LANQDYTKTA** RQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:47)

[00136] En otras formas de realización, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos NQDYTKT (SEQ ID NO:16) o que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia de aminoácidos LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) una sustitución de aminoácidos en S109T en comparación con la secuencia de SEQ ID NO:2 y opcionalmente una sustitución de aminoácidos en S463Y, en donde la cápside variante es al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % idéntica a la longitud total de la secuencia de aminoácidos que se indica en la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización relacionadas, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos NQDYTKT (SEQ ID NO:16) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31) entre los aminoácidos 587

y 588 de la cápside de AAV2 y b) una sustitución de aminoácidos en S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

[00137] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica localizada entre los aminoácidos 588 y 589 de VP1 de AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 o AAV9, los aminoácidos 586 y 587 de AAV4, los aminoácidos 577 y 578 de AAV5, los aminoácidos 589 y 590 de AAV7, o los aminoácidos 590 a 591 de AAV8 o AAV10, la inserción del péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de NQDYTKT (SEQ ID NO:16) y LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31) y b) una sustitución de aminoácidos de asparagina a lisina en la posición 313 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV1 o AAV6, o en la posición 314 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV9, o una sustitución de serina a lisina en la posición 312 de AAV3A o AAV3B o en la posición 315 de AAV8 o AAV10, o una sustitución de arginina a lisina en la posición 303 de AAV4 o AAV5, o en la posición 314 de AAV7. En otra forma de realización, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos NQDYTKT (SEQ ID NO:16) o que comprende, consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) una sustitución de aminoácido en N312K, en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos.

[00138] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside del AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en donde la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de PNSTHGS (SEQ ID NO:25) y LAPNSTHGSA (SEQ ID NO:40) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. En

una forma de realización preferida, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos PNSTHGS (SEQ ID NO:25) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAPNSTHGSA (SEQ ID NO:40) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y comprende una sustitución de aminoácidos en V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización más, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos PNSTHGS (SEQ ID NO:25) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAPNSTHGSA (SEQ ID NO:40) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPAGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
 KRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
 SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
 GYDFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
 YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
 PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
 TKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
 EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLAPNSTHGSARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
 DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAKFAS
 FITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPI
 GTRYLTRNL (SEQ ID NO:48)

[00139] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV

variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de NKTTNKDA (SEQ ID NO:62) y LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. En una forma de realización preferida, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos NKTTNKDA (SEQ ID NO:62) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y comprende una sustitución de aminoácido en N449D en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos NKTTNKDA (SEQ ID NO:62) o que comprende, que consiste esencialmente, o consiste en la secuencia de aminoácidos LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2, y es por lo demás idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR

KRLNFGQTGDADSVDPDPQPLGQPPAAPSGGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
GYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLANKTTNKDARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:49)

[00140] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de TNRTSPD (SEQ ID NO:24) y LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39), y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. En una forma de realización relacionada, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica localizada entre los aminoácidos 588 y 589 de VP1 de AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 o AAV9, los aminoácidos 586 y 587 de AAV4, los aminoácidos 577 y 578 de AAV5, los aminoácidos 589 y 590 de AAV7, o aminoácidos 590 a 591 de AAV8 o AAV10, la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de TNRTSPD (SEQ ID NO:24) y LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39) y b) una sustitución de valina a isoleucina en el aminoácido 709 de AAV3A o AAV3B, una sustitución de alanina a isoleucina en la posición 709 de AAV1 o AAV6, una sustitución de asparagina a isoleucina en el aminoácido 707 de AAV4 o el aminoácido 709 de AAV9 o una sustitución de treonina a isoleucina en el aminoácido 710 de AAV7 o aminoácido

711 de AAV8 o AAV10 o una sustitución de glutamina a isoleucina en el aminoácido 697 de AAV5. En otras formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) una sustitución de valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos. En otra forma de realización, la proteína de la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos TNRTSPD (SEQ ID NO:24) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) una sustitución de aminoácidos de valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00141] En aun otra forma de realización, la proteína de la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos TNRTSPD (SEQ ID NO:24) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
 KRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
 SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
 GYDFDNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
 YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
 PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA

TKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LATNRTSPDA**RQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:50)

[00142] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de GKSKVID (SEQ ID NO:23) y LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante comprende una inserción peptídica localizada entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 que comprende la secuencia de aminoácidos GKSKVID (SEQ ID NO:23) o que comprende esencialmente o consiste en la secuencia de aminoácidos LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38) y por lo demás es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización, la cápside de AAV variante comprende a) una inserción peptídica que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y comprende al menos una sustitución de aminoácido.

[00143] En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente

98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDLTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPAGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
KRLNFGQTGDADSVDPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
GYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
TKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLAGKSKVIDARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVDFTVDTNGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:51)

[00144] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de ASDSTKA (SEQ ID NO:15) y LAASDSTKAA (SEQ ID NO:30) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización adicional, la cápside variante comprende una inserción peptídica

que comprende la secuencia de aminoácidos ASDSTKA (SEQ ID NO:15) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAASDSTKAA (SEQ ID NO:30) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
 KRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
 SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
 GYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
 YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
 PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
 TKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
 EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLAASDSTKAARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
 DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAKFAS
 FITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYNKSvNVDFTVDTNGVYSEPRPI
 GTRYLTRNL (SEQ ID NO:52)

[00145] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de KDRAPST (SEQ ID NO:26) y LAKDRAPTSA (SEQ ID NO:41) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está

ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización más, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos KDRAPST (SEQ ID NO:26) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAKDRAPTSA (SEQ ID NO:41) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
 KRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
 SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
 GYDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
 YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
 PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
 TKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
 EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN **LAKDRAPSTAR**QAATADVNTQGVLPGMVWQDR
 DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAKFAS
 FITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPI
 GTRYLTRNL (SEQ ID NO:53)

[00146] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de HQDTTKN (SEQ ID NO:19) y LAHQDTTKNA (SEQ ID NO:34) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la sustitución correspondiente en otro

serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en una o más de las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización más, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos HQDTTKN (SEQ ID NO:19) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAHQDTTKNA (SEQ ID NO:34) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPAGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
 KRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
 SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
 GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
 YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
 PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
 TKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
 EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LAHQDTTKNA**RQAATADVNTQGVLPGMVWQD
 RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFA
 SFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNynKSVNVDFTVDTNGVYSEPR
 PIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:54)

[00147] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de ISNENEH (SEQ ID NO:21) y LPISNENEHA (SEQ ID NO:36) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en una o más de las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización más, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISNENEH (SEQ ID NO:21) o que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LPISNENEHA (SEQ ID NO:36) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
 KRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
 SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
 GYDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
 YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT

PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
 TKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
 EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLPISNENEHARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
 DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFAS
 FITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNKNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPI
 GTRYLTRNL (SEQ ID NO:55)

[00148] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de QANANEN (SEQ ID NO:22) y LPQANANENA (SEQ ID NO:37) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización más, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos QANANEN (SEQ ID NO:22) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LPQANANENA (SEQ ID NO:37) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPF
 NGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG

NLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPAR
 KRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGN
 SSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPW
 GYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNL
 TSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSF
 YCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNT
 PSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA
 TKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEE
 EIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LPQANANENAR**QAATADVNTQGVLPGMVWQD
 RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFA
 SFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNynKSVNVDFTVDTNGVYSEPR
 PIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:56)

[00149] En otra forma de realización, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende a) una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside, en la que la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de HPDITTKN (SEQ ID NO:18) y LAHPDITTKNA (SEQ ID NO:33) y b) una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la sustitución correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde los aminoácidos sustituidos no se encuentran naturalmente en las posiciones correspondientes: 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, L735Q y una combinación de estas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otra forma de realización más, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos HPDITTKN (SEQ ID NO:18) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAHPDITTKNA (SEQ ID NO:33) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 % de identidad de secuencia o es 100 % idéntica a la siguiente secuencia de aminoácido:

[00150] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGY
KYLGPFGNLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKE
DTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKA
GQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEG
ADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYF
GYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGT
TTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQA
VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
YLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSE
YSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEK
VMITDEEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LAHPDTTKNAR**QAATADVNTQGVLP
MVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTF
SAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNG
VYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:57).

[00151] En algunos aspectos, se proporciona una proteína de la cápside de AAV variante que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en relación con una proteína de la cápside de AAV parental, en donde la proteína de la cápside variante, cuando está presente en un virión de AAV, confiere un aumento de la infectividad de una célula retiniana en comparación con la infectividad una célula retiniana por un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental.

[00152] En algunas formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución del aminoácido P34A en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o una sustitución del aminoácido P33A en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV5 (SEQ ID NO:6). En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:6 y comprende una sustitución de aminoácidos P34A o P33A en comparación con la secuencia de aminoácidos de la

cápside de AAV2 o AAV5, respectivamente. En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución de aminoácido P34A en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido P34A en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00153] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 164 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no ocurre naturalmente en la posición correspondiente. En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 164 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2). En algunas formas de realización, el virión de rAAV comprende una sustitución aminoácidos de glutamina a lisina en el aminoácido 164 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV1, AAV2 o AAV6 o en el aminoácido 165 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV7, AAV8 o AAV10; o comprende una sustitución de serina a lisina en el aminoácido 160 de AAV5 o comprende una sustitución de alanina a lisina en el aminoácido 164 de AAV9. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 164 (por ejemplo, Q164K) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2), en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos

que comprende una sustitución de aminoácido Q164K en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos Q164K y V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o las sustituciones correspondientes en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2) y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00154] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 698 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no ocurre naturalmente en la posición correspondiente. En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 698 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2). En algunas formas de realización, el virión de rAAV comprende una sustitución de aminoácidos de isoleucina a valina en el aminoácido 698 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, o en el aminoácido 699 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV3A, AAV3B o AAV9, o en el aminoácido 687 de AAV5, o en el aminoácido 700 de AAV7, o en el aminoácido 701 de AAV8 o AAV10. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 699 (por ejemplo, I698V) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2), en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución de aminoácido I698V en

comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00155] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 109 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2). En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 109 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2). En algunas formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácidos de serina a treonina en la posición 109 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV4, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10 o en la posición 108 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV5 o AAV6. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos AAV2, en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos. En otras formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido S109T y una sustitución de aminoácido A593E en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos S109T y A493V y opcionalmente A593E y/o V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o las sustituciones correspondientes en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2) y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos S109T, A493V, A593E y V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o las sustituciones correspondientes en otro serotipo de AAV parental

(es decir, diferente de AAV2) y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos S109T y V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00156] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 593 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2). En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 593 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2). En algunas formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácidos de glicina a glutamato en el aminoácido 594 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV1, AAV3A, AAV6 o AAV9, o en el aminoácido 583 de AAV5, o en el aminoácido 596 de AAV8 o AAV10, o una sustitución de aminoácidos de arginina a glutamato en el aminoácido 594 de AAV3B, o una sustitución de aminoácidos de aspartato a glutamato en el aminoácido 592 de AAV4 o una sustitución de aminoácidos de glutamina a glutamato en la posición 595 de AAV7. En otras formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido A593E en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y no comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2: I19V, V369A, K26R, N215D, G355S, V46A y S196P. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside

variante comprende las sustituciones de aminoácidos A593E y N596D en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende sustituciones de aminoácido N596D y A593E en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de AAV2. En otras formas de realización, la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos A593E y V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende sustituciones de aminoácido A593E y V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de AAV2.

[00157] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no ocurre naturalmente en la posición correspondiente. Preferentemente, el virión de rAAV no comprende una sustitución de prolina a serina en el aminoácido 250 en comparación con AAV2 o un aminoácido correspondiente en otro serotipo de AAV parental. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2). En formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende las sustituciones de valina a isoleucina (V708I) en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos

aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2, en donde la proteína de la cápside variante no comprende una sustitución de aminoácido P250S. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de valina a isoleucina en el aminoácido 709 de AAV3A o AAV3B, una sustitución de alanina a isoleucina en la posición 709 de AAV1 o AAV6, una sustitución de asparagina a isoleucina en el aminoácido 707 de AAV4 o aminoácido 709 de AAV9 o una sustitución de treonina a isoleucina en el aminoácido 710 de AAV7 o el aminoácido 711 de AAV8 o AAV10 o una sustitución de glutamina a isoleucina en el aminoácido 697 de AAV5. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos AAV2, en donde la proteína de la cápside variante comprende de 2 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos y en donde la proteína de la cápside variante no comprende una sustitución de aminoácido P250S. En otras formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido V708I y también comprende una sustitución de aminoácido A593E y/o S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. En otras formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende sustituciones de aminoácido V708I y A593E en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y, en donde la proteína de la cápside variante, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de AAV2. En otras formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende sustituciones de aminoácido V708I y S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína de la cápside variante, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de AAV2. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos V708I y V719M en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos V708I y R733C en comparación

con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos V708I y G727D en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00158] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 196 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no ocurre naturalmente en la posición correspondiente y es opcionalmente distinto de la prolina. En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 196 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) y es opcionalmente distinta de una sustitución S196P. En formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácidos de serina a tirosina en el aminoácido 196 de AAV2 o AAV9 o en el aminoácido 197 de AAV7, AAV8 o AAV10 o en el aminoácido 186 de AAV5; o una sustitución de alanina a tirosina en el aminoácido 196 de AAV1 o AAV6; o una sustitución de metionina a tirosina en el aminoácido 191 de AAV4; o una sustitución de treonina a tirosina en el aminoácido 196 de AAV3A o AAV3B. En una forma de realización relacionada, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución de aminoácido S196Y en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y, por lo

demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 196 que no es una sustitución S196P (por ejemplo, comprende una sustitución S196Y) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2), en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00159] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 175 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no ocurre naturalmente en la posición correspondiente. En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 175 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2). En algunas formas de realización, la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido Q175H en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO:2 o una sustitución de glutamina a histidina en la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 175 (por ejemplo, Q175H) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2), en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00160] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 64 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir, diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no ocurre naturalmente en la posición correspondiente.

En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 y comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 64 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2). En algunas formas de realización, el virión rAAV comprende una sustitución de aminoácido P64S en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO:2 o una sustitución de prolina a serina en la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental. En formas de realización relacionadas, la proteína de la cápside variante comprende una sustitución de aminoácido en el aminoácido 64 (por ejemplo, P64S) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2), en donde la proteína de la cápside variante comprende de 1 a 5, de 5 a 10, o de 10 a 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 expuesta en la SEQ ID NO:2.

[00161] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % idéntica a una secuencia de la cápside de AAV de tipo silvestre seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12 y también comprende i) una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en P34A, S109T+V708I, A593E+N596D, V708I+V719M, V708I+G727D, S109T+A493V+A593E+V708I, V708I+R733C, Q164K, y I698V y/o (ii) una inserción peptídica seleccionada de un grupo que consiste en QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), ASDSTKA (SEQ ID NO:15), NQDYTKT (SEQ ID NO:16), HDITKNI (SEQ ID NO:17), PQANANEN (SEQ ID NO:63), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25), KDRAPST (SEQ ID NO:26), HQDTTKN (SEQ ID NO:19), HPDTTKN (SEQ ID NO:18), NKTTNKD (SEQ ID NO:20), GKSKVID (SEQ ID NO:23), PISNENEH (SEQ ID NO:64), LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27), LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29), LAASDSTKAA (SEQ ID NO:30), LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32), LPQANANENA (SEQ ID NO:37), LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31), LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39), LAPNSTHGSA (SEQ ID NO:40), LAKDRAPSTA (SEQ ID NO:41), LAHQDTTKNA (SEQ ID NO:34), LAHPDTTKNA (SEQ ID NO:33), LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35), LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38), y LPISNENEHA (SEQ

ID NO:36). En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos especificadas y/o inserciones peptídicas y, por lo demás, es idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1-12.

[00162] En algunas formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante es una proteína de la cápside ancestral. Por una proteína de la cápside ancestral se entiende un antepasado evolutivo de una proteína de la cápside que se encuentra en la naturaleza hoy en día, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, que se genera in silico por sustitución aleatoria de aminoácidos en las posiciones de degeneración entre las proteínas de la cápside de AAV que se encuentran en la naturaleza hoy en día. A continuación se proporciona un ejemplo no limitativo de una cápside ancestral, en donde las posiciones de degeneración (residuos 264, 266, 268, 448, 459, 460, 467, 470, 471, 474, 495, 516, 533, 547, 551, 555, 557, 561, 563, 577, 583, 593, 596, 661, 662, 664, 665, 710, 717, 718, 719, 723) están marcadas con una "X":

[00163] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG
YKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQ
EDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGK
KGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQPLGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNE
GADGVGNASGNWHCDSTWLGD RVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSXSXGXTNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTND
GVTTIANNLSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQ
AVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYL
YYLXRTQSTGGTAGXXELLFSQXGPXXMSXQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLXQNNNS
NFAWTGATKYHLNGRXSLVNPGVAMATHKDDEXRFFPSSGVLIFGKXGAGXNNTXLX
NVMXTXEEEEIKTTNPVATEXYGVVAXNLQSSNTAPXTGXVNSQGALPGMVWQNRDV
YLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPXXFXXAKFASFI
TQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYAKSXNVDFAVXXXGVYXEPRPIG
TRYLTRNL (SEQ ID NO:58)

[00164] En algunas formas de realización, la proteína de la cápside ancestral comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:58 En algunas formas de realización, la proteína de la

cápside ancestral comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, o mayor identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud total de la secuencia de aminoácidos de AAV2, por ejemplo la expuesta en la SEQ ID NO:2 En algunas formas de realización, la proteína de la cápside ancestral comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, o más, de identidad de la secuencia de aminoácido a la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de la secuencia ancestral descrita en la SEQ ID NO:58 o en la SEQ ID NO:2 y comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: alanina (A) en 264, alanina (A) en 266, serina (S) a 268, alanina (A) a 448, treonina (T) a 459, arginina (R) a 460, alanina (A) a 467, serina (S) a 470, asparagina (N) a 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. En algunas formas de realización preferidas, la proteína de la cápside variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 %, y 100 % en algunas instancias, de identidad de la secuencia de aminoácido a la longitud completa de la siguiente secuencia de aminoácidos y comprende 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.

[00165] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG

YKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQ
EDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGK
KGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPLGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNE
GADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASAGSTNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTND
GVTTIANNLSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQ
AVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNLIDQYL
YYLARTQSTGGTAGTRELLFSQAGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLSQNNN
SNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNVGVAMATHKDDERFFPSSGVLFKGQAGANNTA
LENVMMTSEEEIKTTNPVATEQYGVVASNLQSSNTAPVTGTVNSQGALPGMVWQNR
DVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAVFTPAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYAKSTNVDFAVDNEGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:59).

[00166] En otras formas de realización, una proteína de la cápside de AAV variante comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % idéntica a una secuencia de la cápside de AAV de tipo silvestre seleccionada del grupo que consiste en la variante ancestral descrita en la presente como SEQ ID NO:58, y comprende 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; y también comprende i) una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en P34A, S109T+V708I, A593E+N596D, V708I+V719M, V708I+G727D, S109T+A493V+A593E+V708I, V708I+R733C, Q164K, y I698V y/o (ii) una inserción peptídica seleccionada del grupo que consiste en QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), ASDSTKA (SEQ ID NO:15), NQDYTKT (SEQ ID NO:16), HDITKNI (SEQ ID NO:17), PQANANEN (SEQ ID NO:63), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25), KDRAPST (SEQ ID NO:26), HQDTTKN (SEQ ID NO:19), HPDTTKN (SEQ ID NO:18), NKTTNKD (SEQ ID NO:20), GKSKVID (SEQ ID NO:23), PISNENEH (SEQ ID NO:64), LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27),

LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29), LAASDSTKAA (SEQ ID NO:30), LAHDITKNIA (SEQ ID NO:32), LPQANANENA (SEQ ID NO:37), LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31), LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39), LAPNSTHGSA (SEQ ID NO:40), LAKDRAPSTA (SEQ ID NO:41), LAHQDTTKNA (SEQ ID NO:34), LAHPDTTKNA (SEQ ID NO:33), LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35), LAGKSKVIDA (SEQ ID NO:38), y LPISNENEHA (SEQ ID NO:36). En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos especificadas y/o inserciones peptídicas y, por lo demás, es idéntica a SEQ ID NO:59.

[00167] Las variantes de AAV descritas en la presente se generaron mediante el uso de evolución dirigida *in vivo* que involucra el uso de escaneos de retinas en primates después de la administración intravítrea. En algunas formas de realización, las proteínas de la cápside variante divulgadas en la presente, cuando están presentes en un virión de AAV, confieren un aumento de la transducción de una célula retiniana en comparación con la transducción de una célula retiniana por un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental o un AAV de tipo silvestre. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las proteínas de la cápside variante divulgadas en la presente, cuando están presentes en un virión de AAV, confieren una transducción más eficiente de las células retinianas de primate que los viriones de AAV que comprenden la proteína de la cápside de AAV parental correspondiente o la proteína de la cápside de AAV de tipo silvestre, por ejemplo, las células retinianas absorben más viriones de AAV que comprenden la proteína de la cápside de AAV variante, objeto de la presente, que los viriones de AAV que comprenden la proteína de la cápside de AAV parental o AAV de tipo silvestre. En algunas de dichas formas de realización, el virión variante de AAV o variante rAAV exhiben un aumento de al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de la transducción de una célula retiniana, en comparación con la transducción de la célula retiniana por un virión de AAV de tipo silvestre o rAAV que comprende la proteína de la cápside de AAV parental correspondiente. En algunas de dichas formas de realización, las proteínas de la cápside variante divulgadas en la presente, cuando están presentes en un virión de AAV, confieren una transducción más amplia de una célula retiniana de primate que viriones de AAV que comprenden la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental o una proteína de la cápside de AAV de tipo silvestre. En otras palabras, el virión de AAV variante transduce los tipos de células no transducidos por los viriones que comprenden la proteína de la cápside de

AAV parental correspondiente y, por lo tanto, más tipos de células en la retina que el virión de AAV parental. En algunas formas de realización, el virión variante de AAV transduce preferentemente una célula retiniana, por ejemplo, un virión de rAAV, objeto de la presente, infecta una célula retiniana con una especificidad de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces o de más de 50 veces, mayor que otra célula retiniana o una célula no retiniana, por ejemplo, una célula fuera del ojo. En algunas formas de realización, la célula retiniana transducida es una célula fotorreceptora (por ejemplo, bastones; conos). En algunas formas de realización, la célula retiniana es una célula ganglionar de la retina (RGC). En algunas formas de realización, la célula retiniana es una célula epitelial de la retina (célula RPE). En algunas formas de realización, la célula retiniana es una célula glial de Müller. En algunas formas de realización, la célula retiniana es una célula microglial. En algunas formas de realización, la célula retiniana es una célula amacrina. En algunas formas de realización, la célula retiniana es una célula bipolar. En algunas formas de realización, la célula retiniana es una célula horizontal. Un aumento en la transducción de una célula retiniana, por ejemplo, una mayor eficiencia de la transducción, una transducción más amplia, una transducción más preferencial, etc., puede evaluarse fácilmente *in vitro* o *in vivo* mediante cualquier número de métodos en la técnica para medir la expresión génica. Por ejemplo, el AAV se puede empaquetar con un genoma que comprende un casete de expresión que comprende un gen indicador, por ejemplo, una proteína fluorescente, bajo el control de un promotor ubicuo o específico del tejido, y la extensión de la transducción se evalúa detectando la proteína fluorescente, por ejemplo, con un microscopio fluorescente. A modo de ejemplo adicional, el AAV se puede empaquetar con un genoma que comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por barras, y la extensión de la transducción puede evaluarse detectando la secuencia de ácido nucleico mediante, por ejemplo, PCR. A modo de ejemplo adicional, el AAV se puede empaquetar con un genoma que comprende un casete de expresión que comprende un gen terapéutico para el tratamiento de una enfermedad de la retina, y la extensión de la transducción se evalúa detectando el tratamiento de la enfermedad de la retina en un paciente afectado a quien se le administró AAV.

[00168] Las enfermedades oculares que pueden tratarse utilizando un vector variante de rAAV o un virión y/o un método descrito en la presente incluyen, entre otras, enfermedades monogénicas, enfermedades genéticas complejas, enfermedades adquiridas y lesiones traumáticas. Los ejemplos de enfermedades monogénicas incluyen, entre otros, el síndrome de Bardet-Biedl; enfermedad de Batten; distrofia

Cristalina de Bietti; coroideremia, atrofia coriorretiniana; degeneración coriorretiniana; distrofias de cono o cono-bastón (autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al X); ceguera nocturna congénita estacionaria (autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X); trastornos de la visión del color, incluida la acromatopsia (incluidos ACHM2, ACHM3, ACHM4 y ACHM5), protanopia, deuteranopia y tritanopia; la ataxia de Friedreich; amaurosis congénita de Leber (autosómica dominante y autosómica recesiva), que incluye, entre otros, LCA1, LCA2, LCA3, LCA4, LCA6, LCA7, LCA8, LCA12, y LCA15; neuropatía óptica hereditaria de Leber; distrofia macular (autosómica dominante y autosómica recesiva), que incluye, entre otros, degeneración macular aguda, distrofia macular viteliforme de Best, distrofia en patrón, distrofia macular de Carolina del Norte, drusas heredadas, distrofia de Sorsby del fondo de ojo, malattia levantinese y retinopatía prematura determinada de manera genética; enfermedad del desarrollo ocular-retiniano; albinismo ocular; atrofas ópticas (autosómicas dominantes, autosómicas recesivas y ligadas al cromosoma X); retinitis pigmentosa (rasgos autosómicos dominantes, autosómicos recesivos, ligados al cromosoma X y mitocondrialmente heredados), cuyos ejemplos incluyen RP1, RP2, RP3, RP10, RP20, RP38, RP40 y RP43; retinosquiasis ligada al cromosoma X; enfermedad de Stargardt; y el síndrome de Usher, incluidos, entre otros, USH1B, USH1C, USH1D, USH1F, USH1G, USH2A, USH2C, USH2D, y USH3. Los ejemplos de enfermedades genéticas complejas incluyen, entre otros, glaucoma (de ángulo abierto, de ángulo cerrado, de baja tensión, de tensión normal, congénito, neovascular, pigmentario, pseudoexfoliativo); degeneración macular relacionada con la edad y otras formas, tanto la forma exudativa como no exudativa (autosómica dominante y autosómica recesiva), como ser la degeneración macular aguda, la degeneración macular viteliforme; retinopatía del prematuro; y el síndrome de Vogt Koyanagi-Harada (VKH). Los ejemplos de enfermedades adquiridas incluyen, entre otras, neurorretinopatía macular aguda; neuropatía óptica isquémica anterior y neuropatía óptica isquémica posterior; enfermedad de Behcet; oclusión de la rama de la vena retiniana; neovascularización coroidea; retinopatía diabética, incluida la retinopatía diabética proliferativa y las complicaciones asociadas; uveítis diabética; edema, tal como edema macular, edema macular cistoide y edema macular diabético; trastornos de la membrana epirretiniana; telangiectasia macular; coroiditis multifocal; disfunción de la retina diabética no relacionada a retinopatía; tumores oculares; atrofas ópticas; desprendimiento de retina; trastornos de la retina, como oclusión de la vena central de la retina, vitreorretinopatía proliferativa (RVP), enfermedad de la retina arterial y oclusiva

venosa, oclusión vascular, enfermedad de la retina uveítica; derrame uveal; enfermedad infecciosa e infiltrativa de la retina; enfermedades del nervio óptico tales como la atrofia óptica adquirida. Los ejemplos de lesiones traumáticas incluyen, entre otros, histoplasmosis; traumatismo del nervio óptico; traumatismo ocular que afecta un sitio o localización ocular posterior; trauma retiniano, infección viral del ojo; infección viral del nervio óptico; afección ocular posterior causada o influenciada por un tratamiento con láser ocular; afecciones oculares posteriores causadas o influenciadas por una terapia fotodinámica; fotocoagulación, retinopatía por radiación; y oftalmia simpática.

[00169] En otra forma de realización, una cápside variante descrita en la presente comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico tal como, entre otros, un ARN de interferencia, un ARN largo no codificante, un ARN corto no codificante, un ARN antisentido, un aptámero, un polipéptido, un anticuerpo secretado, un anticuerpo de cadena, un dominio V_{HH} , un receptor soluble, una molécula affibody, un *knottin*, un DARPin, un centurin, una chaperona, una nucleasa específica de sitio que sirve para la reducción específica de sitio de la función del gen o una nucleasa específica de sitio modificada que proporciona la activación específica de sitio de la transcripción específica del gen.

[00170] Un virión variante de rAAV divulgado en la presente comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico. En algunas formas de realización, el producto génico es un ARN de interferencia. En algunas formas de realización, el producto génico es un ARN largo no codificante. En algunas formas de realización, el producto génico es un ARN corto no codificante. En algunas formas de realización, el producto génico es un ARN antisentido. En algunas formas de realización, el producto génico es un aptámero. En algunas formas de realización, el producto génico es un polipéptido. En algunas formas de realización, el producto génico es un anticuerpo secretado. En algunas formas de realización, el producto génico es un anticuerpo monocatenario. En algunas formas de realización, el producto génico es un dominio V_{HH} . En algunas formas de realización, el producto génico es un receptor soluble. En algunas formas de realización, el producto génico es una molécula affibody. En algunas formas de realización, el producto génico es un *knottin*. En algunas formas de realización, el producto génico es un DARPin. En algunas formas de realización, el producto génico es un centurin. En algunas formas de realización, el producto génico es una chaperona. En algunas formas de realización, el producto génico es una nucleasa específica del sitio que proporciona la eliminación de la función génica específica del sitio.

[00171] Los usos del producto génico incluyen, entre otros, aumentar el nivel de un factor en una célula, aumentar el nivel de un factor en una célula vecina a través de la secreción de un factor, disminuir el nivel de un factor en una célula, o disminuir el nivel de un factor en una célula vecina a través de la secreción de un factor. El producto génico puede diseñarse para complementar el nivel de un producto génico defectuoso o faltante, disminuir el nivel de un producto génico faltante o defectuoso, introducir un nuevo producto génico de soporte, complementar el nivel de un producto génico de soporte, disminuir el nivel de un producto génico obstaculizador, o tanto disminuir el nivel de un producto génico obstaculizador como introducir o complementar el nivel de un producto génico de soporte.

[00172] Los productos génicos suministrados por la variante de AAV, objeto de la presente, se pueden usar para alterar el nivel de los productos génicos o la actividad del producto génico directa o indirectamente relacionada con las enfermedades y trauma de la retina. Los genes cuyos productos génicos están relacionados directa o indirectamente con enfermedades genéticas incluyen, por ejemplo, factor de ADP-ribosilación tipo 6 (ARL6); proteína BBSome 1 interactiva (BBIP1); proteína BBSome 1 (BBS1); proteína BBSome 2 (BBS2); proteína BBSome 4 (BBS4); proteína BBSome 5 (BBS5); proteína BBSome 7 (BBS7); proteína BBSome 9 (BBS9); proteína BBSome 10 (BBS10); proteína BBSome 12 (BBS12); proteína centrosomal 290 kDa (CEP290); proteína 172 del transporte intraflagelar (IFT172); proteína 27 de transporte intraflagelar (IFT27); inositol polifosfato-5-fosfatasa E (INPP5E); el miembro 13 de la subfamilia J del canal de potasio rectificador de entrada (KCNJ13); factor de transcripción de cremallera de leucina tipo 1 (LZTFL1); proteína del síndrome de McKusick-Kaufman (MKKS); proteína de síndrome de Meckel tipo 1 (MKS1); proteína de nefronoptosis 3 (NPHP1); antígeno 8 del cáncer de colon definido serológicamente (SDCCAG8); proteína 32 que contiene motivos tripartitos (TRIM32); dominio de repetición tetratricopéptido 8 (TTC8); proteína de la enfermedad de Batten (CLN3); citocromo P450 4V2 (CYP4V2); proteína escolta Rab 1 (CHM); dominio PR (positivo regulador) que contiene proteína 13 (PRDM13); receptor acoplado a proteína G retinal RPE (RGR); miembro de la familia de dominios TEA 1 (TEAD1); proteína tipo 1 del receptor de interacción con arilhidrocarburo (AIPL1); factor de transcripción de caja homeo del fotorreceptor tipo cono-bastón otx (CRX); proteína activadora 1A de guanilato ciclasa (GUCA1A); ciclasa de guanilato específica de retina (GUCY2D); miembro 3 de la familia asociada a la membrana de transferencia de fosfatidilinositol (PITPNM3); prominina 1 (PROM1); periferina (PRPH); periferina 2 (PRPH2); proteína 1 de regulación de la membrana

sináptica de exocitosis (RIMS1); semaforina 4A (SEMA4A); homólogo humano de proteína C. elegans unc119 (UNC119); transportador de casete de unión a ATP - retiniano (ABCA4); dominio 9 de ADAM metalopeptidasa (ADAM9); factor 6 activador de transcripción (ATF6); marco de lectura abierto 2 de cromosoma 21 (C21orf2); marco de lectura abierto 37 de cromosoma 8 (C8orf37); canal de calcio; dependiente de voltaje; subunidad 4 alfa 2/delta (CACNA2D4); miembro 1 de la familia relacionada con cadherina (protocadherina 21) (CDHR1); proteína de tipo ceramida quinasa (CERKL); subunidad alfa del canal catiónico activado por cGMP del fotorreceptor de cono (CNGA3); subunidad beta 3 del canal catiónico activado por nucleótido cónico cíclico (CNGB3); ciclina M4 (CNNM4); proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G); polipéptido 2 de actividad de transducción alfa (GNAT2); miembro de la subfamilia V del canal potasio 2 (KCNV2); fosfodiesterasa 6C (PDE6C); fosfodiesterasa 6H (PDE6H); proteína centriolar B de proteoma de centriolo 1 (POC1B); miembro RAB28 de la familia oncogénica RAS (RAB28); factor de transcripción de caja homeo 2 de retina y pliegue neural anterior (RAX2); 11-cis retinol deshidrogenasa 5 (RDH5); proteína interactiva 1 RP regulador GTPasa (RPGRIP1); miembro 5 de la familia de tipo tubulina tirosina ligasa (TTLL5); subunidad alfa-1 del canal de calcio regulado por voltaje de tipo L (CACNA1F); regulador de la GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR); subunidad alfa de transducina de bastón (GNAT1); subunidad beta de bastón cGMP fosfodiesterasa (PDE6B); rodopsina (RHO); proteína de unión al calcio 4 (CABP4); receptor 179 acoplado a proteína G (GPR179); rodopsina quinasa (GRK1); receptor metabotrópico de glutamato 6 (GRM6); proteína 3 de dominios transmembrana similares a inmunoglobulinas ricas en leucina (LRIT3); arrestina (antígeno-s) (SAG); familia 24 de portadores de soluto (SLC24A1); canal catiónico del potencial receptor transitorio, subfamilia M, miembro 1 (TRPM1); nictalopina (NYX); opsina de cono verde (OPN1LW); opsina de cono rojo (OPN1MW); opsina de cono azul (OPN1SW); frataxina (FXN); inosina monofosfato deshidrogenasa 1 (IMPDH1); proteína de caja homeo ortodentículo 2 (OTX2); gránulos homólogos 1 (CRB1); proteína 1 que contiene dominio de muerte (DTHD1); factor de diferenciación de crecimiento 6 (GDF6); transporte intraflagelar 140 de proteína homóloga de Chlamydomonas (IFT140); proteína B1 que contiene motivo IQ (IQCB1); lebercilina (LCA5); lecitina retinol aciltransferasa (LRAT); nicotinamida nucleótido adenililtransferasa 1 (NMNAT1); proteína RD3 (RD3); retinol deshidrogenasa 12 (RDH12); proteína de 65 kD específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE65); espermatogénesis asociada a la proteína 7 (SPATA7); proteína tipo tubby 1 (TULP1); genes mitocondriales (KSS, LHON, MT-ATP6, MT-TH, MT-TL1, MT-TP, MT-TS2 NADH

deshidrogenasas codificadas de manera mitocondrial [MT-ND]); bestrofina 1 (BEST1); C1q y colágeno de proteína 5 relacionada a necrosis tumoral (C1QTNF5); proteína 1 de la matriz extracelular tipo fibrilina que contiene EGF (EFEMP1); elongación de proteína muy larga de ácidos grasos (ELOVL4); homólogo 2 de fascina de la retina, proteína de agrupamiento de actina (FSCN2); proteína activadora de guanilato ciclasa 1B (GUCA1B); hemicentina 1 (HMCN1); proteoglicano 1 de la matriz de interfotoreceptores (IMPG1); proteína 1 tipo retinitis pigmentosa 1 (RP1L1); inhibidor tisular de las metaloproteinasas-3 (TIMP3); factor de complemento H (CFH); factor de complemento D (CFD); complemento del componente 2 (C2); complemento del componente 3 (C3); factor de complemento B (CFB); modulador de autofagia 2 regulado por daño del ADN (DRAM2); proteoglicano sulfato de condroitina 2 (VCAN); mitofusina 2 (MFN2); miembro 1 de la subfamilia del receptor nuclear 2 del grupo F (NR2F1); atrofia óptica 1 (OPA1); proteína transmembranal 126A (TMEM126A); homólogo A de la translocasa 8 de la membrana mitocondrial interna (TIMM8A); anhidrasa carbónica IV (CA4); hexoquinasa 1 (HK1); proteína 7 tipo kelch (KLHL7); receptor nuclear subfamilia 2 grupo E3 (NR2E3); cierre de lucina de la retina neural (NRL); familia 2 de receptor olfatorio subfamilia W grupo E3 (OR2W3); factor 3 de procesamiento de pre-mARN (PRPF3); factor 4 de procesamiento pre-mARN (PRPF4); factor de procesamiento pre-mARN 6 (PRPF6); factor 8 de procesamiento de pre-mARN (PRPF8); factor 31 de procesamiento de pre-mARN (PRPF31); proteína 1 de la membrana del segmento externo de la retina (ROM1); proteína 1 de retinitis pigmentosa (RP1); proteína 1 asociada a PIM1-quinasa (RP9); pequeña ribonucleoproteína nuclear 200kDa (SNRNP200); fosfoproteína secretada 2 (SPP2); proteína rica serina/arginina ligante a topoisomerasa I (TOPORS); proteína ligante tipo 2 del factor de ADP-ribosilación (ARL2BP); marco de lectura abierto 71 de cromosoma 2 (C2orf71); clarina-1 (CLRN1); subunidad alfa del canal activado por cGMP del bastón (CNGA1); subunidad alfa del canal activado por cGMP del bastón (CNGB1); citocromo P450 4V2 (CYP4V2); deshidrodolichildifosfato sintetasa (DHDDS); polipéptido de caja DEAH 38 (DHX38); subunidad 1 del complejo proteico de membrana ER (EMC1); homólogo de ojos cerrados/creador de espacio (EYS); familia con similitud de secuencia 161 miembro A (FAM161A); receptor acoplado a proteína G 125 (GPR125); heparan-alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa (HGSNAT); isocitrato deshidrogenasa específica de NAD(+) 3 beta (IDH3B); proteoglicano 2 de la matriz de interfotoreceptores (IMPG2); proteína KIAA1549 (KIAA1549); proteína centrosómica kizuna (KIZ); quinasa asociada a células germinales masculinas (MAK); receptor protooncogénico c-mer tirosina quinasa

(MERTK); mevalonato quinasa (MVK); quinasa 2 relacionada con NIMA (nunca en el gen A de la mitosis) (NEK2); proteína de diferenciación neuronal 1 (NEUROD1); subunidad alfa de fosfodiesterasa cGMP (PDE6A); gamma de bastón específica fosfodiesterasa 6G cGMP (PDE6G); proteína de degeneración progresiva de bastón-cono (PRCD); proteína de unión a retinol 3 (RBP3); proteína 1 de unión a retinaldehído (RLBP1); miembro 14 de la familia 7 de portadores de soluto (SLC7A14); usherina (USH2A); proteína de dedo de zinc 408 (ZNF408); proteína de dedo de zinc 513 (ZNF513); proteína del síndrome 1 oral-facial-digital (OFD1); retinitis pigmentosa 2 (RP2); retinosquisina (RS1); proteína 12 que contiene dominio abhidrolasa (ABHD12); gen 23 similar a cadherina (CDH23); proteína centrosomal 250 kDa (CEP250); miembro 2 de la familia de unión a calcio e integrina (CIB2); whirlina (DFNB31); homólogo de susceptibilidad a convulsión audiogénica monogénica 1 (GPR98); histidil-ARNt sintetasa (HARS); miosina VIIA (MYO7A); protocadherina 15 (PCDH15); harmonina (USH1C); homólogo humano de proteína de andamio de ratón que contiene repeticiones de anquirina y dominio SAM (USH1G); distrofina (DMD); norrina (NDP); fosfoglicerato quinasa (PGK1); calpaína 5 (CAPN5); homólogo del receptor Frizzled-4 Wnt (FZD4); proteína 2B de membrana integral (ITM2B); proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5); micro ARN 204 (MIR204); proteína 1 del retinoblastoma (RB1); tetraspanina 12 (TSPAN12); marco de lectura abierto 65 de cromosoma 12 (C12orf65); cadherina 3 (CDH3); proteína relacionada con frizzled de tipo membrana (MFRP); ornitina aminotransferasa (OAT); fosfolipasa A2 grupo V (PLA2G5); proteína de unión a retinol 4 (RBP4); regulador de la señalización 9 de la proteína G (RGS9); regulador de la proteína G de unión a la señalización 9 (RGS9BP); ARMS2; proteína 6 de grupo de complementación de reparación por escisión de complementación cruzada de reparación de deficiencia de roedor (ERCC6); fibulina 5 (FBLN5); HtrA serina peptidasa 1 (HTRA1); receptor tipo toll 3 (TLR3); y receptor 4 tipo toll (TLR4).

[00173] Los genes cuyos productos génicos inducen o promueven la apoptosis se denominan en la presente "genes proapoptóticos" y los productos de esos genes (mARN, proteína) se denominan "productos génicos proapoptóticos". Las dianas proapoptóticas incluyen, por ejemplo, productos génicos Bax; productos génicos Bid; productos génicos Bak; productos génicos Bad; Bcl-2; Bcl-X1. Los productos génicos antiapoptóticos incluyen un inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X.

[00174] Los genes cuyos productos génicos inducen o promueven la angiogénesis se denominan en la presente "genes proangiogénicos" y los productos de esos genes

(mARN, proteína) se denominan "productos génicos proangiogénicos". Las dianas proangiogénicas incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFa, VEGFb, VEGFc, VEGFd); receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1); receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); tirosina quinasa 1 relacionada con Fms (Flt1); factor de crecimiento de la placenta (PGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); angiopoyetinas; sonic hedgehog. Los genes cuyos productos génicos inhiben la angiogénesis se denominan en la presente "genes antiangiogénicos" y los productos de esos genes (mARN; proteína) se denominan "productos génicos antiangiogénicos". Los productos génicos antiangiogénicos incluyen endostatina; tumstatina; angiostatina; factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) y proteínas de fusión o anticuerpos que son específicos para dianas proangiogénicas y/o sus receptores, por ejemplo, las proteínas de fusión anti-VEGF sFLT1 o Eylea, los anticuerpos específicos de VEGF Lucentis™ y Avastin™, etc.

[00175] Los genes cuyos productos génicos funcionan como moduladores inmunitarios, por ejemplo, factores de complemento, receptores de tipo toll, se denominan "genes inmunomoduladores". Los genes inmunomoduladores ejemplares incluyen citocinas, quimiocinas y las proteínas de fusión o anticuerpos que son específicos para ellas y/o sus receptores, por ejemplo, la proteína de fusión anti-IL-6 Rilonacept™, el anticuerpo lampalizumab específico del factor H del complemento, etc. Genes cuyos productos génicos funcionan como factores neuroprotectores, por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR); factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF); factor de viabilidad de conos derivado de bastones (RdCVF); factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); neurturina (NTN); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor de crecimiento nervioso (NGF); neurotrofina-4 (NT4); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico. Genes cuyos productos génicos funcionan como opsinas sensibles a la luz, por ejemplo, opsina; rodopsina; canal de rodopsina; halorodopsina.

[00176] En algunos casos, un producto génico de interés es una endonucleasa específica del sitio que proporciona la función génica de eliminación específica del sitio, por ejemplo, donde la endonucleasa destruye un alelo asociado con una enfermedad de la retina. Por ejemplo, cuando un alelo dominante codifica una copia defectuosa de un gen que, cuando es de tipo silvestre, es una proteína estructural de la retina y/o proporciona una función retiniana normal, una endonucleasa específica del sitio puede dirigirse al alelo defectuoso e inactivarlo.

[00177] Además de eliminar un alelo defectuoso, también se puede usar una nucleasa específica del sitio para estimular la recombinación homóloga con un ADN donante que codifica una copia funcional de la proteína codificada por el alelo defectuoso. Por lo tanto, por ejemplo, un virión de rAAV, objeto de la presente, se puede usar para entregar una endonucleasa específica del sitio que inactiva un alelo defectuoso, y se puede usar para entregar una copia funcional del alelo defectuoso, lo que resulta en la reparación del alelo defectuoso, y de esta manera facilita la producción de una proteína retiniana funcional (por ejemplo, retinosquisina funcional, RPE65 funcional, periférica funcional, etc.). Véase, por ejemplo, Li et al. (2011) *Nature* 475:217. En algunas formas de realización, un virión de rAAV divulgado en la presente comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una endonucleasa específica de sitio; y una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una copia funcional de un alelo defectuoso, donde la copia funcional codifica una proteína retiniana funcional. Las proteínas retinianas funcionales incluyen, por ejemplo, retinosquisina, RPE65, proteína-1 interactiva con el regulador de GTPasa (RGPR) de retinitis pigmentosa, periférica, periférica-2, y similares.

[00178] Las endonucleasas específicas del sitio que son adecuadas para su uso incluyen, por ejemplo, meganucleasas; nucleasas de dedos de zinc (ZFN); nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN); y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas en intervalos regulares/asociadas a CRISPR (Cas), donde dichas endonucleasas específicas del sitio no ocurren de forma natural y se modifican para dirigirse a un gen específico. Dichas nucleasas específicas del sitio pueden diseñarse para cortar ubicaciones específicas dentro de un genoma, y la unión del extremo no homóloga puede reparar la ruptura al insertar o eliminar varios nucleótidos. Estas endonucleasas específicas del sitio (también denominadas "INDEL") luego arrojan la proteína fuera del marco y eliminan el gen de manera efectiva. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense N.º 2011/0301073.

[00179] En algunas formas de realización del vector rAAV variante que se describe en la presente, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está unida operativamente a un promotor constitutivo. Los promotores constitutivos adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Stinski et al. (1985) *Journal of Virology* 55 (2): 431-441), el promotor temprano de CMV/ β -actina de pollo (CBA)/intrón de β -globina de conejo (CAG) (Miyazaki et al. (1989) *Gene* 79 (2): 269-277), CB^{SB} (Jacobson et al. (2006) *Molecular Therapy* 13 (6): 1074-1084), el promotor del factor 1 α de alargamiento humano (EF1 α) (Kim et al. (1990) *Gene* 91(2):

217-223), el promotor de fosfoglicerato quinasa humana (PGK) (Singer-Sam et al. (1984) *Gene* 32 (3): 409-417, el promotor mitocondrial de cadena pesada (Loderio et al. (2012) *PNAS* 109 (17): 6513-6518), el promotor de ubiquitina (Wulff et al. (1990) *FEBS Letters* 261: 101-105). En otras formas de realización, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está unida operativamente a un promotor inducible. En algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está unida operativamente a un elemento regulador de tejido específico o específico de tipo celular. Por ejemplo, en algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está unida operativamente a un elemento regulador específico de un fotorreceptor (por ejemplo, un promotor específico de un fotorreceptor), por ejemplo, un elemento regulador que confiere expresión selectiva del gen unido de manera funcional en una célula fotorreceptora. Los elementos reguladores específicos de fotorreceptores adecuados incluyen, por ejemplo, un promotor de rodopsina; un promotor de la rodopsina quinasa (Young et al. (2003) *Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:4076); un promotor del gen beta fosfodiesterasa (Nicoud et al. (2007) *J. Gen med.* 9:1015); un promotor del gen de la retinitis pigmentosa (Nicoud et al. (2007) *supra*); un potenciador del gen de la proteína de unión a retinoides interfotorreceptores (IRBP) (Nicoud et al. (2007) *supra*); un promotor del gen IRBP (Yokoyama et al. (1992) *Exp Eye Res.* 55:225), un promotor del gen opsina (Tucker et al. (1994) *PNAS* 91:2611-2615), un promotor del gen de la retinosquisina (Park et al. (2009) *Gene Therapy* 16 (7):916-926), un promotor del gen de la proteína del homeodominio CRX (Furukawa et al. (2002) *The Journal of Neuroscience* 22 (5): 1640-1647), un promotor del gen del polipéptido 1 de la actividad de transducción alfa de la proteína de unión al nucleótido de guanina (GNAT1) (Lee et al. (2010) *Gene Therapy* 17:1390-1399), un promotor del gen de la proteína de la cremallera de leucina (NRL) específica de la retina neural (Akimoto et al. (2006) *PNAS* 103(10): 3890-3895), un promotor de arrestina de cono humano (hCAR) (Li et al. (2002) *Biochemistry and Molecular Biology* 43: 1375-1383), y los promotores PR2.1, PR1.7, PR1.5 y PR1.1 (Ye et al. (2016) *Human Gene Therapy* 27 (1): 72-82)). En algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está unida operativamente a un elemento regulador específico de la célula del epitelio pigmentario de la retina (RPE) (por ejemplo, un promotor específico de RPE), por ejemplo, un elemento regulador que confiere expresión selectiva del gen unido operativamente en una célula RPE. Los elementos reguladores específicos de RPE adecuados incluyen, por ejemplo, un promotor del gen RPE65 (Meur et al. (2007) *Gene Therapy* 14: 292-303), un promotor

del gen de la proteína de unión al retinaldehído celular (CRALBP) (Kennedy et al. (1998) *Journal of Biological Chemistry* 273: 5591-5598), un promotor del gen del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, también conocido como serpin F1) (Kojima et al. (2006) *Molecular and Cellular Biochemistry* 293 (1-2): 63-69), y un promotor de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (Esumi et al. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279(18): 19064-19073). En algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está unida operativamente a un elemento regulador específico de la célula glial de Müller (por ejemplo, un promotor específico de la glía), por ejemplo, un elemento regulador que confiere expresión selectiva del gen unido operativamente en una célula glial retiniana. Los elementos reguladores específicos de glías adecuados incluyen, por ejemplo, un promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Besnard et al. (1991) *Journal of Biological Chemistry* 266(28): 18877-18883). En algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico de interés está unida operativamente a un elemento regulador específico de la célula bipolar (por ejemplo, un promotor específico bipolar), por ejemplo, un elemento regulador que confiere la expresión selectiva del gen unido operativamente en una célula bipolar. Los elementos reguladores específicos bipolares adecuados incluyen, por ejemplo, un promotor GRM6 (Cronin et al. (2014) *EMBO Molecular Medicine* 6(9): 1175-1190).

[00180] Para los fines de la invención, la divulgación en la presente proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de AAV variante como se describe anteriormente. Un ácido nucleico aislado puede ser un vector AAV, por ejemplo, un vector AAV recombinante.

[00181] La divulgación en la presente también proporciona un método para tratar una enfermedad de la retina, en donde el método comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de un virión variante de rAAV que comprende un transgén de interés como se describe anteriormente y se describe en la presente. La persona del oficio de nivel medio sería capaz de determinar fácilmente una cantidad eficaz del virión rAAV objeto de la presente, y que la enfermedad se había tratado probando un cambio en uno o más parámetros funcionales o anatómicos, por ejemplo, agudeza visual, campo visual, electrofisiológico. capacidad de respuesta a la luz y la oscuridad, visión del color, sensibilidad al contraste, anatomía, salud reticular y vasculatura, motilidad ocular, preferencia de fijación y estabilidad.

[00182] Los métodos no limitativos para evaluar la función de la retina y los cambios en la misma incluyen evaluar la agudeza visual (por ejemplo, la mejor agudeza visual

corregida [ACVV], la ambulación, la navegación, la detección de objetos y la discriminación), evaluar el campo visual (por ejemplo, la perimetría del campo visual estático y cinético), realizar un examen clínico (por ejemplo, examen con lámpara de hendidura de los segmentos anterior y posterior del ojo), evaluar la respuesta electrofisiológica a todas las longitudes de onda de la luz y la oscuridad (por ejemplo, todas las formas de electroretinografía [ERG] [campo completo, multifocal y patrón], todas las formas de potencial evocado visual [VEP], electrooculografía [EOG], visión del color, adaptación a la oscuridad y/o sensibilidad al contraste). Los métodos no limitativos para evaluar la anatomía y la salud de la retina y los cambios en la misma incluyen la tomografía de coherencia óptica (OCT), la fotografía de fondo de ojo, la oftalmoscopia con láser de exploración óptica adaptativa (AO-SLO), la fluorescencia y/o la autofluorescencia; medir la motilidad ocular y los movimientos oculares (por ejemplo, nistagmo, preferencia de fijación y estabilidad), medir los resultados informados (cambios informados por el paciente en conductas y actividades visuales y no visuales, resultados informados por el paciente [PRO], evaluaciones basadas en cuestionarios de calidad de vida, actividades diarias) y medidas de la función neurológica (por ejemplo, imágenes de resonancia magnética funcional [MRI]).

[00183] En algunas formas de realización, una cantidad efectiva del virión de rAAV, objeto de la presente, da como resultado una disminución en la velocidad de pérdida de la función retiniana, integridad anatómica o salud retiniana, por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces o más de disminución en la velocidad de pérdida y por lo tanto la progresión de la enfermedad, por ejemplo, una disminución de 10 veces o más en la velocidad de pérdida y por lo tanto la progresión de la enfermedad. En algunas formas de realización, la cantidad efectiva del virión de rAAV, objeto de la presente, da como resultado una ganancia en la función visual, la función retiniana, una mejora en la anatomía o salud retiniana y/o una mejora en la motilidad ocular y/o una mejora en la función neurológica, por ejemplo, mejora de 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces o más en la función retiniana, anatomía o salud de la retina, y/o mejora en la motilidad ocular, por ejemplo, una mejora de 10 veces o más en la función retiniana, anatomía o salud de la retina, y/o mejoría en la motilidad ocular. Como apreciarán fácilmente las personas del oficio de nivel medio, la dosis requerida para lograr el efecto de tratamiento deseado estará típicamente en el rango de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{15} viriones recombinantes, a la que la persona del oficio de nivel medio se refiere normalmente como 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{15} "genomas vectoriales".

[00184] Un virión de rAAV, objeto de la presente, puede administrarse por inyección

intraocular, por ejemplo, por inyección intravítrea, por inyección subretiniana, por inyección supracoroidea, o por cualquier otro modo o vía de administración conveniente que resulte en el suministro del virión de rAAV al ojo. Otros procedimientos o vías de administración convenientes incluyen, entre otros, las inyecciones intravenosas, intraarteriales, perioculares, intracamerales, subconjuntivales y tenacientes y la administración tópica e intranasal. Cuando se administra mediante inyección intravítrea, el virión de rAAV, objeto de la presente, puede moverse a través del vítreo y atravesar la membrana limitante interna (también denominada en la presente membrana limitante interna, o "ILM"; una membrana acelular delgada transparente en la superficie de la retina que forma el límite entre la retina y el cuerpo vítreo https://en.wikipedia.org/wiki/Vitreous_body, formada por astrocitos y los pies terminales de células de Müller), y/o se mueve a través de las capas de la retina de manera más eficiente, en comparación con la capacidad de un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV parental correspondiente.

[00185] Una proteína de la cápside variante divulgada en la presente se aísla, por ejemplo, se purifica. En algunas formas de realización, una proteína de la cápside variante divulgada en la presente se incluye en un vector AAV o en un virión de AAV recombinante (rAAV). En otras formas de realización, dichos viriones y/o vectores AAV variantes se usan en un método *in vivo* o *ex vivo* de tratamiento de enfermedades oculares en la retina de primate.

[00186] La divulgación en la presente proporciona además células anfitrionas tales como, entre otras, células anfitrionas aisladas (modificadas genéticamente) que comprenden un ácido nucleico, objeto de la presente. Una célula anfitriona de acuerdo con la invención divulgada en la presente puede ser una célula aislada, tal como una célula de un cultivo celular *in vitro*. Dicha célula anfitriona es útil para producir un virión variante de rAAV, objeto de la presente, como se describe en la presente. En una forma de realización, dicha célula anfitriona está modificada genéticamente de manera estable con un ácido nucleico. En otras formas de realización, una célula anfitriona se modifica genéticamente de forma transitoria con un ácido nucleico. Dicho ácido nucleico se introduce de forma estable o transitoria en una célula anfitriona, utilizando técnicas establecidas, que incluyen, entre otras, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por liposomas y similares. Para una transformación estable, un ácido nucleico generalmente incluirá además un marcador seleccionable, por ejemplo, cualquiera de varios marcadores seleccionables bien conocidos, tales como resistencia a la neomicina, y similares. Dicha célula anfitriona se genera mediante

la introducción de un ácido nucleico en cualquiera de una variedad de células, por ejemplo, células de mamíferos, que incluyen, por ejemplo, células murinas y células de primate (por ejemplo, células humanas). Los ejemplos de células de mamíferos incluyen, entre otros, células primarias y líneas celulares, donde las líneas celulares de ejemplo incluyen, entre otras, células 293, células COS, células HeLa, células Vero, fibroblastos de ratón 3T3, fibroblastos C3H10T1/2, células CHO, y similares. Las células anfitrionas ejemplares incluyen, entre otras, células HeLa (por ejemplo, American Type Culture Collection [ATCC] N.º CCL-2), células CHO (por ejemplo, ATCC N.º CRL9618, CCL61, CRL9096), células 293 (por ejemplo, ATCC N.º CRL-1573), células Vero, células NIH 3T3 (por ejemplo, ATCC N.º CRL-1658), células Huh-7, células BHK (por ejemplo, ATCC N.º CCL10), células PC12 (ATCC N.º CRL1721), células COS, células COS-7 (ATCC N.º CRL1651), células RAT1, células L de ratón (ATCC N.º CCLI.3), células de riñón embrionario humano (HEK) (ATCC N.º CRL1573), células HLHepG2, y similares. También se puede elaborar una célula anfitriona utilizando un baculovirus para infectar células de insectos como las células Sf9, que producen AAV (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 7.271.002; la solicitud de patente estadounidense N.º de ser. 12/297.958). En algunas formas de realización, una célula anfitriona modificada genéticamente incluye, además de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de AAV variante, como se describe anteriormente, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más proteínas rep de AAV. En otras formas de realización, una célula anfitriona comprende además un vector variante de rAAV. Se puede generar un virión variante de rAAV usando dichas células anfitrionas. Los métodos para generar un virión de rAAV se describen, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense N.º 2005/0053922 y en la publicación de patente estadounidense N.º 2009/0202490.

[00187] La divulgación en la presente proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende: a) el virión variante de rAAV, como se describe anteriormente y se describe en la presente; y b) un portador, diluyente, excipiente o amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas formas de realización, el portador, diluyente, excipiente o amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico es adecuado para uso en un paciente humano o no humano. Dichos excipientes, portadores, diluyentes y amortiguadores incluyen cualquier agente farmacéutico que pueda administrarse sin una toxicidad indebida. Los excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico incluyen, entre otros, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sales aceptables desde el punto de

vista farmacéutico pueden incluirse, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, en dichos vehículos pueden estar presentes sustancias auxiliares, como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias amortiguadoras del pH y similares. Una amplia variedad de excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico son conocidos en la técnica y no es necesario describirlos en detalle en la presente. Los excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico se han descrito ampliamente en una variedad de publicaciones, incluidas, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20.^a edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds., 7.^a ed, Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., Eds., 3.^a ed. Amer. Pharmaceutical Assoc. En algunos aspectos de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{15} virus recombinantes o de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{15} genomas de vectores, en donde cada uno de dichos virus recombinantes comprende un genoma que codifica uno o más productos génicos.

[00188] Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a la persona del oficio de nivel medio una divulgación y descripción completas a modo de guía sobre cómo hacer y usar las cápsides de AAV variantes descritas en la presente, y no pretenden limitar el alcance de la invención divulgada en la presente. Además, los siguientes ejemplos no pretenden establecer que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados.

EJEMPLOS

[00189] Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a las personas del oficio de nivel medio una divulgación y descripción completas de cómo elaborar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni están destinados a representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

[00190] Los métodos generales en bioquímica molecular y celular se pueden encontrar

en libros de texto estándar como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^a Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4.^a ed. (Ausubel et al. Eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. Eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kapliff y Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998), cuyas divulgaciones se incorporan en la presente como referencia. Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genética a los que se hace referencia en esta divulgación están disponibles en proveedores comerciales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich y ClonTech.

[00191] Ejemplo 1

[00192] Inyección intravítrea y recolección de tejidos. Se administró a un solo macaco cynomolgus macho (*macaca fascicularis*) de 4 a 10 años de edad con un peso de al menos 4 kg mediante inyección intravítrea a través de la esclerótica (aproximadamente 3 mm por detrás del limbo utilizando un procedimiento y un dispositivo de administración adecuado para uso humano). El animal fue anestesiado y se le administró un anestésico tópico y 100 µL de la genoteca en cada ojo.

[00193] La eutanasia fue realizada por personal veterinario entrenado usando una inyección intravenosa de pentobarbital sodio de 100 mg/kg en el día 14±3. Los ojos fueron nucleados y almacenados a 4 °C hasta la disección.

[00194] Disección del tejido. Se cortaron los ojos a lo largo de la ora serrata con un bisturí y se retiró el segmento anterior. Se hicieron cortes de alivio en la retina alrededor de la fóvea para permitir el montaje plano de la retina, y se eliminó el vítreo. Se recogieron seis muestras de la retina de cada cuadrante (superior, inferior, nasal y temporal), como se muestra en la Figura 2, y se aisló material celular correspondiente a células RPE, fotorreceptores, células biopares, células amacrinas, células horizontales y/o las células ganglionares.

[00195] Evolución dirigida. El proceso de evolución dirigida se muestra en la Figura 1A-1E. En resumen, se crea una genoteca de cápside viral que comprende más de 20 combinaciones patentadas de técnica de mutación de ADN y genes *cap* (Figura 1A). Luego se empaquetan los virus (Figura 1B), de manera que cada partícula está compuesta por una cápside mutante que rodea el gen *cap* que codifica esa cápside, y se purifican. La genoteca de cápside se coloca bajo presión selectiva *in vivo*. El tejido o material celular de interés se recolecta para aislar las variantes de AAV que han

infectado exitosamente esa diana, y los virus exitosos se recuperan. Los clones exitosos se enriquecen mediante selección repetida (Etapa 1 - Figura 1D). Los genes *cap* seleccionados luego se someten a una rediversificación patentada y se enriquecen a través de pasos de selección adicionales para aumentar de forma iterativa la capacidad viral (Etapa 2 - Figura 1D). Las variantes identificadas durante las etapas de selección de vectores 1 y 2 demuestran la capacidad de transducir células de retina de primates (Figura 1E).

[00196] Recuperación exitosa de genomas de cápside de AAV: Rondas 1-6. Las cápsides recuperadas de cada ronda de selección se utilizaron para empaquetar la genoteca inyectada para iniciar la siguiente ronda de selección. La recuperación de los genes de la cápside del tejido representa la internalización exitosa de los vectores de la genoteca en el tejido de interés. Después de la Ronda 4, se incorporó una rediversificación adicional de la genoteca antes del empaquetado de la genoteca y la inyección para la Ronda 5. En la Figura 3 se muestra la recuperación de los genomas virales del tejido retiniano de RPE, PR, capa nuclear interna (INL) y de la capa de células ganglionares (GCL) de una ronda representativa de selección. Las bandas dentro de las cajas representan la recuperación exitosa de genomas virales.

[00197] Análisis de secuenciación: Rondas 3-6. Durante las rondas 3-6, la secuenciación se realizó en clones individuales dentro de la genoteca para determinar la frecuencia de variantes dentro de la población. Las variantes fueron evaluadas por la presencia de motivos dentro de los datos de secuenciación. Las variantes se agruparon en motivos en función de la presencia de una variación unificadora (por ejemplo, una mutación puntual específica o una secuencia de inserción peptídica específica en una ubicación consistente dentro de la cápside) que se produjo en múltiples secuencias. Los motivos que representan al menos el 5 % de la población secuenciada en dos o más rondas de la selección o al menos el 10 % de la población secuenciada en una o más rondas de la selección se representan en la Figura 4A (Análisis de secuenciación de la Ronda 3), 4B (Análisis de secuenciación de la Ronda 4), 4C (Análisis de secuenciación de la Ronda 5) y 4D (Análisis de secuenciación de la Ronda 6).

[00198] Varios clones representativos que se identificaron como que confieren un aumento de la infectividad de las células retinianas se enumeran en la Tabla 1 a continuación (cada clon contiene las sustituciones identificadas y/o la inserción peptídica y, por lo demás, es idéntica a la SEQ ID NO:2; la ronda de selección, número de secuencias y frecuencia [entre paréntesis] se enumeran para cada clon):

Tabla 1. Modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de

AAV VP1 que confieren un aumento de la infectividad de una o más células de la retina. Las sustituciones enumeradas en la columna 2 se basan en la secuencia de aminoácidos para AAV2 de tipo silvestre, es decir, en ausencia de péptido insertado.

Insertión	Sustitución	Pan-Retinal	RPE	Foto-receptor
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	Ninguna	Ronda 4, 5, 6	Ronda 3, 5, 6	Ronda 4, 5
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+M1L+L15P +P535S	Ronda 6 1 (1,61 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+P34A	Ronda 5 1 (1,89 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+P34A+S731L			Ronda 5 1 (1,82 %)
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+N57D	Ronda 4 1 (1,33 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+N66K			Ronda 5 1 (1,82 %)
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+R81Q	Ronda 6 1 (1,61 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+Q101R			Ronda 4 1 (2,27 %)
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+S109T	Ronda 3 1 (1,85 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+R144K			Ronda 5 1 (1,82 %)
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+R144M			Ronda 5 1 (1,82 %)
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+Q164K			Ronda 4 1 (2,27 %)
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+Q164K+V708I	Rondas 3 y 4 2 (3,7 %) 1 (1,33 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+T176P	Ronda 4 1 (1,33 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+L188I		Ronda 5 1 (2,27 %)	
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+S196Y	Ronda 4 1 (1,33 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+G226E			Ronda 4 1 (2,27 %)
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+G236V	Ronda 4 1 (1,33 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+I240T	Ronda 3 1 (1,85 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+N312K	Ronda 4 1 (1,33 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+P363L	Ronda 6 1 (1,61 %)		
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+T456K	Ronda 6 1 (1,61 %)		

Inserción	Sustitución	Pan-Retinal	RPE	Foto-receptor
588-LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+I698V	Ronda 5 1 (1,89 %)		
588-LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+V708I	Ronda 4, 5, 6	Ronda 3, 4, 5	Ronda 4, 5
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	+V708I+R484C		Ronda 5 1 (2,27 %)	
588~LAISDQTKHA~ (SEQ ID NO:28)	N312K+N449D+N551S+I698V+L735Q	Modificado por ingeniería genética		Modificado por ingeniería genética
588~LGISDQTKHA~ (SEQ ID NO:29)	Ninguna	Ronda 5 1 (1,89 %)		
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	Ninguna	Ronda 3, 4, 5, 6	Ronda 3, 4, 5	Ronda 4, 5
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	+E36D		Ronda 5 1 (2,27 %)	
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	+P250S	Ronda 6 1 (1,61 %)		
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	+A524T	Ronda 3 1 (1,85 %)		
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	+A593E	Ronda 4 1 (1,33 %)		
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	+I698V	Rondas 5 y 6 1 (1,61 %) 1 (1,89 %)		
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	+V708I	Ronda 3, 4, 5, 6	Ronda 3, 4, 5	
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	+V708I+V719M		Rondas 3 y 4 1 (2,08 %) 2 (4,55 %)	
588~LAQADTTKNA~ (SEQ ID NO:27)	+V719M		Ronda 4 1 (2,27 %)	
588~LAHQDTTKNA~ (SEQ ID NO:34)	Ninguna	Ronda 5 2 (3,77 %)		
588~LANQDYTKTA~ (SEQ ID NO:31)	Ninguna	Rondas 3, 4 y 5 5 (9,26 %) 1 (1,33 %) 3 (5,66 %)	Rondas 3, 4 y 5 2 (4,17 %) 2 (4,55 %) 2 (2,27 %)	Ronda 5 1 (1,82 %)
588~LANQDYTKTA~ (SEQ ID NO:31)	+S109T+S463Y	Ronda 3 1 (1,85 %)		
588~LANQDYTKTA~ (SEQ ID NO:31)	+D368H	Ronda 3 1 (1,85 %)		
588~LANQDYTKTA~ (SEQ ID NO:31)	+V708I	Ronda 4 1 (1,33 %)	Ronda 3 1 (2,08 %)	
588~LAHDITKNIA~ (SEQ ID NO:32)	Ninguna	Rondas 3, 4, 5 y 6 1 (1,85 %)		

Inserción	Sustitución	Pan-Retinal	RPE	Foto-receptor
		1 (1,33 %) 1 (1,89 %) 2 (3,23 %)		
588~LAHDITKNIA~ (SEQ ID NO:32)	+S109T	Ronda 4 1 (1,33 %)		
588~LAHDITKNIA~ (SEQ ID NO:32)	+R389S	Ronda 5 1 (1,89 %)		
588~LAHDITKNIA~ (SEQ ID NO:32)	+A593E	Ronda 3 1 (1,85 %)		
588~LAHDITKNIA~ (SEQ ID NO:32)	+V708I	Ronda 4, 5		
588~IAHDITKNIA~ (SEQ ID NO: 60)	+V708I		Ronda 3 1 (2,08 %)	
588~LAPNSTHGSA~ (SEQ ID NO:40)	+V708I	Ronda 3 1 (1,85 %)		
588~LANKTTNKDA~ (SEQ ID NO:35)	Ninguna		Ronda 5 1 (2,27 %)	
588~LANKTTNKDA~ (SEQ ID NO:35)	+N449D			Ronda 4 1 (2,17 %)
588~LAHPDTTKNA~ (SEQ ID NO:33)		Ronda 6 1 (1,61 %)		
588~LATNRTSPDA~ (SEQ ID NO:39)		Ronda 6 1 (1,61 %)		
588~LPQANANENA~ (SEQ ID NO:37)		Ronda 5 1 (1,89 %)		
588~LAASDSTKAA~ (SEQ ID NO:30)		Rondas 3 y 4 1 (1,85 %) 1 (1,33 %)		
588~LAKDRAPSTA~ (SEQ ID NO:41)		Ronda 3 1 (1,85 %)		
588~LPISNENEHA~ (SEQ ID NO:36)				Ronda 4 1 (2,17 %)
588~LAGKSKVIDA~ (SEQ ID NO:38)				Ronda 5 1 (1,82 %)
NINGUNA	P34A	Ronda 5 1 (1,89 %)	Rondas 4, 5 3 (6,82 %) 1 (2,27 %)	Ronda 4 1 (2,17 %)
NINGUNA	P64S	Ronda 3 1 (1,85 %)	Ronda 4 1 (2,27 %)	
NINGUNA	S109T	Ronda 4 2 (2,67 %)	Rondas 3, 4, 5 4 (8,33 %) 1 (2,27 %) 1 (2,27 %)	
NINGUNA	S109T+P8L		Ronda 3 1 (2,08 %)	
NINGUNA	S109T+Q120R		Ronda 3 1 (2,08 %)	
NINGUNA	S109T+A493V	Ronda 3		

Inserción	Sustitución	Pan-Retinal	RPE	Foto-receptor
	+A593E+V708I	1 (1,85 %)		
NINGUNA	Q164K	Rondas 4 y 5 2 (2,67 %) 1 (1,89 %)	Ronda 4 1 (2,27 %)	
NINGUNA	Q175H	Ronda 3 1 (1,85 %)		Ronda 4 1 (2,17 %)
NINGUNA	S196Y	Ronda 3 1 (1,85 %)	Ronda 4 1 (2,27 %)	
NINGUNA	A593E	Rondas 3, 4, 5 3 (5,56 %) 7 (9,33 %) 1 (1,89 %)	Rondas 3, 4, 5 12 (25 %) 7 (15,9 %) 14 (31,8 %)	Ronda 4 1 (2,17 %)
NINGUNA	A593E+Q464R		Ronda 3 1 (2,08 %)	
NINGUNA	A593E+N596D		Ronda 4 1 (2,27 %)	
NINGUNA	A593E+N596D +T491A		Ronda 3 2 (4,17 %)	
NINGUNA	A593E+V708I	Rondas 3, 4 2 (3,7 %) 2 (2,67 %)	Rondas 3, 4, 5 4 (8,33 %) 1 (2,27 %) 1 (2,27 %)	
NINGUNA	I698V	Ronda 5 1 (1,89 %)	Ronda 5 1 (2,27 %)	
NINGUNA	V708I	Rondas 3, 4, 5 2 (3,7 %) 5 (6,67 %)	Rondas 3, 4, 5 1 (2,08 %) 4 (9,09 %) 4 (9,09 %)	
NINGUNA	V708I+V719M		Ronda 4 2 (4,55 %)	
NINGUNA	V708I+G727D		Ronda 5 1 (2,27 %)	
NINGUNA	V708I+R733C			Ronda 4 1 (2,17 %)

[00199] También se identificó como una cápside que produce un aumento de la infectividad de una o más células de la retina un clon que tiene la siguiente secuencia de cápside VP1 ancestral:

[00200] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPG
YKYLGPFGNLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQ
EDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGK
KGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQPLGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNE

GADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASAGSTNDNH
YFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTND
GVTTIANNLSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQ
AVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYL
YYLARTQSTGGTAGTRELLFSQAGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLSQNNN
SNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDERFFPSSGVLIFGKQGAGANNTA
LENVMMTSEEEIKTTNPVATEQYGVVASNLQSSNTAPVTGTVNSQGALPGMVWQNR
DVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAVFTPAKFAS
FITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrWNPEIQYTSNYAKSTNVDFAVDNEGVYSEPRPI
GTRYLTRNL. (SEQ ID NO:59)

[00201] Esta variante de cápside ancestral se desarrolla a partir de la cápside ancestral SEQ ID NO:58, en la cual las posiciones de degeneración (residuos 264, 266, 268, 448, 459, 460, 467, 470, 471, 474, 495, 516, 533, 547, 551, 555, 557, 561, 563, 577, 583, 593, 596, 661, 662, 664, 665, 710, 717, 718, 719, 723) evolucionaron para comprender 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.

[00202] Los viriones de AAV variante descritos en la presente pueden incorporar parámetros de diseño, características, modificaciones, ventajas y variaciones razonables y racionales que son fácilmente evidentes para las personas del oficio de nivel medio en el campo de la ingeniería de vectores virales de AAV.

[00203] Ejemplo 2

[00204] Se empleó la evolución dirigida para descubrir variantes de virus adenoasociados (AAV) novedosas con administración de genes superior a las células de la retina después de la administración intravítrea (IVT), una vía de administración con ventajas significativas sobre otros métodos de administración de genes al ojo humano (Ejemplo 1). El tropismo celular después de la administración intravítrea de la variante de AAV novedosa que comprende una sustitución P34A y el péptido LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) insertado en el aminoácido 588 (LAISDQTKHA+P34A) se evaluó *in vivo* en primates no humanos (NHP) como un ejemplo representativo de la capacidad de las

variantes de AAV que contienen ISDQTKH (SEQ ID NO:14) para transducir las células retinianas.

[00205] Se fabricaron mediante métodos estándar viriones de AAV recombinantes que comprenden una cápside de AAV2 o la cápside variante LAISDQTKHA+P34A novedosa y un genoma que comprende un transgén de la proteína fluorescente verde (GFP) operativamente vinculado a un promotor de CMV (AAV2.CMV.GFP y LAISDQTKHA+P34A.CMV.GFP, respectivamente) o un promotor CAG (AAV2.CAG.EGFP y LAISDQTKHA+P34A.CAG.EGFP, respectivamente). Los monos verdes africanos (Figuras 7, 8) o los *Macaca fascicularis* (Figura 9) se inyectaron por vía intravítrea con varias dosis de vectores que iban de 4×10^{10} vg a 1×10^{12} 1e12 vg por ojo (consulte las leyendas de la figura para obtener detalles) y la transducción de las células retinianas fue evaluada en vida mediante imágenes de fondo de ojo de fluorescencia con Heidelberg Spectralis™.

[00206] El suministro intravítreo de AAV que comprende la nueva variante LAISDQTKHA+P34A dio como resultado una expresión transgénica más amplia y más robusta a través de la retina del NHP que AAV2 (Figuras 7-9). Las imágenes revelan que la nueva cápside de AAV variante proporciona una expresión robusta en el centro de la fovea (un área rica en conos); en el anillo parafoveal (un área rica en células ganglionares retinianas), y en la periferia (un área rica en muchos tipos de células, incluidos bastones, glías de Muller, células amacrinas, células bipolares) tan pronto como 2 semanas después de la inyección. Por el contrario, y de acuerdo con los resultados informados por otros, el AAV2 de tipo silvestre proporciona una expresión más débil que se encuentra principalmente en el anillo parafoveal y solo se puede detectar en momentos posteriores. El análisis inmunohistoquímico de varias regiones de la retina realizado 3 semanas después de la inyección confirmó que muchos tipos de células retinianas, incluidas las células epiteliales del pigmento retiniano, los fotorreceptores de bastón y cono, y las células ganglionares de la retina, se habían transducido con éxito en toda la retina (Figuras 10A-10E).

[00207] Este estudio ilustra una administración de genes superior por parte de la variante que comprende ISDQTKH siguiendo una vía de administración clínicamente preferida en comparación con el AAV2 clínicamente relevante. Se puede lograr una eficacia similar con otras variantes que comprenden este motivo de inserción peptídica. Del mismo modo, se puede lograr una eficacia similar con otras variantes descritas en la presente que se identificaron utilizando el mismo enfoque de evolución dirigida.

[00208] Ejemplo 3

[00209] El tropismo celular de la nueva variante de AAV LAISDQTKHA+P34A para las células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE) y las células fotorreceptoras (PR) se evaluó *in vitro* con uso de células RPE y células PR generadas a partir de células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos humanos (FB-iPSC) o células madre embrionarias humanas (ESC).

[00210] Los viriones de AAV que comprenden una cápside de AAV2 o la cápside variante LAISDQTKHA+P34A novedosa y un genoma que comprende un transgén de proteína fluorescente verde (EGFP) operativamente unido a un promotor CAG (AAV2.CAG.EGFP y LAISDQTKHA+P34A.CAG.EGFP, respectivamente) fueron fabricados utilizando métodos estándar. Se generaron cultivos de células RPE humanas a partir de la línea de células madre embrionarias humanas ESI-017 o células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos humanos ("FB-iPSC") utilizando un protocolo de diferenciación de 45 días. La maduración en células RPE se confirmó detectando la expresión de marcadores de RPE maduros, incluidos RPE65 y BEST1; la síntesis de VEGF y PEDF; y la capacidad de fagocitar segmentos externos de bastón. Los cultivos de PR se generaron mediante un paradigma de formación de copa ocular de varios pasos y se confirmó que comprenden células PR detectando la expresión de Recoverina y S Opsina después de 179 días de cultivo.

[00211] En relación con AAV2, LAISDQTKHA+P34A proporcionó una eficiencia de transducción y una expresión del transgén significativamente mayores en los cultivos de RPE humanas siete días después de la infección según lo determinado por la inmunofluorescencia (Figuras 11A-B), citometría de flujo (aumento de 2,7 veces; Figuras 11C-D) y análisis de transferencia Western (Figuras 11E-F). La transducción y la expresión robustas también se lograron utilizando LAISDQTKHA+P34A.CAG.EGFP en cultivos de PR humanas en los 32 días posteriores a la infección. Este estudio ilustra la capacidad superior de las variantes que comprenden ISDQTKH (SEQ ID NO:14) para administrar genes a las células retinianas.

[00212] Lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que las personas del oficio de nivel medio podrán idear diversas disposiciones que, aunque no se describen ni se muestran explícitamente en la presente, incorporan los principios de la invención y se incluyen dentro de su espíritu y alcance. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional que se citan en la presente están destinados principalmente a ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores para promover la técnica, y se deben interpretar como no limitativos de los ejemplos y condiciones citados específicamente.

[00213] Además, todas las declaraciones en la presente que recitan los principios, aspectos y formas de realización de la invención, así como sus ejemplos específicos, pretenden abarcar tanto sus equivalentes estructurales como los funcionales. Asimismo, se pretende que dichos equivalentes incluyan tanto los equivalentes actualmente conocidos como los equivalentes desarrollados en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que realice la misma función, independientemente de la estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no pretende limitarse a las formas de realización ejemplares mostradas y descritas en la presente. Más bien, el alcance y el espíritu de la presente invención se materializan en las reivindicaciones adjuntas.